

Erken Dönemdeki Doksorubisin-Fluoksetin Kardiyotoksitesinde Biyokimyasal Belirteçler

Biochemical Markers in Early Period Doxorubicin-Fluoxetine Cardiotoxicity *Doksorubisin-fluoksetin kardiyotoksitesinde*

Gül Özbey* Selvinaz Dalaklıoğlu* Sebahat Özdem** Gülbahar Uzun**
Esin Tatlı* Nuray Erin*

* Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Antalya, Türkiye

** Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Antalya, Türkiye

Başvuru Tarihi: 09 Ocak 2018

Kabul Tarihi: 29 Mart 2018

ÖZET

Amaç: Doksorubisin (DOXO) etkinliği yüksek ve sık reçete edilen bir antikanser antrasiklin ilaç olmasına karşın, kullanımı çoklu ilaç direnci ve doz-bağımlı kümülatif kardiyotoksitesite nedeniyle kısıtlanmaktadır. DOXO'nun yaygın kullanılan bir antidepresan olan fluoksetin (FLU) ile birlikte kullanımı, çoklu ilaç direncinin aşılması için geliştirilen tedavi stratejilerindedir. Bu çalışmada FLU-DOXO kombinasyonunun biyokimyasal kardiyotoksitesite belirteçleri üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Balb-c tür fareler 4 gruba ayrılarak 6 hafta boyunca tedavi edilmişlerdir: (1) kontrol (serum fizyolojik), (2) FLU (0.5 mg/kg/gün), (3) DOXO (kümülatif doz 12 mg/kg), (4) FLU (0.5 mg/kg/gün) ve DOXO (kümülatif doz 12 mg/kg). Tedavinin sonunda elde edilen serum örneklerinde hs-Troponin T, ALT, AST, LDH, kalp dokularında ise Total oksidan kapasite belirlenmiştir.

Bulgular: Sonuçlarımıza göre FLU-DOXO kombinasyonu serum yüksek duyarlılıklı Troponin T (hsTnT) düzeylerinde artışa neden olmuştur. DOXO uygulaması serumda aspartat aminotransferaz (AST) ve kardiyak dokuda total oksidan kapasite (TOS) düzeylerinde artışa neden olurken, serumda alanin aminotransferaz (ALT), laktat dehidrogenaz (LDH) ve kreatin kinaz-MB (CK-MB) düzeyleri değişmemiştir.

Sonuç: 0.5 mg/kg/gün FLU tedavisi ile, kümülatif 12 mg/kg DOXO'nun birlikte uygulanmasının, hsTnT ile belirlenebilen erken dönem kardiyotoksitesite oluşturabileceği düşünülmüştür.

Anahtar Sözcükler: Antrasiklinler; antidepresan ajanlar; istenmeyen etkiler

Yazışma adresi: Gül Özbey

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3616-0052>

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Antalya, Türkiye

e-mail: gulozbey@akdeniz.edu.tr

ABSTRACT

Aim: Doxorubicin (DOXO) is a highly effective and extensively prescribed anticancer anthracycline drug, however, its use is limited by multidrug resistance and dose-dependent cumulative cardiotoxicity. Administration of DOXO with widely used antidepressant fluoxetine (FLU) is one of the treatment strategies for multidrug resistance. In this study, we aimed the investigation of FLU-DOXO combination on biochemical cardiotoxicity markers.

Material and Method: Balb-c mice divided 4 group and treated 6 weeks: (1) control (serum physiologic), (2) FLU (0.5 mg/kg/day), (3) DOXO (cumulative dose 12 mg/kg), (4) FLU (0.5 mg/kg/day) and DOXO (cumulative dose 12 mg/kg).

Results: Regarding to our results, FLU-DOXO combination increased serum high sensitivity Troponin T (hsTnT) levels. While DOXO treatment increased serum aspartate aminotransferase (AST) and cardiac total oxidant capacity (TOS), serum alanine aminotransferase (ALT), lactate dehydrogenase (LDH) and creatine kinase-MB (CK-MB) levels were unchanged.

Conclusion: Administration of DOXO with FLU may cause early stage cardiotoxicity which is determined by hsTnT.

Key words: Anthracyclines; antidepressant agents; adverse effects

GİRİŞ

Radyoterapi ve kemoterapinin karsinomaların tedavisinde kullanılması ile hastalarda kür oranı önemli oranda artmakla birlikte, sağ kalan hastalarda kemoterapi ile oluşan kardiyotoksikite mortalite ve morbiditeyi arttırmaktadır (1). Kemoterapi ile ilişkili kardiyak disfonksiyon olarak da adlandırılan bu durum antrasiklin grubu kemoterapötiklerin kullanımı sırasında sıklıkla görülmekte ve antrasiklin kullanımını sınırlamaktadır (2, 3).

Doksorubisin (DOXO) Streptomyces peucetius adlı bakteri tarafından üretilen ve sitotoksik olarak ilk kez 1969 yılında kullanılmış antrasiklin türevi bir antibiyotiktir (4). Lösemi, lenfoma, birçok karsinoma ve sarkoma türünde yaygın olarak kullanılan DOXO (5), doz-bağımlı antitümöral etkiler oluşturan potent bir kemoterapötiktir (6). Bununla birlikte DOXO, küratif (yüksek) dozlarında ise kardiyomyopati (KMP) ve konjestif kalp yetmeliği (KKY) gibi ciddi kardiyotoksik etkilere neden olmaktadır (5, 7). DOXO'yla indüklenen KKY prevalansı 400 mg/m² için %5, 550 mg/m² için %26, 700 mg/m² için %48 olarak bildirilmiştir (8). DOXO kullanımının doz-bağımlı kardiyotoksikite nedeniyle sınırlandırılması, ilacın antitümöral etkinliğini düşürmeden kardiyotoksik etkilerinin azaltılmasına yönelik yeni tedavi stratejilerinin ve kardiyotoksikiteyi erken dönemde gösterecek

biyobelirteçlerin geliştirilmesi ile ilgili araştırmalara hız kazandırmıştır (3, 9, 10).

DOXO'nun oluşturduğu kardiyotoksikitenin azaltılmasına yönelik tedavi stratejilerinden bir tanesi de, hücre membranında bulunan p-glikoprotein (p-gp) adlı efluks proteininin fluoksetin (FLU) tarafından inhibe edilmesidir (11). Birçok kanser hücre dizisinde çoklu ilaç direnci fenotipinin artmış p-gp ekspresyonu ile korele olduğunun gözlemlenmesi p-gp inhibisyonu ile çoklu ilaç direncinin ortadan kaldırılabileceği hipotezini doğurmuştur (12). Bu çalışmalar sırasında p-gp inhibitörü olarak geliştirilen ilaçların yanı sıra, FLU'nun gibi klinikte kullanılmakta olan birçok antidepressanın p-gp'yi inhibe ederek çeşitli kanserlerin hücre dizilerinde kemosenstizör etki oluşturduğu gösterilmiştir (13).

İn vitro ve in vivo deney modellerinde FLU'nun p-gp inhibitörü özelliğinden yararlanılarak kemoterapi direncinin önlenmesinde kullanılabileceğini gösterilmiştir (11). Peer D. ve ark. tarafından yapılan bu çalışmada, FLU'nun kemoterapötiklerle (doksorubisin, mitomisin-C, vinblastin, paklitaksel) oluşan sitotoksikiteyi ilaca duyarlı ve dirençli 8 farklı hücre dizisinde (HT29, P388/WT, MCF-7, C-26, B16F10.9, D122, P388/ADR, MCF-7/ADR) 10-100 kat, ilaca dirençli fare modellerinde ise tümör yanıtlarını ve sağ kalımları 2-3 kat

arttırdığı gösterilmiştir (11). Başka bir çalışmada MCF-7/adr hücre dizileri ile oluşturulan insan ksenograft fare modelinde DOXO'nun FLU ile kombinasyonunun tam tümör regresyonu oluşturduğu ve DOXO'nun tek başına kullanımına göre daha etkili olduğu gösterilmiştir (14). Argov ve ark. tarafından yapılan bu çalışmada, FLU ile birlikte uygulandığında DOXO'nun sistemik dolaşımında daha uzun süre kaldığı ve dokulardaki konsantrasyonlarının daha yüksek düzeylerde olduğu gösterilmiştir. Ancak literatürde, FLU-DOXO kombinasyonunun kardiyotoksitesite ya da kardiyotoksitesite belirteçleri üzerindeki etkileri ile ilgili çalışmalara rastlanmamıştır.

Yapılan çalışmalarda, DOXO'nun reaktif oksijen radikallerini (ROS) artırarak myokard hasarına neden olduğu gösterilmiştir (15, 16). DOXO'un membranlarda oluşturduğu oksidatif hasarın ROS'ların (peroksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri gibi) artması sonucu kardiyomiyosit hücrelerinde apoptozisin indüklenmesine neden olduğu bildirilmiştir (17-19). Ek olarak, DOXO tarafından indüklenen kardiyotoksitesitede süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi antioksidan enzimlerle, ROS gibi oksidan sistemler arasındaki dengenin bozulduğu da bilinmektedir (20, 21).

Bu çalışmanın amacı, DOXO direncinin önlenmesi için önerilen FLU-DOXO kombinasyonunun kardiyotoksitesitenin biyokimyasal serum ve kardiyak dokudaki oksidatif stres belirteçleri üzerindeki etkilerinin araştırılmasıdır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney protokolü

Çalışma için Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulundan izin alınmıştır (AKHADYEK, 2013.07.02). Çalışmada 20-30 g ağırlığında, 6-8 haftalık, dişi, 57 adet balbc tür fare kullanılmıştır. Deney gruplarına ad libitum olarak standart diyet ve çeşme suyu verilmiştir. Fareler, 4 gruba ayrılarak 6 hafta

boyunca tedavi edilmiştir (n=4-9): (1) Kontrol grubu, serum fizyolojik (0.1 cc, i.p.); (2) FLU, fluoksetin (0.5 mg/kg/gün, 0.1 cc, i.p.); (3) DOXO, doksorubisin (3 mg/kg, 0.2 cc, i.p., 2 hafta boyunca haftada 2 kez, kümülatif doz 12 mg/kg); (4) FLU-DOXO, fluoksetin (0.5 mg/kg/gün, 0.1 cc, i.p.) ve doksorubisin (3 mg/kg, 0.2 cc, i.p., 2 hafta boyunca haftada 2 kez, kümülatif doz 12 mg/kg). 6. Haftanın sonunda ketamin/ksilazin anestezisi altında abdomen açılarak abdominal aortadan alınan kan örnekleri 10 dk, 1.800 g (3.000 RPM)'de santrifüj edilerek elde edilen serumlar analiz edilene kadar -20°C'de saklanmıştır. Daha sonra çıkartılan kalp dokuları, sıvı azot ile dondurulduktan sonra -80°C'de saklanmıştır.

Biyokimyasal Ölçümler

hs-Troponin T (yüksek duyarlılıklı Troponin T) düzeyleri serum örneklerinde ECLIA (Elektrokemilüminesans İmmünolojik Test) yöntemi ile Roche Elecsys 2100 cihazında ölçüldü (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Kullanılan kitin alt okuma limiti 3 pg/mL, üst okuma limiti 10.000 pg/mL olup, kite ait intra-assay varyasyon katsayısı (CV) % 0.9 (kontrol değeri: 300.00±2.70 pg/mL) ve inter-assay CV'si % 1.3 (kontrol değeri: 300.00±3.80 pg/mL) idi.

ALT, AST ve LDH düzeyleri, serum örneklerinde enzimatik spektrofotometrik yöntemle Roche Cobas 8000 cihazında ölçüldü (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). ALT, AST ve LDH kitlerine ait intra-assay ve inter-assay CV değerleri < 5 idi.

Total Oksidatif Stres (TOS) Erel tarafından geliştirilen spektrofotometrik yöntem ile kalp doku homojenatlarında ölçüldü (22).

Doku proteini Lowry metodu ile spektrofotometrik olarak Bio-Rad DC protein assay kiti kullanılarak kalp doku homojenatlarında ölçüldü.

İstatistiksel analizler; elde edilen veriler ortalama ± standart hata olarak verilmiş ve GraphPad Prism 5.0. programında analiz edilmiştir. Tüm grupların karşılaştırılmasında

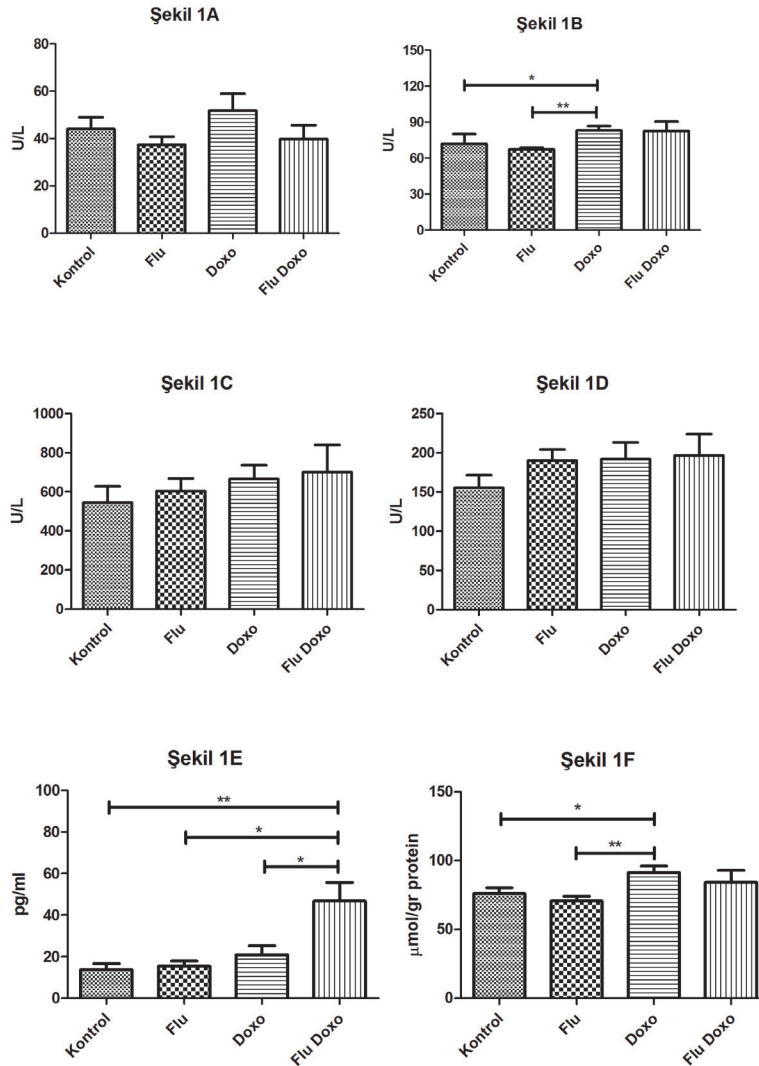
Kruskal-Wallis testi, grupların kendi içinde karşılaştırılmasında ise Mann Whitney testi ya da eşleştirilmemiş t-test kullanılmıştır. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Serumdaki kardiyotoksisite belirteçleri olarak CKMB, cTnT, ALT, AST ve LDH değerlendirilmiştir (Şekil 1). Tüm gruplar karşılaştırıldığında ALT, LDH ve CKMB düzeyleri için istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmezken, hsTnT düzeyleri ($p=0.041$) ve AST düzeylerinin ($p=0.011$) istatistiksel olarak

farklı olduğu gösterilmiştir. hsTnT düzeylerinin FLU-DOXO grubunda, Kontrol ($p=0.008$), FLU ($p=0.024$) ve DOXO ($p=0.049$) gruplarından daha yüksek olduğu görülmüştür. AST düzeylerinin ise DOXO grubunda, kontrol ($p=0.017$) ve FLU ($p=0.002$) grubundan daha yüksek olduğu gösterilmiştir.

Total oksidatif stres (TOS) düzeyleri karşılaştırıldığında tüm gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak farklı bulundu ($p=0.029$). TOS kapasitesinin DOXO grubunda kontrol grubundan ($p=0.014$) ve FLU ($p=0.003$) grubundan daha yüksek olduğu gösterildi (Şekil 1).



Şekil 1. Biyokimyasal kardiyotoksisite belirteçlerinin karşılaştırılması. Serum ALT düzeyleri, Şekil 1A; Serum AST düzeyleri, Şekil 1B; Serum LDH düzeyleri, Şekil 1C; Serum CKMB düzeyleri, Şekil 1D; Serum hsTnT düzeyleri, Şekil 1E; kardiyak dokuda TOS düzeyleri, Şekil 1F. Flu, fluoksetin; Doxo, doksorubisin; Flu-Doxo, fluoksetin-doksorubisin kombinasyonu. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

TARTIŞMA

Birçok kanser türünde ilk seçenek kemoterapötik olarak önerilen DOXO'nun neden olduğu doz bağımlı kardiyotoksisite ilacın kullanımını sınırlamaktadır. Tekrarlayan DOXO uygulamaları sırasında oluşabilen çoklu ilaç direncinin aşılmasını sağlayarak kümülatif DOXO dozunun ve dolayısıyla kardiyotoksisitenin azaltılmasına yönelik tedavi stratejilerinden bir tanesi olarak görülen FLU-DOXO kombinasyonunun, myokard hücre membranında DOXO efluksunu (dışa atım) inhibe ederek kardiyotoksisiteyi artırması da olasıdır. Bu çalışmada FLU uygulamasının, serum ve kardiyak dokudaki kardiyotoksisite belirteçleri üzerinde DOXO ile oluşan artışlar üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Serum ALT, LDH ve CKMB düzeylerinin DOX, FLU ve FLU-DOXO uygulamaları ile değişmediği görülmüştür. Serum AST düzeyinin ise FLU tedavisi ile değişmediği, DOXO ve FLU-DOXO uygulamaları ile arttığı görülmüştür. Serum hsTnT düzeylerinin ise DOXO tedavisi ile artarken, FLU-DOXO tedavisi ile daha fazla arttığı, FLU tedavisi ile ise değişmediği gösterilmiştir. DOXO'nun oluşturduğu kardiyotoksisite ile ilgili yayınlara bakıldığında, serum hsTnT düzeylerinin AST, ALT, LDH ve CKMB düzeylerine göre kardiyotoksisite açısından daha spesifik bir belirteç olarak kabul edilmektedir (23). Ek olarak kardiyotoksistide serum AST düzeylerinin, serum ALT, LDH ve CKMB düzeylerinden daha fazla arttığı görülmüştür (24, 25). Literatürdeki bilgilerle karşılaştırıldığında bu çalışmanın sonuçları, kümülatif olarak 12 mg/kg dozda DOXO tedavisiyle oluşabilen olası kardiyotoksisitenin, 6 hafta boyunca 0.5 mg/kg/gün FLU eklenmesiyle artabileceğini ve kardiyotoksisitenin belirlenmesinde serum hsTnT düzeylerinin en spesifik belirteç olduğunu göstermektedir. Ayrıca bulgularımız, serum hsTnT ve AST düzeylerinin erken dönemdeki kardiyotoksisitenin belirlenmesinde kullanılabileceğini önermektedir.

Bu çalışmada kardiyak dokudaki TOS kapasitesi ile serum AST düzeylerinin kontrol ve

FLU tedavisi ile kıyaslandığında; DOXO uygulaması ile arttığı, FLU-DOXO uygulaması ile değişmediği görülmüştür. FLU'nun anti-depresan etkilerinin yanında antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri olduğu daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (26). Deneysel inflamasyon modellerinde SSRI'ların antiinflamatuvar etkileri olduğu bildirilmiş olmasına karşın FLU'nun antioksidan ve oksidan sistemler üzerindeki etkileri ile ilgili literatürde sınırlı sayıda yayın bulunmaktadır (26). Bazı çalışmalar FLU'nun beyindeki antioksidan kapasiteyi arttırdığını savunurken (27, 28), FLU'nun antioksidan etkilerinin gösterilmediği çalışmalar da bulunmaktadır (29, 30). Literatürdeki çelişkili sonuçlar, çalışmalarda FLU'nun kullanılan dozlarının farklı olmasına bağlı olabilir. 0.5 mg/kg/gün FLU ile yaptığımız bu çalışmada, DOXO tedavisi ile artan kardiyak dokudaki TOS kapasitesi ile serum AST düzeylerinin, FLU-DOXO tedavisi ile görülmemesi, FLU'nun oksidatif stres ve inflamasyon üzerindeki direkt etkilerine bağlı olabilir. Buna karşın DOXO ile indüklenen kardiyotoksisite sadece reaktif oksijen türlerinin artışı ile değil, topoizomerez-2 β enzim inhibisyonu, poli-ADP-riboz polimeraz inhibisyonu ya da aktivasyonunda artma nedeniyle de oluşabilir (31). Bu nedenle kardiyak doku TOS kapasitesi ile serum AST düzeyleri oksidatif strese bağlı oluşabilecek kardiyak hasarı gösterirken, kardiyak dokuda yer alan ve myokard nekrozu sırasında sistemik dolaşıma salınan hsTnT ise tüm nedenlere bağlı DOXO kardiyotoksitesini gösteriyor olabilir.

Sonuç olarak, bu çalışmada 6 hafta 0.5 mg/kg/gün FLU tedavisi ile, kümülatif 12 mg/kg DOXO'nun birlikte uygulanması ile ortaya çıkan kardiyotoksisitenin erken dönemde hsTnT ile belirlenebileceği ve bu parametrenin klinikte kardiyak dokudaki olası hasarı göstermek için kullanılabilirliği düşünülmüştür. Bu çalışmadan elde edilen bulguların, apoptozis belirteçlerinin de dahil edildiği, daha yüksek dozda FLU ve DOXO tedavisinin uygulandığı ileriki çalışmalarla birlikte yorumlanması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Schultz PN, Beck ML, Stava C, Vassilopoulou-Sellin R. Health profiles in 5836 long-term cancer survivors. *Int J Cancer* 2003;104(4):488-95.
2. Brana I, Taberero J. Cardiotoxicity. *Ann Oncol* 2010;21 Suppl 7:vii173-9.
3. Srikanthan K, Klug R, Tirona M, Thompson E, Visweshwar H, Puri N, et al. Creating a Biomarker Panel for Early Detection of Chemotherapy Related Cardiac Dysfunction in Breast Cancer Patients. *J Clin Exp Cardiol* 2017;8(3):pii 507.
4. Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, Grein A, Orezzi P, Pol C, et al. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peuceetius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioeng* 1969;11(6):1101-10.
5. Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol* 2013;65(2):157-70.
6. Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, Janssens S, Crijns HJ, Moens AL. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J Mol Cell Cardiol* 2012;52(6):1213-25.
7. Guenancia C, Li N, Hachet O, Rigal E, Cottin Y, Dutartre P, et al. Paradoxically, iron overload does not potentiate doxorubicin-induced cardiotoxicity in vitro in cardiomyocytes and in vivo in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2015;284(2):152-62.
8. Swain SM, Whaley FS, Ewer MS. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials. *Cancer* 2003;97(11):2869-79.
9. Ma Y, Yang L, Ma J, Lu L, Wang X, Ren J, et al. Rutin attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity via regulating autophagy and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2017;863(8):1904-11.
10. Rigaud VO, Ferreira LR, Ayub-Ferreira SM, Avila MS, Brandao SM, Cruz FD, et al. Circulating miR-1 as a potential biomarker of doxorubicin-induced cardiotoxicity in breast cancer patients. *Oncotarget* 2016;8(4):6994-7002.
11. Peer D, Dekel Y, Melikhov D, Margalit R. Fluoxetine inhibits multidrug resistance extrusion pumps and enhances responses to chemotherapy in syngeneic and in human xenograft mouse tumor models. *Cancer Res* 2004;64(20):7562-9.
12. Eckford PD, Sharom FJ. ABC efflux pump-based resistance to chemotherapy drugs. *Chem Rev* 2009;109(7):2989-3011.
13. Weiss J, Dormann SM, Martin-Facklam M, Kerpen CJ, Ketabi-Kiyavash N, Haefeli WE. Inhibition of P-glycoprotein by newer antidepressants. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;305(1):197-204.
14. Argov M, Kashi R, Peer D, Margalit R. Treatment of resistant human colon cancer xenografts by a fluoxetine-doxorubicin combination enhances therapeutic responses comparable to an aggressive bevacizumab regimen. *Cancer Lett* 2009;274(1):118-25.
15. Venditti P, Balestrieri M, De Leo T, Di Meo S. Free radical involvement in doxorubicin-induced electrophysiological alterations in rat papillary muscle fibres. *Cardiovasc Res* 1998;38(3):695-702.
16. Olson RD, Mushlin PS. Doxorubicin cardiotoxicity: analysis of prevailing hypotheses. *FASEB J* 1990;4(13):3076-86.
17. Sawyer DB, Fukazawa R, Arstall MA, Kelly RA. Daunorubicin-induced apoptosis in rat cardiac myocytes is inhibited by dexrazoxane. *Circ Res* 1999;84(3):257-65.
18. Riad A, Bien S, Gratz M, Escher F, Westermann D, Heimesaat MM, et al. Toll-like receptor-4 deficiency attenuates doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice. *Eur J Heart Fail* 2008;10(3):235-43.
19. Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, et al. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med* 1996;335(16):1182-9.
20. Yu TW, Anderson D. Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. *Mutat Res* 1997;379(2):201-10.
21. Doroshow JH. Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. *Cancer Res* 1983;43(2):460-72.
22. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem* 2004;37(2):112-9.
23. Kozinski M, Krintus M, Kubica J, Sypniewska G. High-sensitivity cardiac troponin assays: From improved analytical performance to enhanced risk stratification. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2017;54(3):143-72.
24. Ibrahim DM, Radwan RR, Abdel Fattah SM. Antioxidant and antiapoptotic effects of sea cucumber and valsartan against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: The role of low dose gamma irradiation. *J Photochem Photobiol B* 2017;170:70-8.
25. Bi QR, Hou JJ, Qi P, Ma CH, Feng RH, Yan BP, et al. TXNIP/TRX/NF-kappaB and MAPK/NF-kappaB pathways involved in the cardiotoxicity induced by Venenum Bufonis in rats. *Sci Rep* 2016;6:22759.
26. Caiaffo V, Oliveira BD, de Sa FB, Evencio Neto J. Anti-inflammatory, antiapoptotic, and antioxidant activity of fluoxetine. *Pharmacol Res Perspect* 2016;4(3):e00231.
27. Bilici M, Efe H, Koroglu MA, Uydu HA, Bekaroglu M, Deger O. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. *J Affect Disord* 2001;64(1):43-51.

28. Novio S, Nunez MJ, Amigo G, Freire-Garabal M. Effects of fluoxetine on the oxidative status of peripheral blood leucocytes of restraint-stressed mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2011; 109(5): 365-71.
29. Djordjevic J, Djordjevic A, Adzic M, Elakovic I, Matic G, Radojcic MB. Fluoxetine affects antioxidant system and promotes apoptotic signaling in Wistar rat liver. *Eur J Pharmacol* 2011;659(1):61-6.
30. Tsuboi H, Tatsumi A, Yamamoto K, Kobayashi F, Shimoi K, Kinae N. Possible connections among job stress, depressive symptoms, lipid modulation and antioxidants. *J Affect Disord* 2006;91(1):63-70.
31. Damiani RM, Moura DJ, Viau CM, Caceres RA, Henriques JA, Saffi J. Pathways of cardiac toxicity: comparison between chemotherapeutic drugs doxorubicin and mitoxantrone. *Archives of toxicology* 2016;90(9):2063-76.