

DeneySEL Araştırma

Adriamisin Uygulamasının Sıçan Kalp Dokusunda Nesfatin-1 İmmünreaktivitesi Üzerine Etkileri

Tuncay KULOĞLU^{a1}, Gökhan ARTAŞ²

¹Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

²Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

ÖZET

Amaç: Adriamisin birçok solid tümörün ve hematolojik malignitenin tedavisinde kullanılan geniş spektrumlu bir kanser ilacıdır. Adriamisin kullanımının ana yan etkisinin kalp yetmezliği ve kardiyomyopati olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalar adriamisin kardiyotoksitesinin patogenezinde oksidatif stresin önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Nesfatin-1 diyabet, obezite, anoreksia nervosa, psikiyatrik bozukluklar ve nörojenik hastalıklar ile yakından ilişki göstermektedir. Nesfatin-1'in miyokardiyal performansı direk olarak etkilediği ve kalp kasını iskemi reperfüzyon hasarından koruduğu bildirilmiştir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda erişkin Wistar albino erkek sıçanlar kullanıldı. Deney hayvanları her grupta 6 hayvan olmak üzere 2 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna deney süresi olan 14 gün boyunca herhangi bir işlem yapılmadı. Adriamisin grubuna ise 10 mg/kg/tek doz adriamisin intraperitoneal olarak verildi. Deney sonunda sıçanlar anestezisi altında dekapite edilerek kalp dokuları çıkarıldı. Rutin protokoller ile dokular parafin bloklara gömüldü. Kesitlere Nesfatin-1 immünreaktivitesi için avidin-biotin-peroksidaz yöntemi uygulandı. Sitoplazmik immün boyanmanın yaygınlığı 0'dan +3'e kadar sayı ile semi-kantitatif olarak skorlandı.

Bulgular: Nesfatin-1 immünreaktivitesi, kontrol grubunda kalp dokusunda miyositlerde +3 yaygınlığında izlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında nesfatin-1 immünreaktivitesinde adriamisin grubunda miyositlerde belirgin bir azalma vardı ve +1 yaygınlığında tespit edildi.

Sonuç: Sıçan kalp dokusunda nesfatin-1 salınımının olduğu, deneysel adriamisin uygulanmasının sıçan kalp dokusunda nesfatin-1 immünreaktivitesini azalttığı, bunun da adriamisine bağlı miyosit hasarı ve/veya kaybına bağlı olabileceği kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Adriamisin, Kalp, Nesfatin-1.

ABSTRACT

The Affects of Adriamycin Implementation to The Immunoreactivity of Nesfatin-1 at Rat Heart Tissue

Objective: Adriamycin is a broad-spectrum anticancer drug that is used at various type of solid tumors and hematologic malignancies. The main side effects of adriamycin are heart failure and cardiomyopathy. Studies suggests that, oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of adriamycin cardiotoxicity. Nesfatin-1 is closely associated with diabetes, obesity, anorexia nervosa, psychiatric disorders, and neurogenic diseases. It has been reported that Nesfatin -1 directly affects the myocardial performance and protects the myocardium from ischemia reperfusion injury.

Material and Method In this study Wistar albino rats were used. Rats were divided into 2 groups. No application was made to control group at 14 days. To adriamycin group, 10mg/kg single dose adriamycin was injected intraperitoneally. Finally rats were decapitated and heart tissues were removed. With routine procedures, tissues were embedded in paraffine blockes. For nesfatin-1 immunoreactivity "avidin-biotin-peroxidase" method was applied.

Results In control group was observed at +3 diffusiveness in myocytes at heart tissue. In comparison with control group, nesfatin-1 immunoreactivity showed significant decrease at adriamycin group and was at +1 diffusiveness.

Conclusion: As a result, rat heart tissue releases nesfatin-1, experimental implementation of adriamycin reduces nesfatin-1 immunoreactivity in rat heart tissue, and this decrease depends on myocardial damage / loss due to adriamycin.

Key Words: Adriamycin, Heart, Nesfatin-1.

Adriamisin birçok solid tümörün ve hematolojik malignitenin tedavisinde kullanılan geniş spektrumlu bir kanser ilacıdır (1, 2). Etkisini topoizomeraz II enzimini inhibe ederek gösterir (3). Adriamisin kullanımının ana yan etkisinin kalp yetmezliği ve kardiyomyopati olduğu bilinmektedir (4-6).

Kardiyotoksitesiteye neden olan adriamisin tam mekanizması belirsizliğini sürdürmekte olup yapılan çalışmalar adriamisin kardiyotoksitesinin patogenezinde oksidatif stresin önemli bir rol oynadığını göstermektedir (7-9). Serbest oksijen radikallerinin üretimi veya oksidatif stres

^a Yazışma Adresi: Dr. Tuncay KULOĞLU, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

Tel: 0 424 2370000/4645

Geliş Tarihi/Received: 14.07.2014

e-mail: tkuloglu@firat.edu.tr

Kabul Tarihi/Accepted: 24.07.2014

kardiyomyositlerde apoptozise, nekroza ve otofajiye yol açmaktadır (10). Adriamisin, katalaz ve süper oksid dismutaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini azaltarak myositlerin serbest oksijen radikallerine duyarlılığını arttırmaktadır (11).

Yeni tanımlanan anoreksijenik hormon olan nesfatin-1 diyabet, obezite, anoreksia nervoza, psikiyatrik bozukluklar ve nörojenik hastalıklar ile yakından ilişki göstermektedir (12). Nesfatin-1 ilk kez 2006 yılında Oh-I ve ark. tarafından hipotalamusta tanımlanmış olup 82 amino asitten oluşmaktadır. Bu polipeptid öncülü olan nükleobindin2 (NUCB2) proteininin proteolizi ile oluşur ve ismini üçüncü ventriküle enjeksiyonundan sonra besin alımını azalttığı görülmüştür. NUCB2 üç polipeptide ayrılır: nesfatin-1, nesfatin-2 ve nesfatin-3. Anoreksijenik etki sadece nesfatin-1 için tanımlanmıştır (13).

Nesfatin-1'in sıçanlarda intravenöz enjeksiyonunun kan glukoz düzeylerini düşürerek antihiperglisemik etki gösterdiği bilinmektedir (14). Ratlarda nesfatin-1'in beslenme alışkanlığı, besin alımı, vücut ağırlığı ve glukoz dengesinin düzenlenmesinde etkili olduğu gösterilmiştir (15). Beslenme ve enerji dengesi üzerindeki etkilerine ek olarak nesfatin-1 vasküler kontrole de katkıda bulunmaktadır. Santral nesfatin-1'in hipertansiyondan sorumlu olan sinirsel ağrı uyardığı gösterilmiştir (16). Yapılan bir çalışmada kalbin kendisinin nesfatin-1 ve öncülü olan NUCB2 ürettiği gösterilmiştir (17).

Bu çalışmada amacımız adriamisin'in sıçan kalp dokusunda nesfatin-1 immünreaktivitesi üzerine etkilerini araştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma 02/08/2012 tarihli ve 2012/08 sayılı ve 82 nolu Fırat Üniversitesi etik kurul kararı ile onay alındıktan sonra gerçekleştirildi. Çalışmamızda erişkin Wistar albino erkek sıçanlar kullanıldı. Deney hayvanları her grupta 6 hayvan olmak üzere 2 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna deney süresi olan 14 gün boyunca herhangi bir işlem yapılmadı. Adriamisin grubuna ise 10 mg/kg/tek doz adriamisin intraperitoneal (ip) olarak verildi ve deney sonuna kadar herhangi bir işlem yapılmadı. Deney sonunda tüm gruplardaki sıçanlar ketamin (75mg/kg) + xylazine (10mg/kg) i.p uygulaması ile anestezi altında dekapite edilerek kalp dokuları çıkarıldı. Daha sonra dokular % 10'luk formaldehit solüsyonunda tespit edildi, rutin histolojik takip serilerinden geçirilip parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığında kesitler alındı.

Elde edilen kesitler polilizinli lamlara alındı. Deparafinize edilen dokular dereceli alkol serilerinden geçirilip sitrat tampon solüsyonunda pH:6'da mikrodalga fırında (750W) 10 dakika kaynatıldı.

Kaynatma sonrası oda ısısında yaklaşık 20 dakika soğutmak için bekletilen dokular PBS (Phosphate Buffered Saline, P4417, Sigma-Aldrich, USA) ile 3x5 dakika yıkandıktan sonra endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için hidrojen peroksid blok solüsyonu ile 5 dakika inkübe edildi (Hydrogen Peroxide Block, TA-125-HP, Lab Vision Corporation, USA). PBS ile 3x5 dakika yıkanan dokulara zemin boyasını engellemek için 5 dakika Ultra V Block (TA-125-UB, Lab Vision Corporation, USA) solüsyonu uygulandıktan sonra 1/200 oranında dilue edilen Nesfatin primary antibody (Rabbit Nesfatin-1 primary antibody, H-003-22, Phoenix Pharmaceuticals, Inc., California, USA) ile 60 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildi. Dokular, primer antikor uygulanmasından sonra PBS ile 3x5 dakika yıkandıktan sonra sekonder antikor (biotinylated Goat Anti-Poliyvalent (anti-mouse / rabbit IgG), TP-125-BN, Lab Vision Corporation, USA) ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildi. Dokular, sekonder antikor uygulanmasından sonra PBS ile 3x5 dakika yıkayıp Streptavidin Peroxidase (TS-125-HR, Lab Vision Corporation, USA) ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildikten sonra PBS içerisine alındı. Dokulara 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) Substrate + AEC Chromogen (AEC Substrate, TA-015 ve HAS, AEC Chromogen, TA-002-HAC, Lab Vision Corporation, USA) solüsyonu damlatılıp ışık mikroskopunda görüntü sinyali alındıktan sonra eş zamanlı olarak PBS ile yıkamaya alındı. Mayer's hematoksilen ile zıt boyaması yapılan dokular PBS ve distile sudan geçirilerek uygun kapatma solüsyonu (Large Volume Vision Mount, TA-125-UG, Lab Vision Corporation, USA) ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Olympus BX 50 mikroskopunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. Pozitif kontrol için beyin dokusu kullanıldı. Negatif kontrol için beyin dokusunda primer antikor yerine PBS damlatıldı.

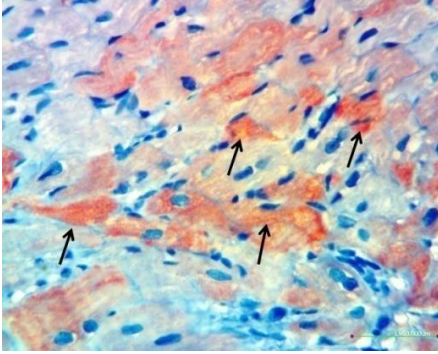
İmmünohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesinde boyanmanın yaygınlığı esas alındı. Sitoplazmik immün boyanmanın yaygınlığı 0'dan +3'e kadar sayı ile semi-kantitatif olarak skorlandı (0:Yok, +1:Az, +2:Orta, +3: Çok)

Elde edilen veriler ortalama \pm standart sapma olarak belirlendi. Tüm istatistiksel analizler SPSS version 21 programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arası değerlendirme One-way ANOVA, grup içi değerlendirmede ise paired t testi kullanıldı.

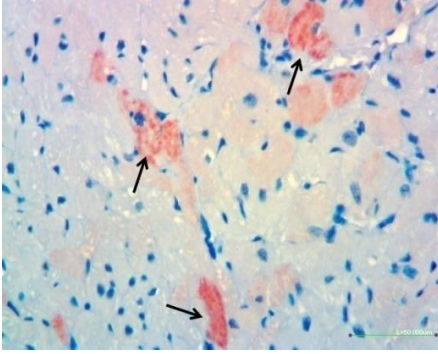
BULGULAR

Nesfatin-1 immünreaktivitesi, kontrol grubunda kalp dokusunda miyositlerde +3 yaygınlığında izlendi (Şekil 1). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında nesfatin-1 immünreaktivitesinde adriamisin grubu kalp dokusunda miyositlerde belirgin bir azalma vardı ve +1 yaygınlığında tespit edildi (Şekil 2). Pozitif kontrolde

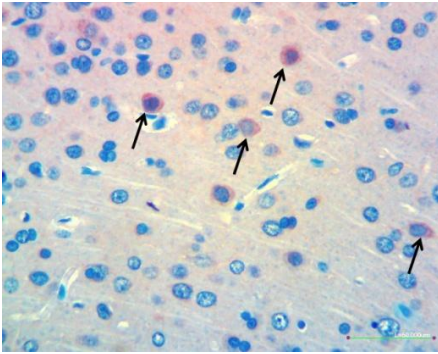
sıçan beyin dokusu kullanıldı. (Şekil 3). Negatif kontrolde nesfatin-1 immünreaktivitesi izlenmedi (Şekil 4) (Tablo 1).



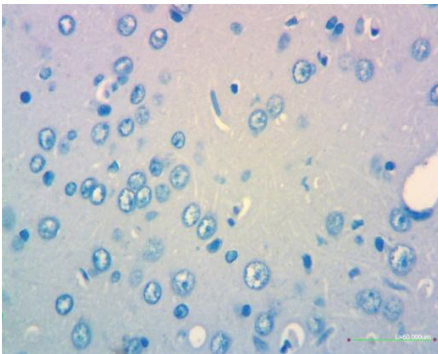
Şekil 1. Kontrol grubuna ait kalp dokusunda nesfatin-1 immünreaktivitesi (→).



Şekil 2. Adriamisin grubuna ait kalp dokusunda azalmış nesfatin-1 immünreaktivitesi (→).



Şekil 3. Nesfatin-1 pozitif kontrol. Beyin dokusunda nesfatin-1 immünreaktivitesi (→).



Şekil 4. Nesfatin-1 negatif kontrol. Beyin dokusu boyanma izlenmedi.

Tablo 1. Nesfatin immünreaktivitesi

	Nesfatin immünreaktivitesi
Kontrol	2,83±0,40
Adriamisin	1,16±0,40 ^a

Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında.

TARTIŞMA

Antitümör antibiyotiklerden olan adriamisin ve diğer antrasiklinler 1960' larda keşfedilmiş bir grup glikozidik antibiyotiklerdir (18). Adriamisin kullanımının ana yan etkisinin kalp yetmezliği ve kardiyomyopati olduğu bilinmektedir (5). Antrasiklin antibiyotiklerinin kardiyotoksik etkisini açıklamak için birkaç mekanizma tanımlanmıştır. En önemli ve olası gibi görünen mekanizma; kardiyomiyositlerde apoptozisin uyarılması ve kalp kasında adriamisin tarafından oksidatif stresin oluşturulması üzerine kurulmuştur (19). Çünkü kardiyak miyositlerdeki antioksidanlar, mitokondriyal harabiyetler ve lipit peroksidasyonuna neden olan reaktif oksijen türlerinden korunmak için yetersizdir (20).

Adriamisinin indirgenmesi sonucu çeşitli serbest radikaller oluşabilir. Bu radikaller, DNA kırıklarına, lipit peroksidasyonuna, proteinlerin ve DNA'nın alkolasyonuna sebep olur (21). Antrasiklinlerin DNA fonksiyonlarını inhibe etmeleri sadece araya girerek değil, tek bağlı kesikler ve DNA'nın bunu izleyen kırılmaları ile de gerçekleşir. DNA molekülüne yakın süperoksit gibi reaktif serbest radikallerin oluşması da bu tür hasardan sorumlu tutulabilir (22)

Antrasiklinler, kinon ve hidrokinon türevi ilaçlar hem peroksitleri hem de serbest radikalleri harekete geçirecek potansiyele sahiptir. Adriamisin toksitesinde serbest radikal oluşumunun rolü konusu, aktif bir araştırma konusudur (23). Serbest oksijen radikallerine (SOR) karşı hücrenin savunma mekanizması; glutatyon peroksidaz (GSH-Px), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), redükte glutatyon (GSH) enzimleri ve E vitamininden oluşmaktadır (24).

Kardiyomiyositlerin doğal antioksidan enzimler olan CAT ve SOD içeriklerinin düşük olması nedeniyle miyokardın serbest oksijen radikallerinin etkisine oldukça hassas olduğu da saptanmıştır. Katalaz, SOD ve GSH-Px aktiviteleri kalpte karaciğere oranla daha düşük bulunmuş, adriamisine bağlı serbest radikal etkinin neden sadece kardiyak dokuda olduğu, serbest radikallerde artma yanında; endojen antioksidan enzim aktivitelerindeki düşüklükle de izah edilmiştir (25).

İlk kez beyinde tanımlanmış olan nesfatin-1'in daha sonra gastrik mukoza (26), pankreas (27), adipositler (28), gonadlar (29), kan (30) ve kalp (17) gibi doku ve organlarda yüksek düzeyde tespit edildiği gösterilmiştir. Nesfatin-1 kan beyin bariyerini iki yönlü olarak geçer (31). Bu bilgi de periferik kaynaklı bu

peptidin beyni etkileyebileceğini ya da santral nesfatin-1 düzeyinin periferik etki gösterebileceğini düşündürmektedir. (32).

Yapılan diğer bir çalışmada kalbin kendisinin nesfatin-1 ve öncülü olan NUCB2 ürettiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada nesfatin-1'in miyokardiyal performansı direk olarak etkilediği ve kalp kasını iskemi reperfüzyon hasarından koruduğu bildirilmiştir (17). Hongyan ve ark. yaptıkları çalışmada akut miyokard infarktüsü hastalarda serum nesfatin-1 düzeyinin düşük olduğunu bildirmişlerdir (12).

Nesfatin-1 arkuat, paraventriküler ve supraoptik nükleuslarda pro-opiomelanokortin/Kokain, amfetamin duyarlı transkript, oksitosin ve vazopressin ile birlikte salınım gösterir. Bu bilgi bize birden çok peptidin birbirleri ile korele olduklarını göstermektedir. NUCB2 geni beslenme durumu ile anlamlı bir ilişki gösterir ki bu da nesfatin-1'in enerji dengesinde rolü olduğunu düşündürmektedir (26).

Enerji metabolizmasında etkili olan ve anoreksijenik etkili bir hormon olduğu bilinen nesfatin-1'in NF-kB-bağımlı inflamatuvar yanıtı ve kaspa-3 aracılı nöronal hücre apoptozisini inhibe edebileceği bildirilmiştir (33). Ayrıca bu peptidin nöropeptid Y/Agouti-bağımlı peptid (NPY/AgRP) nöronlarda hiperpolarizasyon oluşturmak üzere ATP duyarlı potasyum kanallarını etkilediği görülmektedir (34).Yapılan bir çalışmada sistemik uygulanan tek doz

nesfatinin subaraknoid kanamada antiinflamatuvar ve antiapoptotik etki gösterdiği bildirilmiştir (35).

Çalışmamızda adriamisin uygulanan grupta nesfatin-1 salınımı azalmıştı. Kalp kasındaki salınımını bilinmekte olan nesfatin-1 salınımındaki bu azalmanın nedeninin adriamisinin oluşturduğu miyosit hasarı/kaybına bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

Serbest oksijen radikallerinin üretimi veya oksidatif stres kardiyomyositlerde apoptozise, nekroza ve otofajite yol açmaktadır (10). İnsanlarda, tavşanlarda, farelerde ve sıçanlarda adriamisinin neden olduğu iki ana tip histopatolojik değişiklik rapor edilmiştir (36). Histopatolojik hasarın birinci tipi daha çok insanlarda kısmi olarak karakterize edilen ve gösterilen miyositlerdeki total kayıplardır. Adriamisinin toksik etkilerinden dolayı miyositlerde kayıp olsa bile adriamisin ile işlem görmüş hücrelerin çekirdeklerinde, mitokondri ve Z çizgileri doğal görünümünü korumaktadır. İkinci tip hasarı ise miyositlerin vakuoler dejenerasyonuna neden olan sarkotübüler sistemdeki şişme temsil etmektedir. Sarkoplazmik retikulum membranlarında peroksidatif hasara neden olan adriamisinin, bu şişkinliklerin sebebi olduğu varsayılmaktadır (37).

Sonuç olarak; sıçan kalp dokusunda nesfatin-1 salınımının olduğu, deneysel adriamisin uygulanmasının sıçan kalp dokusunda nesfatin-1 immünreaktivitesini azalttığı, bunun da adriamisine bağlı miyosit hasarı ve/veya kaybına bağlı olabileceği kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Cui J, Li C, Guo W, et al. Direct comparison of two pegylated liposomal doxorubicin formulations: is AUC predictive for toxicity and efficacy. *J Control Release* 2007; 118: 204-15.
2. Yen HC, Oberley TD, Vichitbandha S, Ho YS, St Clair DK. The protective role of manganese superoxide dismutase against adriamycin-induced acute cardiac toxicity in transgenic mice. *J Clin Invest* 1996; 98: 1253-60.
3. Quiles JL, Huertas JR, Battino M, Mataix J, Ramirez-Tortosa MC. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology* 2002; 180: 79-95.
4. Drummond DC, Meyer O, Hong K, Kirpotin DB, Papahadjopoulos D. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacol Rev* 1999; 51: 691-743.
5. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 2004; 56: 185-229.
6. Wang G, Zhang J, Liu L, Sharma S, Dong Q. Quercetin potentiates doxorubicin mediated antitumor effects against liver cancer through p53/Bcl-x1. *PLoS ONE* 2012; 7: 5176.
7. Kumar D, Kirshenbaum LA, Li T, Danelisen I, Singal PK. Apoptosis in adriamycin cardiomyopathy and its modulation by probucol. *Antioxid Redox Signal* 2001; 3: 135-45.
8. Olson RD, Mushlin PS. Doxorubicin cardiotoxicity, analysis of prevailing hypothesis. *FASEB J* 1990; 4: 3076-86.
9. Rabelo E, DE Angelis K, Bock P, et al. Baroreflex sensitivity and oxidative stress in adriamycin induced heart failure. *Hypertension* 2001; 38: 576-80.
10. Zhang YW, Shi J, Li YJ, Wei L. Cardiomyocyte death in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2009; 57: 435-45.
11. Mantawy EM, El-Bakly WM, Esmat A, Badr AM, El-Demerdash E. Chrysin alleviates acute doxorubicin cardiotoxicity in rats via suppression of oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Eur J Pharmacol* 2014; 728: 107-18.
12. Dai H, Li X, He T, et al. Decreased plasma nesfatin-1 levels in patients with acute myocardial infarction. *Peptides* 2013; 46: 167-71.
13. Oh-I S, Shimizu H, Satoh T, et al. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature* 2006; 443: 709-12.
14. Su Y, Zhang J, Tang Y, Bi F, Liu JN. The novel function of nesfatin-1: anti-hyperglycemia. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391: 1039-42.

15. Elmquist JK, Coppari R, Balthasar N, Ichinose M, Lowell BB. Identifying hypothalamic pathways controlling food intake, body weight, and glucose homeostasis. *J Comp Neurol* 2005; 493: 63-71.
16. Mimeo A, Smith PM, Ferguson AV. Nesfatin-1 influences the excitability of neurons in the nucleus of the solitary tract and regulates cardiovascular function. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2012; 302: 1297-304.
17. Angelone T, Filice E, Pasqua T, et al. Nesfatin-1 as a novel cardiac peptide: identification, functional characterization, and protection against ischemia/reperfusion injury. *Cell Mol Life Sci* 2013; 7: 495-509.
18. Liu X. Protection of Pifithrin- α and Melatonin Against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity, Doctor's Degree Thesis, East Tennessee State University Biomedical Science, United States 2003.
19. Childs AC, Phaneuf SL, Dirks AJ, Phillips T, Leeuweburgh C. Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2:Bax ratio. *Cancer Res* 2002; 62: 4592-8.
20. Seifert CF, Nesser ME, Thompson DF. Dexrazoxane in the prevention of doxorubicin induced cardiotoxicity. *Ann Pharmacother* 1994; 28: 1063-72.
21. Chachoua A, Hoschster H, Muggia FM. Doxorubicin. In Droz JP, Cvitkovic E, Armand JP, and Khoury S. (eds), *Handbook of Chemotherapy in Clinical Oncology*. Rhône-Poulenc, Houston, 1988; 125-7.
22. Tritton TR. Cell surface actions of adriamycin. *Pharmac Ther* 1991; 49: 293-309.
23. Cummings J, Anderson L, Willmott N, Smyth JF. The molecular pharmacology of doxorubicin in vivo. *Eur J Cancer* 1991; 27: 532-5.
24. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev* 2012; 70: 257-65.
25. Myers C. The role of iron in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Semin Oncol* 1998; 25: 10-4.
26. Stengel A, Goebel M, Yakubov I, et al. Identification and characterization of nesfatin-1 immunoreactivity in endocrine celltypes of the rat gastric oxyntic mucosa. *Endocrinology* 2009; 150: 232-8.
27. Gonzalez R, Tiwari A, Unniappan S. Pancreatic cells colocalize insulin and nesfatin immunoreactivity in rodents. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 381: 643-8.
28. Ramanjaneya M, Chen J, Brown JE, et al. Identification of nesfatin-1 in human and murine adipose tissue: a novel depot-specific adipokine with increased levels in obesity. *Endocrinology* 2010; 151: 3169-80.
29. Garcia-Galiano D, Pineda R, Ilhan T, et al. Cellular distribution, regulated expression, and functional role of the anorexigenic peptide, NUCB2/nesfatin-1, in the testis. *Endocrinology* 2012; 153: 1959-71.
30. Tsuchiya T, Shimizu H, Yamada M, et al. Fasting concentrations of Nesfatin-1 are negatively correlated with body mass index in non obese males. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2010; 73: 484-90.
31. Price TO, Samson WK, Niehoff ML, Banks WA. Permeability of the blood-brain barrier to a novel satiety molecule nesfatin-1. *Peptides* 2007; 28: 2372-81.
32. Brailoiu GC, Dun SL, Brailoiu E, et al. Nesfatin-1: distribution and interaction with a G protein-coupled receptor in the rat brain. *Endocrinology* 2007; 148: 5088-94.
33. Tang CH, Fu XJ, Xu XL, Wei XJ, Pan HS. The anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of nesfatin-1 in the traumatic rat brain. *Peptides* 2012; 36: 39-45.
34. Palasz A, Krzystanek M, Worthington J, et al. Nesfatin-1, a unique regulatory neuropeptide of the brain. *Neuropeptides* 2012; 46: 105-12.
35. Özsavci D, Ersahin M, Sener A, et al. The novel function of nesfatin-1 as an anti-inflammatory and antiapoptotic peptide in subarachnoid hemorrhage-induced oxidative brain damage in rats. *Neurosurgery* 2011; 68: 1699-708.
36. Danelisen I. Metabolism of Retinol in Adriamycin-Induced Cardiomyopathy. Master's Degree Thesis, University of Manitoba, Department of Physiology Faculty of Medicine, Canada, 2000.
37. Singal PK, Deally CM, Weinberg LE. Subcellular effects of adriamycin in the heart: a concise review. *J Mol Cell Cardiol* 1987; 19: 817-28.