

抗癌剤動注による動脈病変の発生機序に 関する形態学のおよび生化学的研究

岡 藤 龍 正

近畿大学医学部放射線医学教室

Morphological and biochemical studies on pathogenesis of vascular changes in transarterial infusion of anti-cancer drugs

Tatsumasa Okafuji

Department of Radiology, Kinki University School of Medicine, Osaka, Japan

ABSTRACT

To elucidate the pathogenesis of vascular changes caused by transarterial infusion of anti-cancer drugs, the rat hepatic artery and mesenteric artery were examined morphologically and biochemically after cisplatin-lipiodol infusion. Severe degenerative changes were found in endothelial cells as well as medial smooth muscle cells in hepatic and mesenteric arteries. Such changes were milder in the artery in the group administered cisplatin-lipiodol and vitamin E (vitamin E group) than in the group administered cisplatin-lipiodol (cisplatin group). Superoxide dismutase, a superoxide anion scavenger, was higher in the vitamin E group than in the cisplatin group. Furthermore, Na/K-ATPase, a membrane-related enzyme, was also higher in the vitamin E group. These findings indicate that the cisplatin-induced arterial changes were caused by lipid-peroxidation due to free radicals and thus prevented by vitamin E administration.

Key words : transarterial infusion, cisplatin, artery, free radical, superoxide dismutase, vitamin E

緒 言

肝細胞癌ならびに転移性肝癌の治療法の一つとして、抗癌剤の肝動脈内注入（以下肝動注）療法は抗腫瘍効果に優れ、副作用が比較的軽いことから、現在臨床的に広く施行されており、

近年肝癌部に停滞性の高い油性造影剤リピオドールとの併用療法も行われている¹⁻⁵。特に各種の癌に強い制癌効果を有し、肝臓癌にも高い奏効率を示すとされているシスプラチンの微小粉末を作成しリピオドールと混和して投与することにより、すぐれた治療効果の得られることが

臨床的⁶⁻⁸ 及び実験的⁹⁻¹² に証明されている。

しかし、日常の臨床においては抗癌剤の肝動注回数の増加に伴い、肝動脈には内腔の狭小化や閉塞、動脈瘤等が発生し、このため肝動注の継続が困難となる事がしばしば経験されている。当院において平成2年1月から平成4年12月の3年間に肝動注療法が施行された剖検例25例の肝動脈病変を病理組織学的に検索したところ、全例に内膜の肥厚・変性、弾性線維の断裂や崩壊などがみられ、著しい内腔の狭小化が認められた (Fig. 1)。従って、この動脈病変の予防が、肝癌の治療成績を向上させるためには不可欠と考えられる。

しかし肝動注による動脈病変の pathogenesis やその予防に関する研究は臨床的にも実験的にも極めて少なく、基礎的な裏付けがないまま日常の治療が行われている。シスプラチンにも血管障害作用がみられることがすでに報告されているが、その発症機序は必ずしも明らかにされているとはいえない。

そこで原発性肝癌に対するシスプラチン肝動注療法の際にみられる動脈病変について、その pathogenesis の解明と、予防法に対する基礎的検討を行うために、実験的に作成したモデルを用いて、形態学的並びに生化学的検討を行った。

材料および方法

1. 材料

実験動物には、17週齢のオスの Jcl: Wistar ラット (体重 360~430 g) 80匹を使用した。ラットは温度 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ 、12時間照明 (照明時間は7:00~19:00) に制御された部屋で飼育した。また、飼料は飼育用固形飼料 (CE-2, 日本クレア株式会社, 東京) を用い、水道水と共に自由摂取させた。

抗癌剤シスプラチン (Cisplatin, Cis-diamminedichloroplatinum II) 原末は日本化薬株式会社 (東京) から供与を受けた。原末は粒子径が 75~500 μm であり、少量でラットの肝動

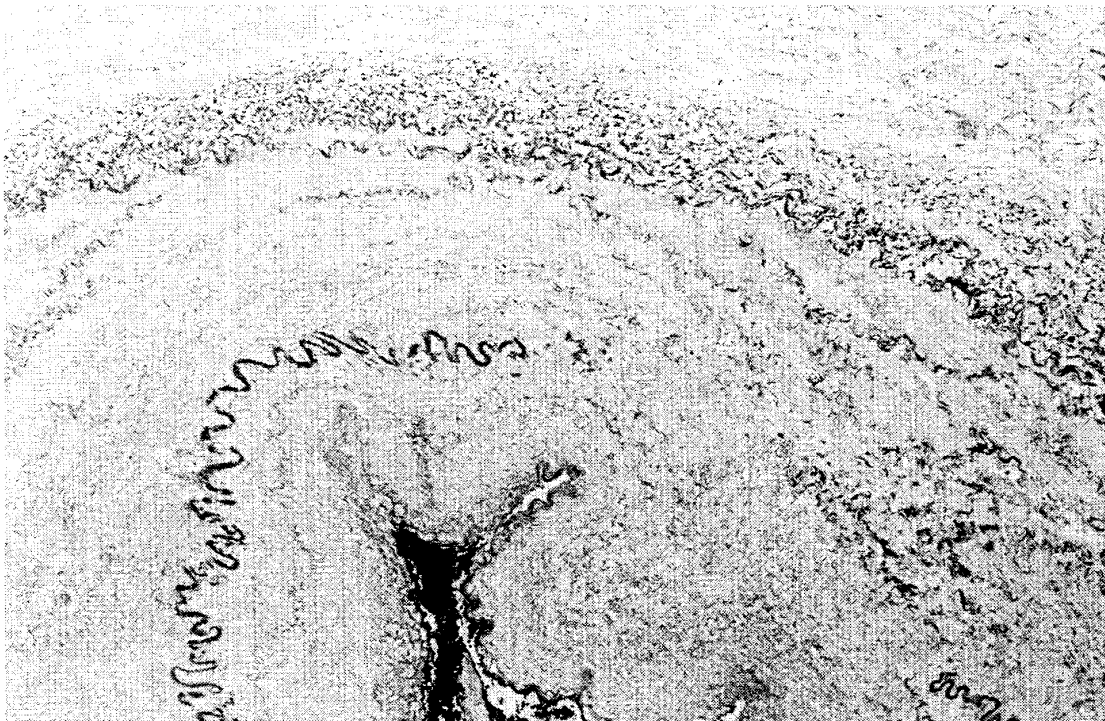


Fig. 1 Human hepatic artery after cisplatin-lipiodol injection (EV stain, $\times 87.5$)

Arterial lumen become very narrow because of marked intimal thickening. Internal elastic membrane was destructed and fragmented elastic fibers were scattered in the media.

脈を閉塞する危険性があるので、瑪瑙乳鉢で細かく粉碎し、最大径 20 μm になるように調製した。その粉末 1 mg を油性造影剤リピオドール (Lipiodol Ultra-fluide, Laboratoire Ge-lbe, France) 0.1 ml に混和し、超音波洗浄機 (SUW-150, 三洋電機株式会社, 東京) を用いて懸濁状態にし、調整後直ちに使用した。 α トコフェロール (ビタミンE) はエーザイ株式会社 (東京) から供与を受けた。その他の試薬は和光純薬, および SIGMA のいずれも分析用試薬を用いた。

2. 方法

2-1. カニューレーションによる動注

ネンブタール麻酔下に開腹し、胃十二指腸動脈内に約 25 G のテフロンチューブを総肝動脈あるいは上腸間膜動脈に向けて挿入した。15匹のラットを以下のように5匹ずつ3群に分け、カニューレより肝動脈内投与を行った。すなわち、リピオドール群: リピオドール 0.1 ml のみ, シスプラチン群: リピオドール 0.1 ml・シスプラチン 1.0 mg 懸濁液, ビタミンE群: リピオドール 0.1 ml・シスプラチン 1.0 mg・ビタミンE 1.25 mg 懸濁液である。また上腸間膜動脈へはそれぞれ2倍量を投与した。なお、上腸間膜動脈の生化学的検索のために生食群として生理食塩液 0.2 ml を投与した。用いたラットの匹数は Table 1 の通りである。

2-2. X線学的検索

シスプラチン・リピオドール懸濁液投与により、上腸間膜動脈に器質的病変が発生するか否かを検討するために薬剤投与4日後にネンブタール麻酔下に大動脈から造影剤 (5%硫酸バリウム・5%ゼラチン混合液) を注入した後、軟

X線撮影 (40 Kv, 3 mA, 15 sec) を行って、狭窄の有無を観察した。

2-3. 電顕による形態学的検索

投与4日後、ネンブタール麻酔下に開胸し、左心室より生理食塩液で灌流した後、2.5%グルタルアルデヒド溶液で灌流し、肝動脈あるいは上腸間膜動脈を固定した。これらの動脈を分離した後、1%オスミウム酸で固定後、エポキシに包埋した。1 μm の切片を作成して Toluidine blue で染色した後に光学顕微鏡で検索し、さらに超薄切片を作成して、透過型電子顕微鏡 (S-800, 日立製作所, 東京) で観察した。

2-4. 生化学的検索

投与4日後、ネンブタール麻酔下に上腸間膜動脈を摘出し、0.25 M sucrose-10 mM Tris buffer (pH 7.5) 中で氷冷下にホモジナイズした後、1万回転10分間で遠心分離した上清を用いて superoxide dismutase (SOD, Oyanagui 法)¹³, Na/K-ATPase (Lamers and Stinis 法)¹⁴ および 5'-nucleotidase (Song and Bodansky 法)¹⁵ の活性を測定した。酵素活性の比較には、まず ANOVA (one way analysis of variance) で4群間の比較を行った後、有意であれば個々の2群間の差を Student's t test により検定し、 $p < 0.05$ を有意とした。

結 果

1. 肝動脈の病変

Fig. 2~5 は肝動脈の病変を示す電顕写真である。肝動脈は典型的な筋型小動脈で、内腔側より一層の内皮細胞・内弾性板及び2~3層の平滑筋細胞が並列し、管腔を輪状にとりまいて

Table 1 Survival rate of the rat

Group	Total No. of rats administrated	No. of survival rats	Survival rate (%)
Saline	8	8	100
Lipiodol	6	6	100
Cisplatin	25	8	32
Vitamin E	7	6	85.7

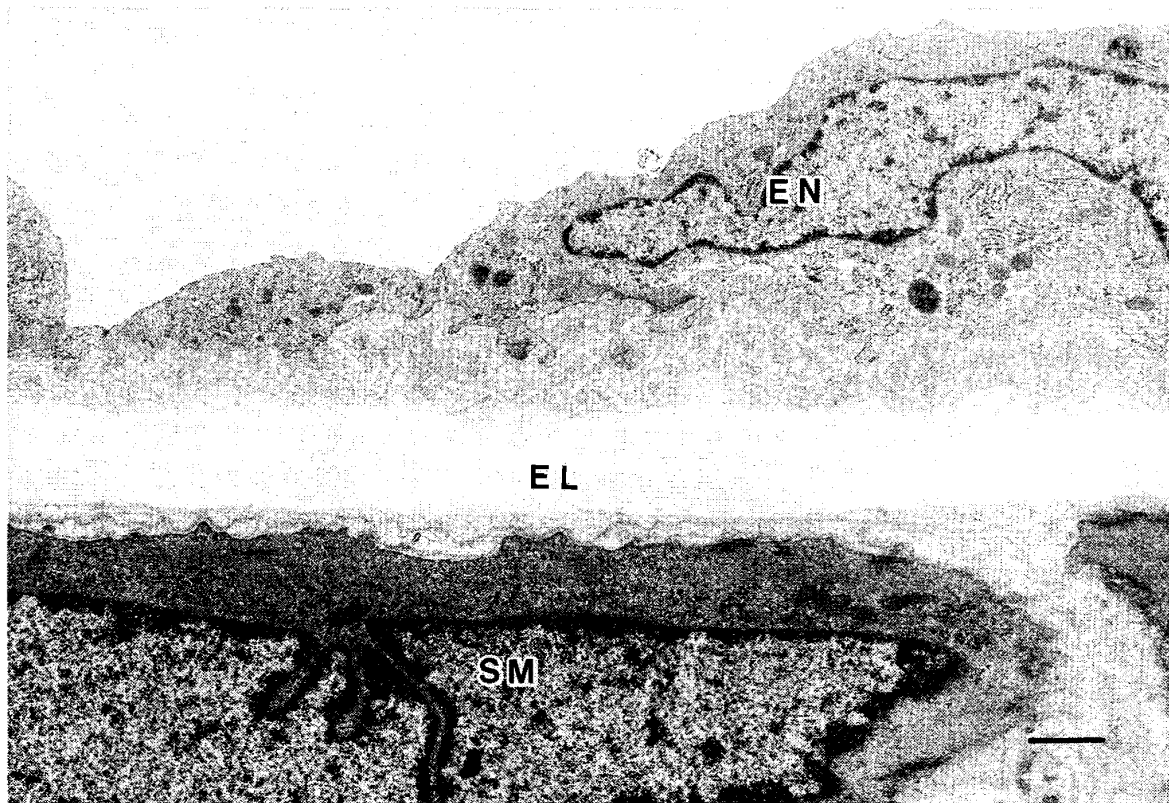


Fig. 2 Hepatic artery of control rat

No pathological findings are seen in the endothelial cells (EN) or medial smooth muscle cells (SM). Internal elastic membrane (EL) is well preserved. (Bar=1 μ)

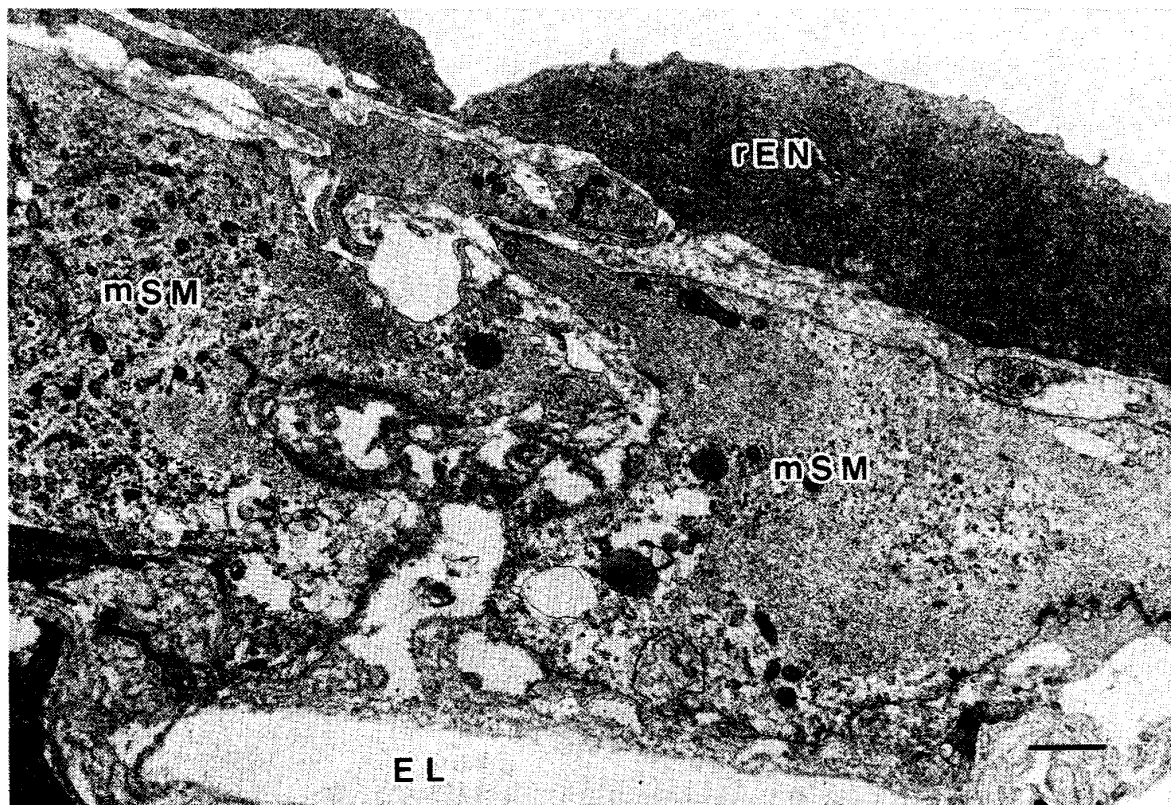


Fig. 3 Hepatic artery of cisplatin-administered rat

Endothelial cells were detached and regenerating cells (rEN) were observed on the surface of the intima. Marked thickening of intima was observed and irregular shaped-smooth muscle cells, so-called modified smooth muscle cells (mSM), were seen in intima. (Bar=1 μ)

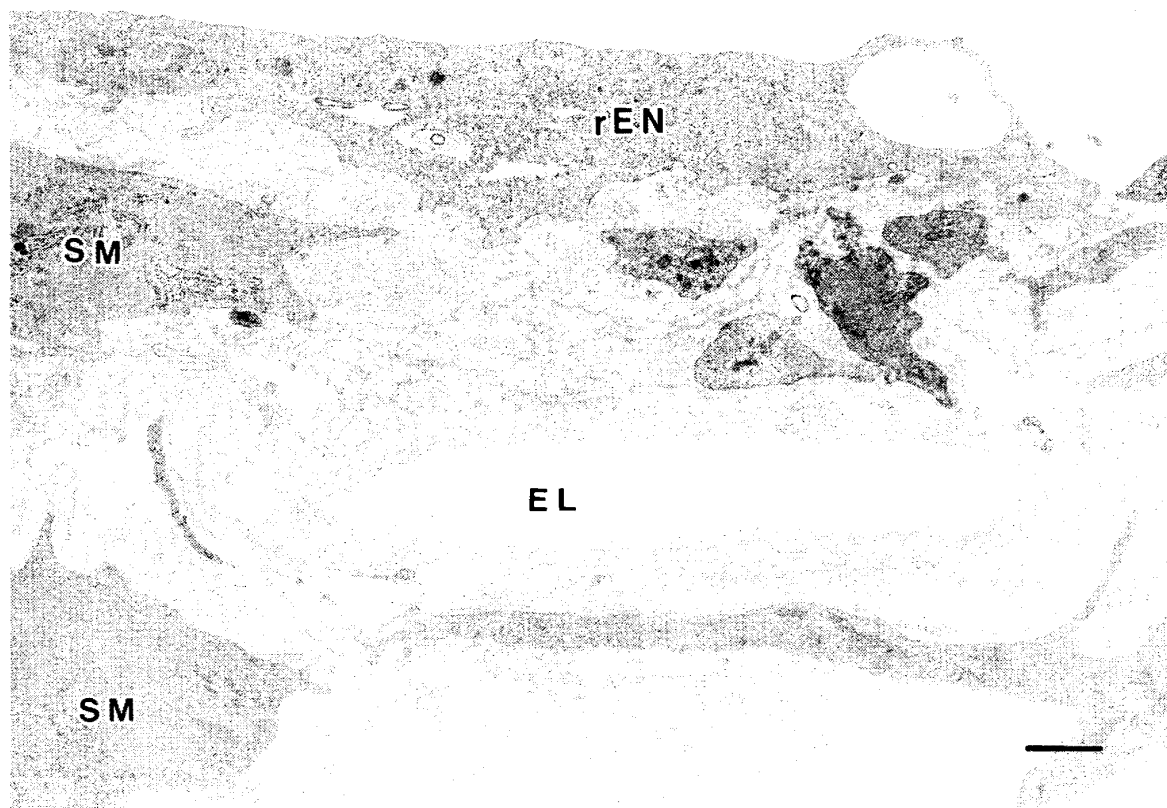


Fig. 4 Hepatic artery of cisplatin-treated rat

Marked degeneration of intima and media was obvious and internal elastic membrane (EL) was destroyed. (Bar=1 μ)

リピオドールのみを投与したラットの肝動脈では、Fig. 2 にみられるようにこれら3者の構造はいずれも良く保たれており、壁構造の破壊は認められなかった。

シスプラチン群では内皮細胞は広範囲に剝離消失し、一部には再生像が認められた。また、Fig. 3 にみられるように内膜内に幼若な平滑筋細胞と思われる不整形の細胞の増殖がみられ、内膜の著しい肥厚、内腔の狭小化が認められた。障害の最も高度のものでは Fig. 4 にみられるように、内皮細胞、平滑筋細胞共に著しく障害されており、壁構造の崩壊が著明であった。

一方、ビタミンEを併用した群では、Fig. 5 にみられるように内皮下層及び中膜に浮腫状の変化が認められたが、内皮細胞や平滑筋細胞には著変はみられず、シスプラチンによる細胞障害は明らかに抑制された。

2. 上腸間膜動脈の病変

2-1. 生存率

Table 1 は、各実験群におけるラットの生存率を示している。リピオドール単独投与群では投与1週間後でも死亡するものはみられなかったが、シスプラチン群では投与後早期に衰弱がみられ、4日後までに17例が死亡し、検索し得たラットは25例中8例であった。一方、これらにビタミンEを併用した群では衰弱するものは少なく、4日後までに1例のみが死亡した。

2-2. X線学的検索

上腸間膜動脈に大動脈から造影剤を注入すると、生食液 0.2 ml 動注したラットでは Fig. 6A のように上腸間膜動脈の末梢まで均一に造影され、径の不同は認められなかった。一方、シスプラチン・リピオドール懸濁液を動注したラットでは、Fig. 6B のようにほぼ全域に血管内腔の不整化、狭小化、けば立ち像が認められ、動脈病変の発生が推測された。

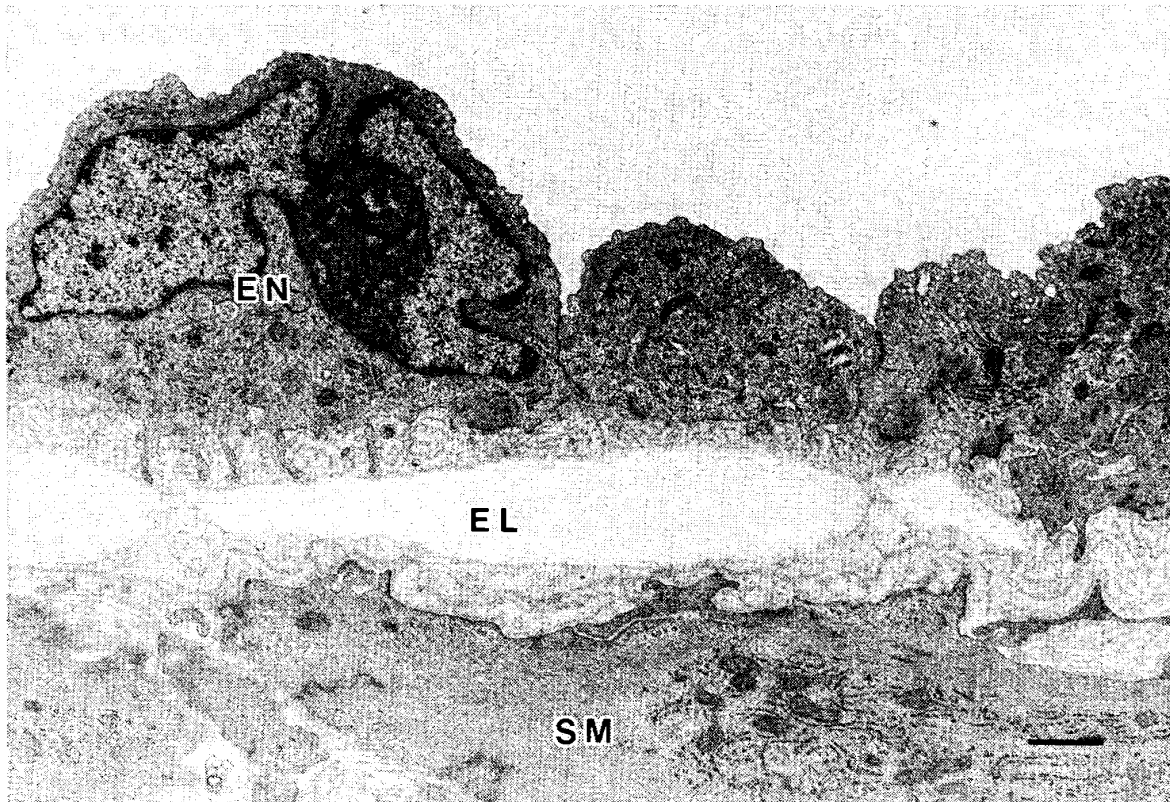


Fig. 5 Hepatic artery of tocopherol-treated rat

Slightly edematous changes were found in subendothelial space and around medial smooth muscle cells. However, endothelial cells (EN) and medial smooth muscle cells (SM) were well preserved. (Bar=1 μ)

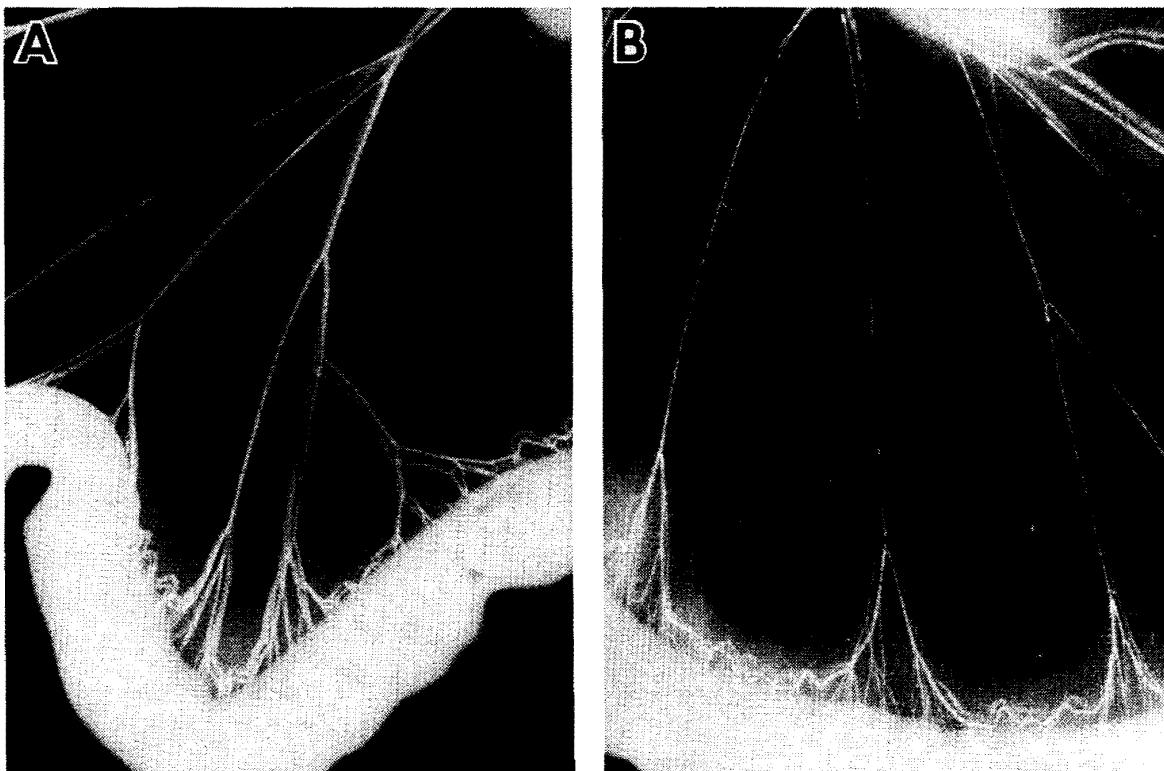


Fig. 6 X-ray photographs of mesenteric artery

A: control rat B: cisplatin-treated rat

Irregular narrowing was found in cisplatin-treated rat mesenteric artery.

2-3 電顕による形態学的検索

Fig. 7 は対照群であるリピオドールのみを投与したラットの上腸間膜動脈末梢部の電顕像である。一層の内皮細胞とその直下に内弾性板さらに平滑筋細胞が認められる。内皮細胞の一部に空胞の形成が認められたが、その他に異常を示す所見はなく、動脈壁の構造は良く保たれていた。

それに対し、シスプラチン群では、Fig. 8 にみられるように内皮細胞には著しい空胞の出現がみられ、また内皮下層は拡大し内弾性板との間は浮腫状を呈しており、所々不整な形を呈する幼若な平滑筋細胞が散見された。内弾性板は大きく弯曲して、径が不同となり、所々に断裂が認められた。平滑筋細胞は不整形を呈し、内弾性板の間隙に向う突起様構造が認められた。動脈壁の構造は著しくそこなわれているが、血小板の付着は認められなかった。

一方、ビタミンE群では、Fig. 9 にみられるように内皮細胞に多数の villi がみられ、また内皮下層は浮腫状を呈し、内弾性板にも平滑筋細胞の突起による破壊が認められたが、その程度はシスプラチン群に比べて明らかに軽微であり、動脈壁の構造はほぼ保たれていた。

2-4. 生化学的検索

Fig. 10 は代表的な superoxide anion の消去系である SOD 活性の比較を示している。生食液のみを投与した対照群に比べ、リピオドール群ではわずかに低値を示す傾向がみられたが有意の差は認められなかった。シスプラチン群では生食群に比べ SOD 活性は有意に低値であったが、ビタミンE群では生食群とほぼ同様の活性がみられ、シスプラチン群に比べ有意に高値を示した。

一方、細胞膜関連酵素である Na/K-ATPase は、Fig. 11 にみられるように、リピオドール

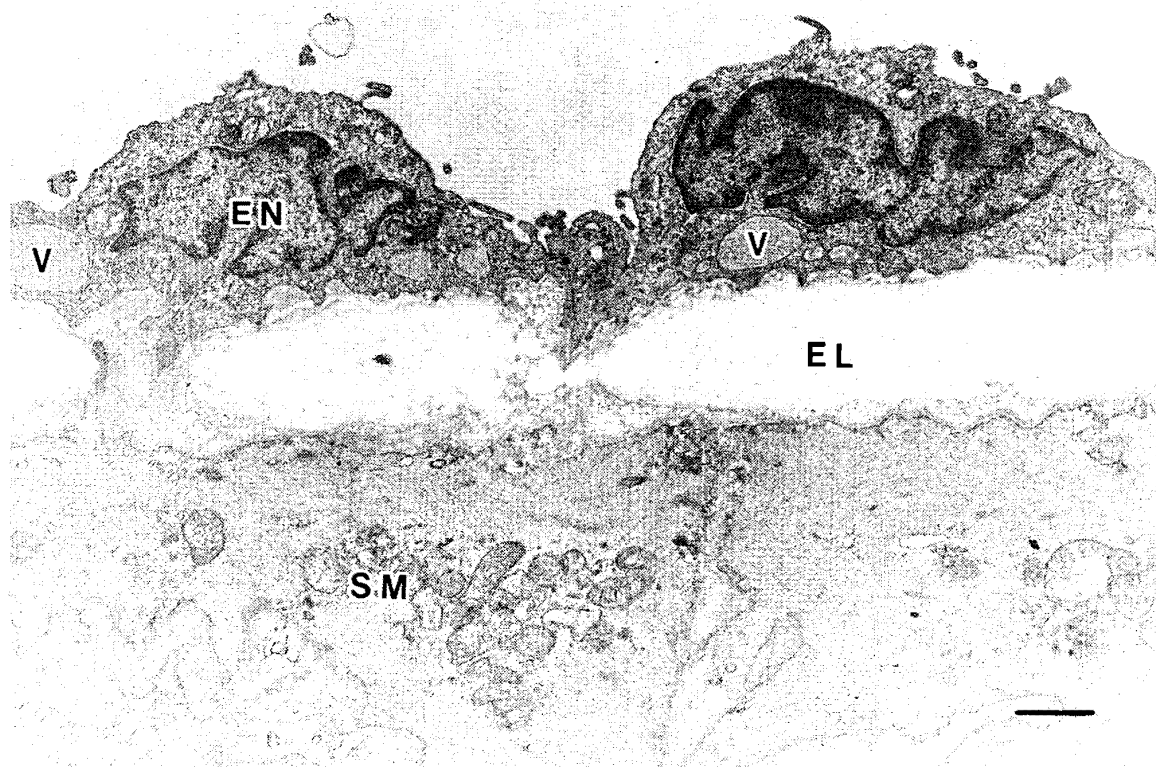


Fig. 7 Mesenteric artery of control rat

Mild vacuolic changes (V) were found in endothelial cells (EN). No pathological changes were observed in internal elastic membrane (EL) or medial smooth muscle cells (SM). (Bar=1 μ)

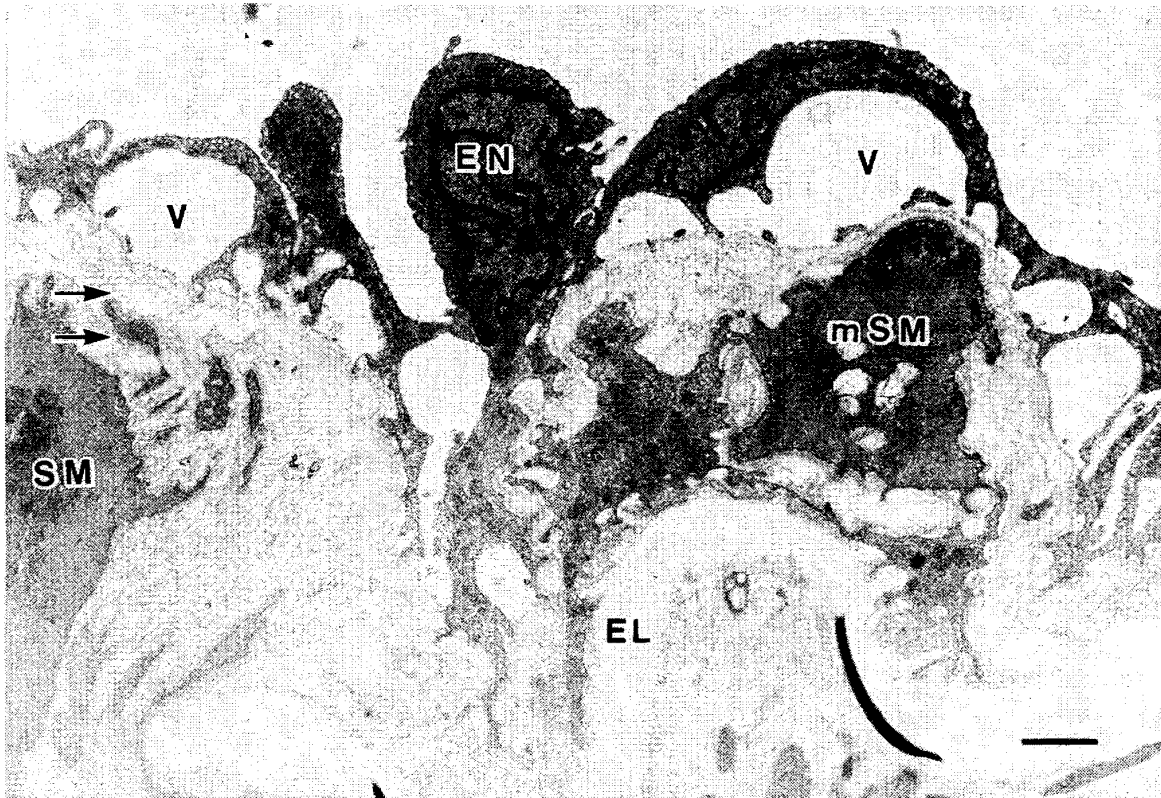


Fig. 8 Mesenteric artery of cisplatin-treated rat

Marked vacuolic changes (V) were seen in endothelial cells (EN). Internal elastic membrane (EL) were destroyed by smooth muscle cell (arrow) and modified smooth muscle cells (mSM) were observed in thickened intima. (Bar=1 μ)

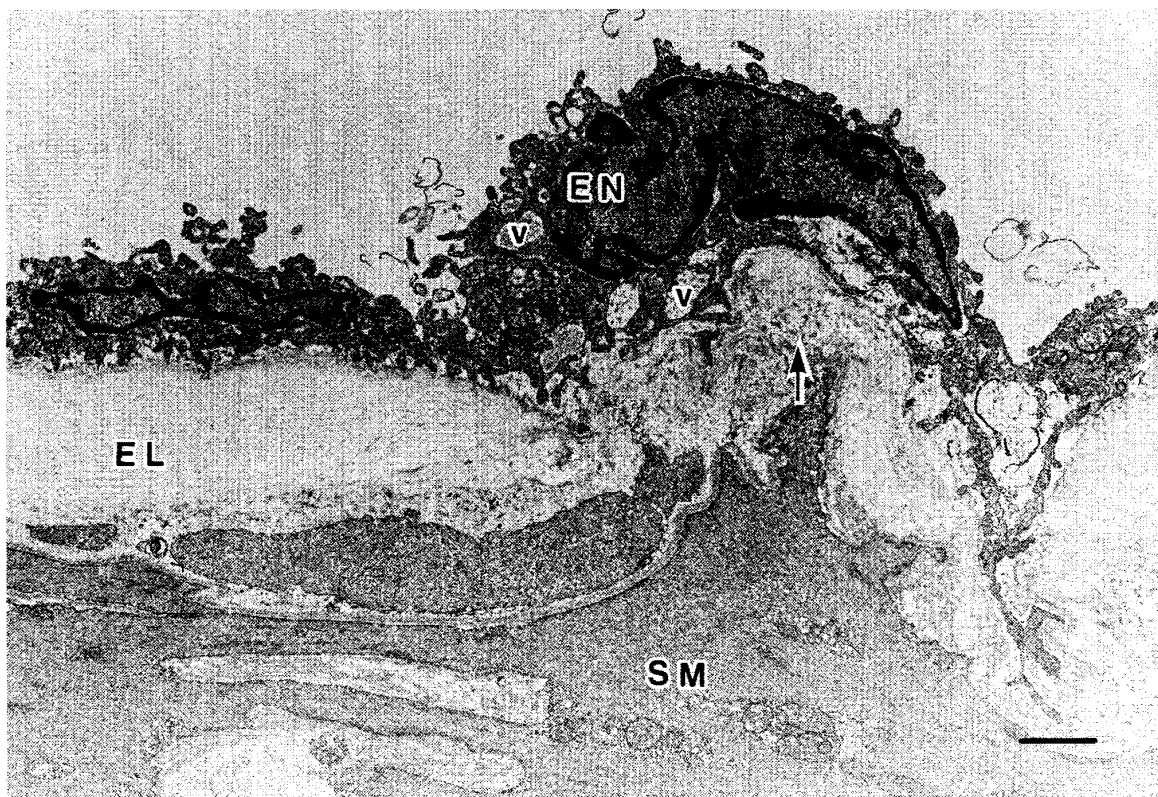


Fig. 9 Mesenteric artery of tocopherol treated-rat

Microvilli and vacuolic changes (V) were found in endothelial cells (EN). Mild degenerative changes were seen in internal elastic membrane (arrow). (Bar=1 μ)

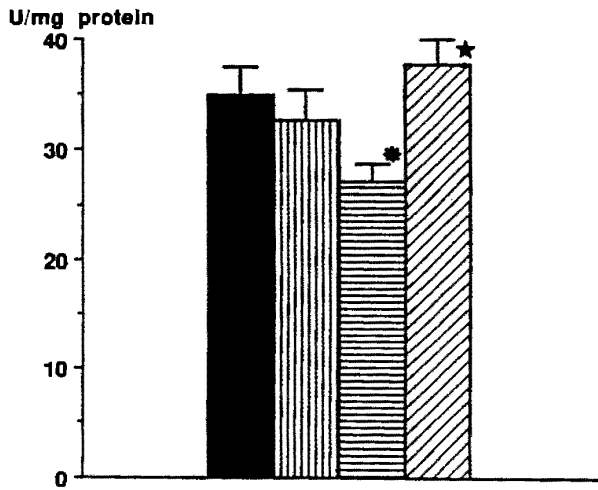


Fig. 10 Superoxide dismutase activity in mesenteric artery
 ■ Saline, ▨ Lipiodol, ▩ Cisplatin, ▪ Vitamin E Mean±SE,
 ANOVA: $P < 0.01$ among four groups.
 * $P < 0.01$ compared to Saline
 ★ $P < 0.05$ compared to Cisplatin

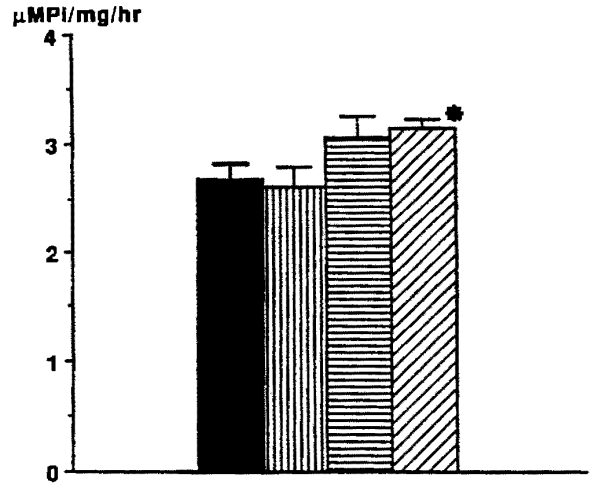


Fig. 12 5'-nucleotidase activity in mesenteric artery
 ■ Saline, ▨ Lipiodol, ▩ Cisplatin, ▪ Vitamin E Mean±SE,
 ANOVA: not significant
 * $P < 0.05$ compared to Saline

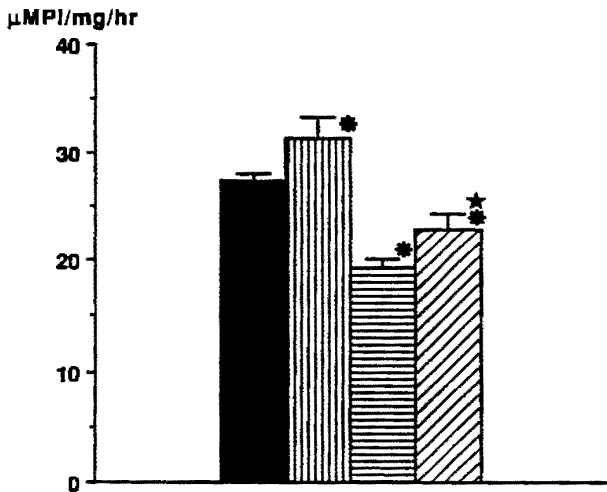


Fig. 11 Na/K-ATPase activity in mesenteric artery
 ■ Saline, ▨ Lipiodol, ▩ Cisplatin, ▪ Vitamin E Mean±SE,
 ANOVA: $P < 0.01$ among four groups.
 * $P < 0.05$ or more compared to Saline
 ★ $P < 0.05$ compared to Cisplatin

群では生食群よりやや高い活性を示したがシスプラチン群ではこれらに比べ著しく低い活性を示した。ビタミンE群では、シスプラチン群に比べ有意に高い活性が認められた。

しかし、同じ細胞膜関連酵素である 5'-nucleotidase は、Fig. 12 にみられるようにい

れもほぼ同様の値を示し、4群の間に有意の差は認められなかった。

考 察

抗癌剤動注療法に伴う動脈障害は臨床的にしばしば経験されており、シスプラチンに関してもいくつかの臨床報告がみられるが^{16,17}、その病因に関する実験的研究は極めて乏しい。上田ら^{18,19}は、家兎の耳介動脈や大腿動脈を用いて抗癌剤による動脈障害を検索し、内膜の浮腫状変化やそれにもとづく血栓の形成が狭索や閉塞に関与していることを明らかにした。しかしこのような内膜の障害の pathogenesis に関しては不明のまま残されている。今回ラットを用い、ヒトの場合と同様に肝動脈に抗癌剤シスプラチンを注入し、4日後の動脈壁の変化を検索したところ、著しい内皮細胞障害と内皮下の浮腫及び中膜平滑筋細胞の変性等が認められた。上述の上田らの研究とは、対象とした動脈や抗癌剤の種類と濃度などが異なるものの、内皮の障害に関してはほぼ一致した所見が認められた。

このようなシスプラチン・リピオドール投与による内皮障害の発生機序に関する研究は全く

なされていないが、同じ抗癌剤である *adriamycin* による心筋障害に関しては基礎的にも多くの研究がなされている²⁰⁻²³。Tappel ら²⁴が細胞障害に対するフリーラジカルの役割を明らかにして以来、数多くの実験的研究がなされ、*adriamycin* による心筋障害に関してもフリーラジカルによる細胞膜脂質過酸化が明らかにされた²⁵⁻²⁹。従って抗癌剤動注による動脈病変の発生にもフリーラジカルによる同様の機序が推測された。

そこで、このような障害を予防する目的でビタミンEを併用したところ、形態学的に障害の程度は明らかに軽度になり、内皮障害が抑制されることが認められた。ビタミンEは脂質過酸化に対する代表的な防御系であることから、シスプラチン投与による内皮の障害はフリーラジカルによる膜脂質の過酸化によることが示唆された。

そこでこの仮説を実証するために上腸間膜動脈を用いて形態学的、生化学的検索を行った。シスプラチン投与により上腸間膜動脈でも動脈病変の発生することがX線像でも、また形態学的にも認められ、大量の材料を得ることが困難な肝動脈の代わりに上腸間膜動脈を用いることが可能であることが実証された。またビタミンE投与による防御効果は上腸間膜動脈においても明らかで、投与群では著しい死亡率の減少及び病変の軽減が認められた。上述の上田らの研究ではステロイド投与により病変の抑制が認められることが報告されている。しかし、予備実験においてステロイドの効果を検討したところ、併用群は全例が4日以内に死亡し、抑制効果は認められなかった。このような結果の不一致の原因に関しては、使用したステロイドの種類や投与方法の相違によるものと思われるが詳細は不明である。

上述のようにシスプラチンによる動脈障害がフリーラジカルによることを明らかにするために、代表的な superoxide anion の scavenger である SOD 活性を測定すると、シスプラチン群では明らかに低下しており、フリーラジカル

の関与が強く示唆された。さらにビタミンE投与により SOD 活性の上昇がみられたことにより、フリーラジカルによる膜脂質の過酸化が防止されていることが推測された。すなわち、リピオドール・シスプラチン投与による動脈病変はシスプラチンにより生じるセミキノラジカルあるいはその他のフリーラジカルによる脂質過酸化によるもので、従って、代表的な抗酸化剤であるビタミンEにより動脈病変は防止されると考えられる。これらの結果は、代表的な細胞膜関連酵素である Na/K-ATPase 活性がシスプラチン群では著しく低値であるが、ビタミンE群ではその低下が抑制されていることから裏付けられた。

しかし、同じ細胞膜関連酵素である 5'-nucleotidase には差が認められなかったことから本実験条件では平滑筋細胞の細胞膜が完全に障害されているのではなく一部の機能はまだ保たれた状態にあることを示している。本実験の結果は、このような条件下では、ビタミンE群では細胞膜の機能がより正常に近い状態に保たれていることを示しており、従ってビタミンE群では細胞膜の機能が良く保たれており、形態学的に動脈壁の病変が軽度であることと良く一致している。しかし、シスプラチン投与により発生するラジカルの種類や細胞内における局在、またそれらによる脂質過酸化の機序に関しては不明であり、今後解明されるべき課題である。

結 論

1. ラット肝動脈におけるシスプラチン動注後の病変は、内皮及び中膜平滑筋細胞の変性であった。上腸間膜動脈においても同様であった。
2. ビタミンEの同時投与により、動脈病変の発生は明らかに抑制された。
3. シスプラチン投与により、上腸間膜動脈における SOD 活性は著しく低下し、また細胞膜関連酵素 Na/K-ATPase も同様に低下した。
4. これらの酵素活性の低下はビタミンE投与

により明らかに防止された。

5. 以上の結果よりシスプラチン動注による血管障害はフリーラジカルによる細胞膜脂質過酸化による事が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり御指導御校閲を賜りました近畿大学医学部放射線医学教室石田修教授に深甚なる謝意を表します。また本研究を遂行するにあたり、直接御指導、御助言を賜りました第1病理学教室 伊藤浩行教授に深謝致します。

本論文の要旨は、第238回日本医学放射線学会関西地方会（平成5年2月）において発表した。

文 献

1. 中熊健一朗, 田代征記, 上村邦紀, 今野俊光, 田中道直, 横山育三. 進行肝癌に対する肝動脈結紮効果増強の試み—特に結紮肝動脈内油性制癌剤注入について. 日独医報 1979; 24: 675-682.
2. Konno T, Maeda H, Iwai K, et al. Effect of arterial administration of high molecular weight anticancer agent SMANCS with lipid lymphographic agent on hepatoma; a preliminary report. Eur J Cancer Clin Oncol 1983; 19: 1053-1065.
3. Iwai K, Maeda H, Konno T. Use of oily contrast medium for selective drug targeting to tumor; Enhanced therapeutic effect and X-ray image. Cancer Res 1984; 44: 2115-2121.
4. Konno T, Maeda H, Iwai K, et al. Selective targeting of anticancer drug and simultaneous image enhancement in solid tumors by arterially administered lipid contrast medium. Cancer 1984; 54: 2367-2374.
5. 松井 修, 高島 力, 角谷真澄ら. 肝癌内 Lipiodol 集積及び停滞機序について—Lipiodol 単独動注例における検討—. 日本医放会誌 1987; 47: 1395-1404.
6. 淀野 啓, 樽沢 孝二, 兼平二郎ら. 原発性肝癌に対する シス プラチン・リピオドール (CDDP・LPD) 化学塞栓療法—主として肝細胞癌について—. 癌と化学療法 1986; 13: 3476-3482.
7. 柴田淳治, 木村俊一, 近沢秀人ら. リピオドール中シスプラチン懸濁液 (LPS) による肝細胞癌の動注化学療法. そのII—臨床的検討—. 日癌治 1988; 23: 2570-2759.
8. 高柳和弘, 山本匡介, 尾崎岩太ら. シスプラチン (ブリプラチン)・レシチン・リピオドール懸濁液による肝細胞癌の動注化学療法. 臨床と研究 1990; 67: 284-287.
9. 福島昭二, 岸本修一, 林 良樹ら. リピオドール中シスプラチン懸濁液 (LPS) による肝細胞癌の動注化学療法. そのI—LPS の調製と家兎肝癌モデルにおける肝動脈内投与による制癌効果—. 日癌治 1988; 23: 2743-2749.
10. 川上 朗. シスプラチン・リピオドール懸濁液の経肝動脈内投与のラット肝癌におよぼす影響. 近畿大医誌 1990; 15: 209-224.
11. 小野幸彦. シスプラチン・リピオドールの経肝動脈および経門脈 併用投与による ラット 肝癌への影響. 近畿大医誌 1991; 16: 203-217.
12. 小野幸彦, 吉岡寛康, 岡藤龍正ら. シスプラチン脂溶性誘導体の経肝動脈投与によるラット肝癌への影響. 日癌治 1992; 27: 49-58.
13. Oyanagui Y. Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. Anal Biochem 1984; 142: 290-296.
14. Lamers JMJ, Stinis JT. An electrogenic Na/Ca antiporter in addition to the Ca pump in cardiac sarcolemma. Biochim Biophys Acta 1981; 640: 521-534.
15. Song CS, Bodansky O. Subcellular localization and properties of 5'-nucleotidase in the rat liver. J Biol Chem 1967; 242: 694-699.
16. Doll DC, Ringenberg QS, Yarbrow JW. Vascular toxicity associated with antineoplastic agents. J Clin Oncol 1986; 4(9): 1405-1417.
17. Icli F, Karaoguz H, Dincol D. Severe vascular toxicity associated with cisplatin-based chemotherapy. Cancer 1993; 72(2): 587-593.
18. 上田英二, 佐古正雄, 廣田省三ら. 抗癌剤動注療法の血管系への影響に関する基礎的研究. 日本医放会誌 1989; 49: 1430-1432.
19. 上田英二, 佐古正雄, 廣田省三. 抗癌剤動注療法の動脈壁に及ぼす影響—実験的並びに臨床的検討—. 日本医放会誌 1992; 52: 960-970.
20. Olson HM, Capen CC. Subacute cardiotoxicity of adriamycin in the rat. Biochemical and ultrastructural investigations. Lab Invest 1977; 37: 386-394.
21. Doroshow JH, Locker GY, Myers CE. Experimental animal models of adriamycin cardiotoxicity. Cancer Treat Rep 1979; 63: 855-860.
22. Singal PK, Deally CMR, Weinberg LE. Subcellular effects of adriamycin in the heart. A concise review. J Mol Cell Cardiol 1987; 19:

- 817-828.
23. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* 1988 ; 63 : 381-389.
 24. Tappel AL. Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed Proc* 1973 ; 32 : 1870-1874.
 25. Myers CE, Macgure WP, Liss RH, Ifrim I, Grotzinger K, Young RC. Adriamycin. The role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. *Science* 1977 ; 197 : 165-167.
 26. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science* 1978 ; 201 : 875-880.
 27. Keizer HG, Pinedo HW, Schuurhuis GI, Joenje H. Doxorubicin (adriamycin) A critical review of free radicaldependent mechanisms of cardiotoxicity. *Pharmacol Ther* 1990 ; 47 : 219-231.
 28. Lee V, Randhawa AK, Singal PK. Adriamycin-induced myocardial dysfunction in vitro is mediated by free radicals. *Am J Physiol* 1991 ; 261 : H989-H995.
 29. Torii M, Ito H, Suzuki T. Lipid peroxidation and myocardial vulnerability in hypertrophied SHR myocardium. *Exp Mol Pathol* 1992 ; 57 : 29-38.