

## Deneysel Araştırma

# Doksorubisin Uygulamasının Karaciğer, Böbrek ve Kalp Dokularındaki Ghrelin Ekspresyonuna Etkisi

Nevin KOCAMAN<sup>1</sup>, Tuncay KULOĞLU<sup>1</sup>, Selçuk İLHAN<sup>2</sup>, Süleyman AYDIN<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

<sup>2</sup>Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

<sup>3</sup>Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

## ÖZET

**Amaç:** Doksorubisin(Dx), kliniklerde oldukça yaygın olarak kullanılan ve oksidatif stresi artırıcı etki ile hücre hasarına yol açtığı bilinen antrasiklin grubu antibiyotiklerdendir. Ghrelin'in, glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktivitesini artırarak serbest oksijen radikallerinin oluşumunu azalttığı bilinmektedir. Bu çalışmada, Dx uygulamasına bağlı oluşan olası doku hasarına karşı sıçan karaciğer, kalp ve böbrek dokularındaki endojen ghrelin ekspresyonunun immünohistokimyasal metodlarla tesbit edilmesi amaçlandı.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmada 14 adet erişkin, Wistar Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar her grupta 7 denek olmak üzere iki gruba ayrıldı. Grup I'deki sıçanlar kontrol olarak kullanıldı. Grup II'yi oluşturan deneklere çalışmanın 1. günü tek doz 10 mg/kg intraperitoneal (ip) Dx uygulandı ve deney süresi olan 14 gün boyunca herhangi bir işlem yapılmadı. Deneyin sonunda sıçanlar dekapite edilerek karaciğer, kalp ve böbrek dokuları çıkartıldı. Rutin histolojik takipler sonucunda dokular parafin bloklara gömüldü. Parafin kesitlere Avidin-biyotin kompleks metodu uygulanarak ghrelin immünreaktivitesine bakıldı. Dokulardaki immünreaktivitenin belirlenmesi için immünboyama yapıldı ve gruplar arası sitoplazmik boyamanın derecesi semi-kantitatif olarak değerlendirildi.

**Bulgular:** Kontrol grubuna ait karaciğer dokularındaki ghrelin immünreaktivitesi orta derece (+2) iken, kalp ve böbrek doku kesitlerinde hafif (+1) olarak değerlendirildi. Dx grubu sıçan dokularındaki immünreaksiyon; karaciğerde (+1) hafif, kalp ve böbrek dokularında şiddetli (+3) olarak ayırt edildi.

**Sonuç:** Dx kullanımı sonucu oluşan karaciğer, kalp ve böbrek dokularındaki hasar karşısında, endojen bir antioksidan olan ghrelin, dokudan dokuya değişiklik gösteren bir salınım sergilemektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Doksorubisin, Ghrelin, Karaciğer, Böbrek, Kalp, İmmünohistokimya.

## ABSTRACT

### The Effects of Doxorubicin on The Expression of Ghrelin in The Liver, Kidneys and Cardiac Tissues

**Objective:** Doxorubicin is an anthracycline group antibiotic that has effects on cell damage by increasing oxidative stress. It is known that ghrelin is a strong endogenous growth hormone releaser and reduces free radical production via increasing Glutathione peroxidase activity. In this study, we purposed to evaluate the effects doxorubicin application on ghrelin immunoreactivity in liver, heart and kidney tissues of rats using immunohistochemical methods.

**Material and Method:** In this study, 14 adult Wistar Albino male rats were used. Rats were divided into two groups equally (n=7). The rats in the first group were used as control. The second group of rats were injected single dose doxorubicin 10 mg/kg intraperitoneally (i.p.) on 1st day of experimental study and there is no any application during 14 days. At the end of the study, rats were decapitated and liver, heart and kidney tissues removed. Following routine procedures, the tissues were set into the paraffin block and examined using immunohistochemical stain method. Immunohistochemical evaluation was based on the assessment of the prevalence of staining.

**Results:** Ghrelin immunoreactivity was observed as +2 in control group and 1+ in doxorubicin groups in liver tissue. In control group, 1+ ghrelin immunoreactivity was observed in heart and kidney tissues. There is a significant increase in heart and kidney tissues in Dx group and +3 ghrelin immunoreactivity was observed.

**Conclusion:** According to results of this study performed immunohistochemically, ghrelin different shows immunoreactivity across damage caused by doxorubicin in the liver, kidney and heart tissue.

**Key Words:** Doxorubicine, Ghrelin, Liver, Kidney, Heart, Immunohistochemistry.

Doksorubisin (Dx), *Streptomyces peucetius*'un fermentasyonu ile elde edilen antrasiklin antibiyotiklerdendir (1). Tümör tedavisinde geniş spektümlü bir ajan olması nedeniyle önemli olmakla

beraber, toksik yan etkileri ilacın terapötik kullanımını kısıtlamaktadır (2). Dx 'in kimyasal yapısı, oksidatif stresi artırıp serbest radikallerin oluşmasına ve hücre hasarına yol açmaktadır (3). Demir iyonları, plazmada

<sup>3</sup> Yazışma Adresi: Dr. Nevin KOCAMAN, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

Tel: 0 424 2370000

Geliş Tarihi/Received: 08.05.2013

e-mail: drnkocaman@gmail.com

Kabul Tarihi/Accepted: 08.05.2014

serbest radikal reaksiyonları için katalitik bir etkiye sahip olup Dx'in demir iyonu ile oluşturduğu kompleksin, potansiyel preoksidan etkisi olduğu gösterilmiştir. Bu kompleks, glutatyon veya nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) bağımlı enzimleri azaltması yanında, serbest radikal oluşum reaksiyonlarını başlatabilmektedir (4).

Yetişkinlerde büyüme hormonu eksikliğinin oksidatif stresi artırdığı, ancak büyüme hormonu tedavisi ile bu durumun geriye döndüğü bildirilmiştir (5). Ghrelin, Masayasu Kojima tarafından ilk defa 1999 yılında büyüme hormonu salgılatıcı hormon reseptörü 1a (GHS-R1a)'ya bağlanmış peptit yapıda endojen bir gastrik hormon olarak keşfedilmiş ve endojen kaynaklı güçlü bir büyüme hormonu salgılatıcısı olduğu görülmüştür (6-7). Esas olarak mide mukozasında yer alan endokrin fonksiyonlara sahip P/D1 ve X/A hücreleri tarafından üretilmektedir (8). Ghrelin'in hipotalamus, pituitar bez, beyin, böbrek, pankreas, kalp, mide ve bağırsak dokularında bulunduğu ve GHS-R 1a reseptörü üzerinden etki ettiği tesbit edilmiştir (9-10).

Ghrelin uygulamasının glutatyon peroksidaz enzim aktivitesini artırarak serbest oksijen radikallerinin oluşumunu azalttığı gösterilmiş olup preadipozit hücre kültürlerinde ve spontan hipertansif sıçanlarda; süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerinin aktivitesini artırdığı, vasküler süperoksit üretimini önlediği bildirilmiştir (11-13).

Bu çalışma ile kliniklerde çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan Dx'in, dokularda oluşturabileceği hasar karşısında endojen bir antioksidan olan ghrelin'in; karaciğer, kalp ve böbrek dokularında nasıl bir tepki oluşturduğunu immunohistokimyasal yöntemlerle belirlemeyi amaçladık.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda 8 haftalık erişkin Wistar Albino cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar buldukları ortamın sıcaklığı 22-25°C arasında sabit ortamda ve 12 saat ışık, 12 saat karanlıkta takip edildi. Sıçanlar havalandırma sistemi bulunan bir ortamda özel olarak hazırlanmış ve her gün altları temizlenen kafeslerde beslendi. Yemler özel çelik kaplarda, su ise paslanmaz çelik bilyeli biberonlarda normal çeşme suyu olarak verildi. Çalışmanın tüm aşamalarında 1983 Helsinki deklarasyonunda bildirilen "Hayvanlarda Bilimsel Çalışmalar için Etik Kurallar" a uyulmuştur.

Deney hayvanları, daha önceki çalışmalara dayanarak her grupta 7 sıçan olmak üzere 2 gruba ayrıldı.

Grup I (n=7): Kontrol grubu sıçanlara deney süresi olan 14 gün boyunca herhangi bir işlem yapılmadı.

Grup II (n=7): Dx grubu deneklere deneyin ilk günü 10 mg/kg/tek doz Dx intraperitoneal (ip) olarak verildi ve deney sonuna kadar herhangi bir işlem yapılmadı.

Deneyin 15. günü tüm gruplardaki sıçanlar, ketamin (75mg/kg)+xylazine (10mg/kg) intraperitoneal uygulanarak anestezisi altında dekapite edildi. Dekapitasyonun ardından sıçanların böbrek, kalp ve karaciğer dokuları hızla çıkarılıp %10 formaldehitte tespit edildi. Takiben histokimyasal incelemeler için parafin bloklar hazırlandı.

Parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığındaki kesitler polilizinli lamlara alındıktan sonra deparafinize edilip, dereceli alkol serilerinden geçirildi. Dokular antigen retrieval için sitrat tampon solüsyonunda pH 6'da mikrodalga fırında (750W) 7+5 dakika kaynatıldı. Zemin boyasını önlemek için Ultra V Block (TA-125-UB, Lab Vision Corposiçanion, USA) solüsyonu uygulamasını takiben primer antikor (Ghrelin goat poliklonal IgG, sc-10368, Santa Cruz Biotechnology, California, USA) ile 60 dakika inkübe edildi. Primer antikor uygulanmasından sonra sekonder antikor (30 dakika) (Donkey anti-goat IgG-B, sc-2042), Streptavidin Alkaline Phosphatase (30 dakika) (TS-060-AP, Lab Vision Corposiçanion, USA) ve Fast Red Substrate System (TA-125-AF, Lab Vision Corposiçanion, USA) ile muamele edildi. Mayer's hematoksilen ile zıt boyaması yapılan dokular PBS (Phosphate Buffered Saline) ve distile sudan geçirilerek uygun kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Olympus BX 50 mikroskopunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı.

## İmmunohistokimyasal Boyama

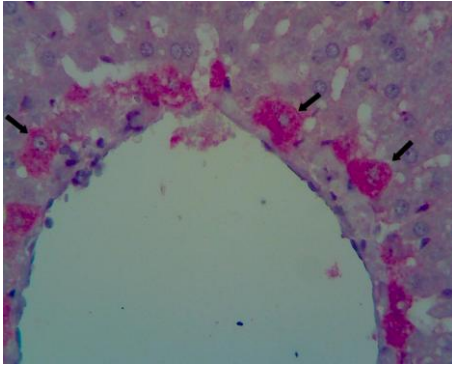
Karaciğer, kalp ve böbrek dokularında meydana gelen immunpozitifliğin belirlenmesi için immunboyama yapıldı ve gruplar arası sitoplazmik boyamanın derecesi semi-kantitatif olarak değerlendirildi. Skorum; -, yok; +1, hafif; +2, orta; +3, şiddetli olarak değerlendirildi.

## BULGULAR

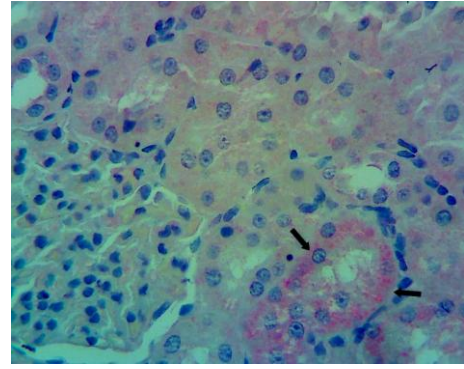
Ghrelin immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskopik incelenmesi sonucu elde edilen Ghrelin immünreaktivitelere ait semikantitatif değerler Tablo 1'de; karaciğer, kalp ve böbrek dokularına ait mikroskopik görünüm ise Şekil 1-6'da verilmiştir.

**Tablo 1. Gruplara ait karaciğer, kalp ve böbrek dokularında ghrelin immünreaktivitesi semikantitatif analiz değerleri.**

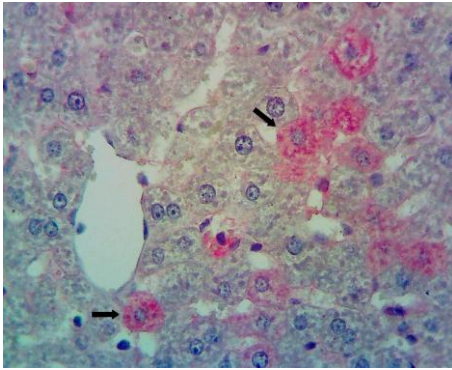
	Kontrol grubu	DX grubu
Karaciğer	+2	+1
Kalp	+1	+3
Böbrek	+1	+3



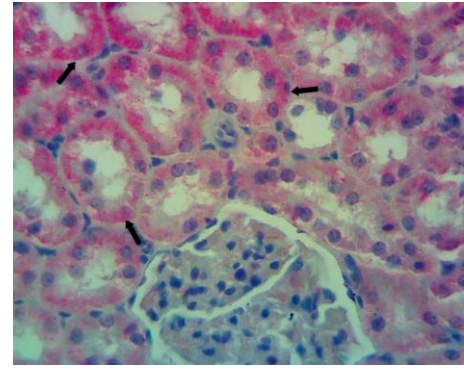
**Şekil 1.** Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu ghrelin immunreaktivitesi ayırtedilmekte. 400X.



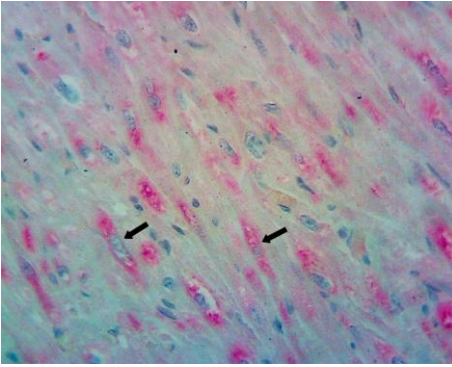
**Şekil 5.** Kontrol grubuna ait böbrek dokusuna ait ghrelin immunreaktivitesi ayırtedilmekte. 400X.



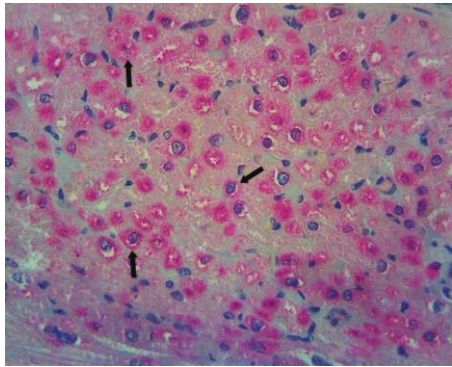
**Şekil 2.** Dx grup sıçan karaciğer dokusu ghrelin immunreaktivitesi izlenmekte. 400X.



**Şekil 6.** Dx grup sıçan böbrek dokusu ghrelin immunreaktivitesi gözlenmekte. 400X.



**Şekil 3.** Kontrol grubuna ait kalp dokusu ghrelin immunreaktivitesi ayırtedilmekte. 400X.



**Şekil 4.** Dx grup sıçan kalp dokusu ghrelin immunreaktivitesi gözlenmekte. 400X.

Mevcut çalışmanın histolojik bulgularına göre, kontrol grubuna ait sıçan karaciğer dokularında özellikle vena sentralis çevresindeki hepatositlerde daha belirgin olmak üzere ghrelin immunreaktivitesi (+2) orta derecede izlenirken, kalp ve böbrek dokularında hafif (+1) olarak ayırtıldı.

Dx grubuna ait karaciğer dokularına ait kesitlerdeki ghrelin hafif (+1) derecede pozitif boyanmasına rağmen, kalp ve böbrek dokusu kesitlerinde immunreaktivite şiddetli (+3) idi ve özellikle böbreğin distal tübüllerinde yoğunlaşmıştı.

## TARTIŞMA

Dx geniş spektrumlu antitümöral bir ajan olup tedavide oldukça yaygın kullanıma sahiptir. Ancak toksik yan etkileri, ilacın terapötik kullanımını kısıtlamaktadır (2). Uzun süreli kullanımı ve doza bağlı olarak özellikle karaciğer, böbrek ve kalp dokusunda toksik etki göstererek bazal metabolizmanın bozulmasına neden olmaktadır (14). Dx'e bağlı oluşan organ toksisitelerinin temel sebebinin oksidatif strese bağlı olduğu ileri sürülmektedir (15). Dx kullanımı sonucu oluşan süperoksit anyonu, hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen ürünlerinin organlarda hasara neden olabileceği bilinmektedir (16).

Güçlü bir büyüme hormonu endojen salgılatıcısı olan ghrelin ve reseptörleri; arter, ven, vasküler düz kas hücreleri, böbrek, pankreas, hipotalamus, beyin, hipofiz

bezi, mide, bağırsak ve kalp miyosit hücrelerinde bulunmuştur (17). Bu dağılım ghrelinin ve GH (büyüme hormonu) salgılatıcıların çeşitli organlarda birçok fizyolojik roller üstlendiğini göstermektedir. Ghrelin, kardiyovasküler sistemde iskemiye bağlı gelişen pek çok bozukluğa karşı koruyucu etki yapmaktadır (18). Ghrelin hormonu serbest radikalleri ortadan kaldırarak onların kan ve doku düzeylerini azaltabilir (19). Ghrelin'in, iskemiye bağlı artan sitokrom c ve kaspaz 3 salınımını azaltarak apoptotik yolağı inhibe ettiği ve dolayısıyla da apoptozisi önleyerek beyin dokusunun hasarlanmasına engel olduğu tespit edilmiştir (20).

Dx karaciğerde histopatolojik olarak; venookluziv hastalık, kronik fibrozis, karaciğer yağlanması, kolestaz ve hepatoselüler fonksiyon bozukluğuna neden olabilmektedir (21). Karaciğer hastalıkları üzerine ghrelin'in etkilerini araştıran pek çok çalışma, bu peptidin, karaciğer hasarında hafifletici bir rol oynadığını göstermektedir (22). Ghrelin, nötrofil inhibisyonu yanında Tümör Nekrotizan Faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), İnterlökin1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) ve İnterlökin-6 (IL-6)'nın ekspresyonunu azaltarak parsiyel karaciğer rezeksiyonu sonucu oluşan iskemik hasarın göstergeleri olan aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), laktat dehidrogenaz (LDH), malondialdehit (MDA) seviyelerini olumlu yönde etkilemektedir (22). Xu ve arkadaşları (23), ghrelin'in TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor kappa B) yolakları ve mitokondrial koruma mekanizmaları ile Dx'in oluşturduğu kardiyotoksisteye karşı MDA ve LDH aktivitelerindeki artışı azaltarak koruyucu etki yaptığını göstermişlerdi. Ghrelin'in dolaşımında çok düşük dansiteli lipoprotein (VHDL) ve yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) ile taşındığı bilinmektedir (24). Bu çalışmada, Dx grubu karaciğer dokularındaki ghrelin ekspresyonu, kontrol grubu ile kıyaslandığında, büyük ölçüde azalmıştı. Bu azalmanın muhtemel sebebinin karaciğer hasarına bağlı olarak VHDL ve HDL'nin yapımının azalmasına bağlı olarak periferik dokulardan karaciğere ghrelin'in taşınmasının azaldığı yönündedir.

Dx'e bağlı kardiyotoksisteye de, kan basıncı ve EKG değişiklikleri gibi hafif semptomlar görülebileceği gibi konjestif kalp yetmezliği, disritmi, miyokardit, perikardit ve kardiyomiopati gibi ağır bulgular da görülebilir (25). Histopatolojik olarak ise miyokard liflerinde şişme, intertisiyel ödem, disorganizasyon, nekroz ve vakuolizasyon görülebilir (26). Dx, kalp dokusunda apoptotik etkilere sebep olmaktadır (27). Ghrelin ise in vitro olarak endotel hücreleri ve kardiyomiyositlerin apoptozisini baskılamakta ve sol ventrikül disfonksiyonunu düzeltmektedir (27). Sentetik ghrelin analoglarının verildiği kalp yetmezliği olan hastalarda ghrelin'in, olumlu etkilere sebep olduğu gösterilmiştir (28). Yine ghrelin hem vazodilatasyon yaparak, hemde miyokardiyal kontraktiletiyi artırarak, miyokard hasarına bağlı patolojilerde olumlu bir etki yapmaktadır (29). İntravenöz ghrelin enjeksiyonu

sonrası kan basıncının düşmeden kardiyak atım hızının düştüğü ancak kardiyak çıkışın arttığı görülmüştür (10). Ghrelin, arterlerdeki endotelin-1'in vazokonstriktif etkisini de ortadan kaldırmaktadır (27). Ghrelin'in kardiyovasküler sistem üzerindeki protektif etkilerinin fosfatidil kinaz inhibisyonu yoluyla kardiyak inflamasyonu engellemesi şeklinde olduğu yönündedir (30). Sıçanlar üzerinde yapılan başka bir çalışmada uzun süreli ghrelin tedavisinin artan böbrek nitrik oksit (NO) üretimi ile ilişkili diüretik etkisi sonucu, tuz bağımlı hipertansiyonu dengeleyerek kardiyoprotektif etki yaptığını göstermiştir (31). Yaptığımız çalışmada, kontrol grubu ile kıyaslandığında Dx grubu sıçanların kalp dokularındaki ghrelin immunreaktivitesinin anlamlı oranda arttığı görüldü. Doksorubusin grubu kalp dokularında ghrelin immunreaktivitesinin artma sebebinin, Dx'e bağlı gelişebilecek kalp hasarına karşı ghrelin'in koruyucu etki yapmasının sonucu olabilir.

Dx böbrekler üzerinde de çeşitli değişikliklere sebep olur ki bunlar; hemorajik sistit, oligüri, dizüri, kreatininde yükselme, hiperürisemi şeklinde gelişebilir (32). Histopatolojik olarak ise böbrekte glomerüler kapiller permeabilitesinde artış ve tübüler atrofi meydana getirmektedir (33). Değişikliklerin ortak sebebi, serbest oksijen radikalleri (SOR)'nin oluşumu ve lipid peroksidasyonudur (34). Ghrelin böbrek dokularından da salgılanan bir peptid hormondur. Daha önceki çalışmalar, böbreklerden yüksek miktarda; hatta ilk tesbit edildiği doku olan mide dokusundan bile daha fazla ghrelin sentezlendiğini göstermiştir (35).

İntravenöz ghrelin enjeksiyonu kan basıncını düşürüp, kardiyak çıkışı artırmaktadır (10). Sıçanlarda nükleus traktus soliterii'ye intracerebroventriküler ghrelin enjeksiyonu sonrası sempatik aktivitenin baskılanarak kan basıncının ve kalp hızının düştüğü görülmüştür (36) Bu durumun böbrekler üzerinde olumlu etkiye sebep olacağı bilinmektedir. Mevcut bilgiler ışığında Dx uygulamasına bağlı artmış oksidan strese karşı, antioksidan özelliği olan ghrelin'in böbrek dokusunu korumaya yönelik olarak ve ayrıca Dx uygulamasına bağlı azalmış glomerüler filtrasyon hızı (GFR) sonucu oluşabilecek bir hipertansif atağa karşı da, koruyucu amaçlı olarak arttığı yönündedir.

Sonuç olarak, ghrelin immunreaktivitesinin Dx grubu kalp ve böbrek dokularında artma sebebinin, Dx uygulaması sonucu oluşan oksidan hasara karşı ghrelin'in koruyucu amaçlı arttığı şeklindedir. Ancak hastalık grubu KC dokularında ghrelin ekspresyonunun kalp ve böbrek dokularının tersine azalmış olarak tesbit edilmesi ise ghrelin taşıyıcı yağ asitlerindeki düşme gibi metabolik etkileşimden dolayı olduğu yönündedir. Mevcut bilgilerin ışığında, oksidatif stres ve lipid profilinin birlikte değerlendirileceği daha kapsamlı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç olduğu kanaatine varılmıştır.

**KAYNAKLAR**

1. Kayaalp SO, Türker A. Kanser kemoterapisinin esasları ve antineoplastik ilaçlar. In: kayaalp SO (Editors). Rasyonel Tedavi yönünden Tıbbi Farmakoloji. 12. Baskı, İstanbul: Güneş Basımevi, 2009: 331.
2. O'Brien BA, Harmon BV, Cameron DP, Allan DJ. Nicotinamide prevents the development of diabetes in the cyclophosphamide-induced NOD mouse model by reducing beta-cell apoptosis. *J Pathol* 2000; 191: 86-92.
3. Yagmurca M, Bas O, Mollaoglu H, et al. Protective effects of erdosteine on doxorubicin-induced hepatotoxicity in rats. *Arch Med Res* 2007; 38: 380-5.
4. Weijl NI, Cleton FJ, Osanto S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. *Cancer Treat Rev* 1997; 23: 209-40.
5. Evans LM, Davies JS, Anderson RA, et al. The effect of GH replacement therapy on endothelial function and oxidative stress in adult growth hormone deficiency. *Eur J Endocrinol* 2000; 142: 254-62.
6. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402: 656-60.
7. Korbonits M, Bustin SA, Kojima M, et al. The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 881-7.
8. Fukushima N, Hanada R, Teranishi H, et al. Ghrelin directly regulates bone formation. *J Bone Miner Res* 2005; 20: 790-8.
9. Li Z, Li Y, Zhang W. Ghrelin receptor in energy homeostasis and obesity pathogenesis. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2013; 114: 45-87.
10. Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, et al. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2988.
11. Iseri SO, Sener G, Yuksel M, et al. Ghrelin against alendronate-induced gastric damage in rats. *J Endocrinol* 2005; 187: 399-406.
12. Kawczynska-Drozd A, Olszanecki R, Jawien J, et al. Ghrelin inhibits vascular superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 2006; 19: 764-7.
13. Zwirska-Korczala K, Adamczyk-Sowa M, Sowa P, et al. Role of leptin, ghrelin, angiotensin II and orexins in 3T3 L1 preadipocyte cells proliferation and oxidative metabolism. *J Physiol Pharmacol* 2007; 58: 53-64.
14. Kalender Y, Yel M, Kalender S. Doxorubicin hepatotoxicity and hepatic free radical metabolism in rats. The effects of vitamin E and catechin. *Toxicology* 2005; 209: 39-45.
15. Chen Y, Jungsuwadee P, Vore M, Butterfield DA, St Clair DK. Collateral damage in cancer chemotherapy: oxidative stress in nontargeted tissues. *Mol Interv* 2007; 7: 147-56.
16. Karım S, Bhandari U, Kumar H, Salam A, Siddiqui MAA, Pillai KK. Doxorubicin induced cardiotoxicity and its modulation by drug. *Ind J Pharmacol* 2001; 33: 203-7.
17. Tschop M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 2001; 50: 707-9.
18. Bodat V, Febbraio M, Demers A, et al. CD36 mediates the cardiovascular action of growth hormone-releasing peptides in the heart. *Circ Res* 2002; 90: 844-9.
19. Küçüksu M. Metabolik sendrom olusturulmuş sıçanlarda enalapril maleate'ın ghrelin ve obestatin üzerine Etkisi. Uzmanlık Tezi. 2009; 61-74.
20. Chang L, Ren Y, Liu X, et al. Protective effects of ghrelin on ischemia/reperfusion injury in the isolated rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 43: 165-70.
21. Baquiran DC, Gallagher J (Editors). Lippincott's cancer chemotherapy handbook, Philadelphia: PA: W. B. Saunders Company, 2001.
22. Iseri SO, Sener G, Saglam B, Ercan F, Gedik N, Yegen BC. Ghrelin alleviates biliary obstruction-induced chronic hepatic injury in rats. *Regul Pept* 2008; 146: 73-9.
23. Xu Z, Lin S, Wu W, et al. Ghrelin prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity through TNF-alpha/NF-kappaB pathways and mitochondrial protective mechanisms. *Toxicology* 2008; 247: 133-8.
24. Beaumont NJ, Skinner VO, Tan TM, et al. Ghrelin can bind to a species of high density lipoprotein associated with paraoxonase. *J Biol Chem* 2003; 278: 8877-80.
25. Wojtacki J, Lewicka-Nowak E, Lesniewski-Kmak K. Anthracycline-induced cardiotoxicity: clinical course, risk factors, pathogenesis, detection and prevention--review of the literature. *Med Sci Monit* 2000; 6: 411-20.
26. Morishima I, Matsui H, Mukawa H, et al. Melatonin, a pineal hormone with antioxidant property, protects against adriamycin cardiomyopathy in rats. *Life Sci* 1998; 63: 511-21.
27. Nagaya N, Kangawa K. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing peptide, in the treatment of chronic heart failure. *Regul Pept* 2003; 114: 71-7.
28. Palus S, von Haehling S, Doehner W, et al. Effect of application route of the ghrelin analog BIM-28131 (RM-131) on body weight and body composition in a rat heart failure model. *Int J Cardiol* 2013; 168: 2369-74.
29. Rizzo M, Rizvi AA, Sudar E, et al. A review of the cardiovascular and anti-atherogenic effects of ghrelin. *Curr Pharm Des* 2013; 19: 4953-63.
30. Cao Y, Tang J, Yang T, et al. Cardioprotective effect of ghrelin in cardiopulmonary bypass involves a reduction in inflammatory response. *PLoS One* 2013; 81: e55021.
31. Aoki H, Nakata M, Dezaki K, et al. Ghrelin counteracts salt-induced hypertension via promoting diuresis and renal nitric oxide production in Dahl rats. *Endocr J* 2013; 60: 571-81.
32. Baquiran DC, Gallagher J (Editors). Lippincott's Cancer Chemotherapy Handbook, Philadelphia: PA: W. B. Saunders Company, 2001.
33. Injac R, Strukelj B. Recent advances in protection against doxorubicin-induced toxicity. *Technol Cancer Res Treat* 2008; 7: 497-516.
34. Menna P, Salvatorelli E, Minotti G. Cardiotoxicity of antitumor drugs. *Chem Res Toxicol* 2008; 21: 978-89.
35. Dagli AF, Aydin S, Karaoglu A, Akpolat N, Ozercan IH, Ozercan MR. Ghrelin expression in normal kidney tissue and renal carcinomas. *Pathol Res Pract* 2009; 205: 165-73.
36. Lin Y, Matsumura K, Fukuhara M, Kagiya S, Fujii K, Iida M. Ghrelin acts at the nucleus of the solitary tract to decrease arterial pressure in sıçans. *Hypertension* 2004; 43: 977-82.