

## آپی ژنین باعث بهبود عملکرد قلبی و کاهش سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین در موش صحرایی نر

### می شود

مسعود فلاح رجب پور زارع<sup>۱</sup>، کامران رخشان<sup>۲</sup>، ناهید ابوطالب<sup>۳</sup>، فرناز نیکبخت<sup>۴</sup>، مرتضی بخشش<sup>۵</sup>، یاسر عزیزی<sup>۶\*</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

۲- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

۳- دانشیار، مرکز تحقیقات فیزیولوژی و گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

۴- دانشیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

۵- استادیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.

۶- استادیار، مرکز تحقیقات فیزیولوژی و گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

یافته / دوره بیستم / شماره ۱ / بهار ۹۷ / مسلسل ۷۵

### چکیده

دریافت مقاله: ۹۶/۱۱/۱

پذیرش مقاله: ۹۶/۱۱/۱۹

\* **مقدمه:** دوکسوروبیسین در درمان بدخیمی‌هایی شامل لنفوما، لوکمیا و سرطان پستان استفاده می‌شود. سمیت قلبی، عارضه جانبی اصلی این دارو است. آپی ژنین یک فلاونوئید دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و ضد توموری است. هدف این مطالعه بررسی اثرات آپی ژنین بر سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین است.

\* **مواد و روش‌ها:** ۶۰ سر موش صحرایی نر ویستار در ۶ گروه تقسیم شدند. سمیت قلبی با تزریق ۶ نوبت دوکسوروبیسین (۲ mg/kg, ip) در ۱۲ روز ایجاد گردید. گروه‌های تحت درمان همزمان با القای مدل سمیت قلبی، آپی ژنین را با دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۷۵ به صورت خوراکی به مدت ۱۲ روز دریافت کردند.

\* **یافته‌ها:** EF و FS در گروه آپی ژنین (۲۵ mg/kg) نسبت به گروه سمیت قلبی افزایش معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) و LDH، LVEDs و CK-MB در گروه آپی ژنین (۲۵ mg/kg) نسبت به گروه سمیت قلبی کاهش معنی‌دار نشان داد ( $P < 0.05$ ).

\* **بحث و نتیجه‌گیری:** آپی ژنین مانع افزایش LDH و CK-MB، جلوگیری از کاهش میزان EF و FS و بهبود تغییرات بافتی قلب شده و باعث کاهش آسیب ناشی از سمیت قلبی توسط دوکسوروبیسین می‌گردد.

\* **واژه‌های کلیدی:** آپی ژنین، دوکسوروبیسین، سمیت قلبی، اکوکاردیوگرافی، آنزیم‌های قلبی.

\*آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات و گروه فیزیولوژی.

پست الکترونیک: Azizi.y@iums.ac.ir

## مقدمه

دوکسوروبیسین دارویی از خانواده آنتراسایکلین‌ها است که در کنار دیگر داروهای عضو این خانواده مثل دونوروبیسین، ایپاروبیسین و ایداروبیسین در درمان طیف وسیعی از بدخیمی‌ها از قبیل لنفوما، لوکمیا و سرطان پستان مورد استفاده قرار می‌گیرد. برهمکنش این دارو با رشته‌های DNA که منجر به مهار ساخت ماکرومولکول‌ها، تولید گونه‌های واکنشگر اکسیژن و آسیب به DNA از طریق مهار فعالیت آنزیم توپوایزومراز II می‌شود، مکانیسم پیشنهادی اثرات ضد توموری این دارو است (۱-۳).

اثرات سمیتی دوکسوروبیسین از قبیل سرکوب فعالیت خونسازی، تهوع و استفراغ، آلوشیا و به ویژه عارضه جانبی اصلی این دارو یعنی سمیت قلبی باعث شده تا معضلی جدی در استفاده موفقیت‌آمیز این دارو در درمان سرطان‌ها ایجاد شود (۴). علائم سمیت قلبی (cardiotoxicity) ناشی از دوکسوروبیسین شامل کاهش قدرت انقباضی و قدرت پمپاژ قلب (۵)، نارسایی احتقانی قلب (۱)، کاردیومیوپاتی (۵)، اتساع قلب و اختلالات بدون علامت ریتم قلبی است که متأسفانه پیش‌آگهی وضعی داشته و کشنده می‌باشد (۱). مکانیسم ایجاد سمیت قلبی توسط دوکسوروبیسین با مکانیسم اثرات ضد توموری آن متفاوت بوده و عمدتاً شامل افزایش استرس اکسیداتیو در بافت قلبی است که افزایش تولید گونه‌های واکنشگر اکسیژن و افزایش پراکسیداسیون لیپیدی تأیید کننده آن است (۶، ۸-۱). کاهش میزان آنتی‌اکسیدان‌ها (۶)، مهار سنتز نوکلئیک اسیدها و پروتئین‌ها (۹، ۱۰) رهایش آمین‌های وازواکتیو (۱۱)، تغییر فعالیت نور آدرنرژیک (۱۲) و کاهش بیان ژن‌های قلبی خاصی از دیگر مکانیسم‌های پیشنهاد شده برای ایجاد سمیت قلبی هستند (۱).

تاکنون داروهای مختلفی برای کاهش عوارض این دارو استفاده شده اما هنوز پاسخ مطلوبی گرفته نشده است. در همین زمینه در کنار تحقیقات صورت گرفته بر داروهای شیمیایی، استفاده از مواد مؤثره گیاهی از قبیل فلاونوئیدها (Flavonoids) هم در تحقیقات علمی رواج گسترده‌ای یافته است. فلاونوئیدها خانواده‌ی مهمی از ترکیبات پلی فنولی هستند که فراوانی گسترده‌ای در قلمرو گیاهان دارند و اثرات بیولوژیکی متعددی از قبیل مهار رشد تومور (۱۳) و تنظیم پاسخ‌های التهابی دارند (۱۴، ۱۵) و استفاده از خواص درمانی آن‌ها از دوران یونان باستان تاکنون کاربرد داشته است (۱۶).

آپی ژنین به عنوان یک فلاونوئید با اثرات آنتی‌اکسیدانی قوی در سیب، کرفس، پرتغال و جوانه گندم وجود دارد (۱۷، ۱۸). ثابت شده است که آپی ژنین در بهبود هرچه بهتر مشکلات قلبی عروقی کمک می‌کند و سبب برانگیختن سیستم ایمنی، مهار تجمع پلاکتی، بروز فعالیت ضدالتهابی و اثرات محافظتی در برابر سرطان می‌شود (۱۹، ۲۰).

هو و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که اثرات محافظتی آپی ژنین بر روی قلب باعث بهبود علائم انفارکتوس قلبی شده و اندازه ناحیه انفارکتوس را کاهش می‌دهد. آپی ژنین باعث کاهش فعالیت CK-MB و LDH در جریان عروق کرونری می‌شود، از طریق کاهش پروتئین آپوپتوزی کاسپاز ۳ (Casp-3) و افزایش پروتئین‌های ضد آپوپتوزی نظیر Bcl<sub>2</sub> و کاهش پروتئین‌های آپوپتوزی نظیر Bax سبب کاهش میزان آپوپتوز کاردیومیوسیت‌ها می‌شود. به‌علاوه باعث مهار فسفریلاسیون MAPK/P38 در فرآیند ایسکمی-ریپرفیوژن می‌شود (۲۱) بنابراین با توجه به عوامل درگیر در پاتوژنز سمیت قلبی از یک سو و خواص آنتی‌اکسیدانی و آنتی آپوپتوتیک آپی ژنین از سوی دیگر، در این مطالعه اثرات

آپی‌ژنین بر مدل سمیت قلبی القا شده توسط داروی دوکسوروبیسین در موش صحرایی نر مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

### داروها و مواد

داروی دوکسوروبیسین از شرکت داروسازی اکسیر نانو سینا (تهران، ایران)، آپی‌ژنین و متیل کربوکسی سلولز (حلال آپی‌ژنین) از شرکت سیگما (آمریکا) خریداری شد.

### حیوانات

برای انجام این مطالعه از تعداد ۶۰ سر موش صحرایی نر از نژاد ویستار که از مرکز مطالعات تجربی و مقایسه‌ای دانشگاه علوم پزشکی ایران خریداری شد استفاده گردید. تمامی حیوانات در محیطی با چرخه نور و تاریکی ۱۲ ساعته، رطوبت ۲۵٪، دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و با دسترسی آزاد به آب و غذا قرار داشتند و به منظور انجام آزمایش به صورت تصادفی در ۶ گروه ۱۰ تایی قرار گرفتند.

### طراحی مطالعه

گروه‌های مورد مطالعه به شرح زیر می‌باشد:

۱- **گروه کنترل:** در این گروه نرمال سالیین به عنوان حلال دوکسوروبیسین در طی ۱۲ روز با فواصل زمانی ۴۸ ساعته به صورت داخل صفاقی (i.p) تزریق شد و علاوه بر آن، عمل گاوژ با متیل کربوکسی سلولز (حلال آپی‌ژنین) نیز به مدت ۱۲ روز متوالی انجام شد.

۲- **گروه سمیت قلبی (Dox):** در این گروه مدل سمیت قلبی با تزریق داروی دوکسوروبیسین با دوز تجمعی (mg/kg) ۱۲ به صورت ۶ دوز ۲ mg/kg با فواصل زمانی ۴۸ ساعته به صورت تزریق داخل صفاقی (i.p) القا شد.

۳- **گروه آپی‌ژنین:** در این گروه به حیوانات سالم، داروی آپی‌ژنین با دوز ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن (۵۰ mg/kg) به مدت ۱۲ روز متوالی به حیوانات گاوژ شد.

۴- **گروه درمانی آپی‌ژنین ۲۵ و سمیت قلبی (۲۵Dox+Api):** در این گروه همزمان با القای مدل سمیت قلبی، آپی‌ژنین با دوز ۲۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن (۲۵ mg/kg) به مدت ۱۲ روز متوالی به حیوانات گاوژ شد.

۵- **گروه درمانی آپی‌ژنین ۵۰ و سمیت قلبی (۵۰Dox+Api):** در این گروه همزمان با القای مدل سمیت قلبی، آپی‌ژنین با دوز ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن (۵۰ mg/kg) به مدت ۱۲ روز متوالی به حیوانات گاوژ شد.

۶- **گروه درمانی آپی‌ژنین ۷۵ و سمیت قلبی (۷۵Dox+Api):** در این گروه همزمان با القای مدل سمیت قلبی، آپی‌ژنین با دوز ۷۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن (۷۵ mg/kg) به مدت ۱۲ روز متوالی به حیوانات گاوژ شد.

وزن تمامی حیوانات در ابتدا و انتهای مطالعه اندازه گرفته شد و در پایان آزمایش از تمامی حیوانات به منظور بررسی عملکرد قلبی اکوکاردیوگرافی به عمل آورده شد. شاخص‌های آسیب قلبی شامل آنزیم‌های لاکتات دهیدروژناز (LDH)، کراتین کیناز (CK-MB) بوده که در سرم سنجیده شده و در نهایت تمامی حیوانات کشته شده و بافت قلبی آنها به منظور انجام مطالعات بافتی (با استفاده از رنگ‌آمیزی H&E) خارج گردید.

**نسبت وزن قلب به وزن بدن (HW/BW):** در پایان آزمایش حیوانات مجدداً وزن شده و بافت قلبی آنها نیز پس

گرفت و سپس برش‌های ۶ میکرونی بافت قلبی تهیه شد و با استفاده از رنگ‌آمیزی بافتی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E)، تغییرات بافت قلبی در زیر میکروسکوپ نوری مورد مشاهده قرار گرفت.

### آنالیز آماری

برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار آماری پریزم (GraphPad Prism 5.00) استفاده شد. داده‌ها به صورت Mean±SEM گزارش شد. به منظور مقایسه داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One way ANOVA) و آزمون متعاقب توکی استفاده گردید و سطح معنی‌داری داده‌ها  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

#### نتایج وزن بدن و بافت قلبی

آنالیز نتایج حاصل از اندازه‌گیری وزن بدن و وزن بافت قلبی نشان داد که میانگین وزن قلبی در گروه‌های Dox  $(P < 0.001)$ ، Dox+Api ۵۰ و Dox+Api ۷۵  $(P < 0.05)$  نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار دارد. همچنین وزن قلبی در گروه Dox+Api ۲۵ در مقایسه با گروه Dox به صورت معنی‌داری افزایش یافت  $(P < 0.05)$ . وزن بدن نیز در گروه‌های Dox، Dox+Api ۵۰ و Dox+Api ۷۵ در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌دار از خود نشان داد  $(P < 0.05)$ . نسبت وزن قلبی به وزن بدن در بین گروه‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری نشان نداد (جدول ۱).

از خارج شدن از بدن وزن شده و نسبت وزن قلب (HW) به وزن بدن (BW) محاسبه شد.

#### اکوکاردیوگرافی: شاخص‌های اکوکاردیوگرافی که شامل

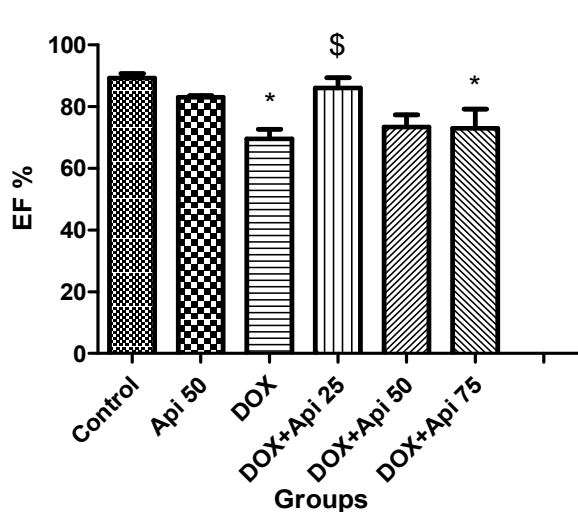
کسر تخلیه (EF)، کسر کوتاه شدگی (FS)، قطر داخلی پایان دیاستولی بطن چپ (LVIDd) و قطر داخلی پایان سیستولی بطن چپ (LVISd) بود. در روز سیزدهم، توسط دستگاه اکوکاردیوگراف (M mode, 12 MHz) در مرکز تحقیقاتی، آموزشی و درمانی قلب و عروق شهید رجایی تهران ثبت شدند.

#### اندازه‌گیری سطوح سرمی آنزیم‌های کراتین کیناز

(CK-MB) و لاکتات دهیدروژناز (LDH): برای بررسی میزان آسیب وارده به قلب، پس از انجام اکوکاردیوگرافی، حیوانات تحت بیهوشی عمیق با کتامین (۷۰ mg/kg, i.p) و زایلازین (۱۰ mg/kg, i.p) قرار گرفته و سپس خونگیری از طریق قلب به عمل آمده و نمونه‌های خونی به مدت نیم ساعت در محیط آزمایشگاه منعقد شده و پس از سانتریفوژ نمونه‌ها و برداشتن سرم، میزان آنزیم‌های CK-MB و LDH با استفاده از کیت‌های الایزای مخصوص سنجیده شد. اندازه‌گیری MDA بر اساس روشی است که اساس آن واکنش با تیوباربیتوریک اسید (TBA) و تولید رنگ قرمز ناشی از آن است که بیشترین جذب نوری در طول موج ۵۳۲ نانومتر را دارد. SOD بر اساس مهار اتواکسیداسیون هماتوکسیلین و افزایش جذب نوری در طول موج ۵۶۰ نانومتر سنجیده می‌شود.

#### بررسی بافتی

در پایان آزمایش و پس از انجام تست‌های اکوکاردیوگرافی و انجام خونگیری، قفسه سینه حیوانات باز شده و بافت قلبی آنان خارج شده و در فرمالین ۱۰٪ قرار



نمودار A-1. میزان درصد کسر تخلیه (EF%) در گروه‌های مورد مطالعه. Api: آپی ژنین و Dox: دوکسوروبیسین. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  SEM بیان شده است. \*  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه کنترل، \$  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه Dox.

#### قطر داخلی پایان دیاستولی بطن چپ (LVIDd):

آنالیز آماری نتایج حاصل نشان داد که هیچ تفاوت معنی‌داری بین LVIDd در گروه‌های مورد مطالعه دیده نشد (نمودار C-1).

#### قطر داخلی پایان سیستولی بطن چپ (LVIDs):

همانطور که در نمودار D-1 نشان داده شده است LVIDs در گروه‌های Dox، Dox+Api 50 و Dox+Api 75 ( $P < 0.05$ ) در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌دار نشان داد در حالی که درمان با دوز 25 میلی‌گرم آپی ژنین به ازای کیلوگرم باعث کاهش معنی‌دار قطر پایان سیستولی بطن چپ نسبت به گروه Dox شد ( $P < 0.01$ ).

#### نتایج آنزیم‌های قلبی

##### لاکتات دهیدروژناز (LDH): میزان سرمی آنزیم LDH

در گروه Dox نسبت به گروه کنترل و گروه Api 50 افزایش معنی‌دار نشان می‌دهد ( $P < 0.01$ ). مصرف آپی ژنین در هر 3 گروه درمانی از افزایش معنی‌دار LDH در مقایسه با گروه

جدول 1. نتایج مربوط به اندازه‌گیری وزن بدن و بافت قلبی

گروه‌های مطالعاتی	وزن قلب (HW) برحسب گرم	وزن بدن (BW) برحسب گرم	نسبت وزن قلب به وزن بدن (HW/BW) میلی‌گرم به گرم
control	10.25 ± 0.26	265.8 ± 9.50	3.85 ± 0.165
50Api	9.39 ± 0.396	253.5 ± 14.47	3.7 ± 0.195
Dox	7.25 ± 0.119 ***	209.3 ± 6.25 *	3.47 ± 0.153
25Dox+Api	8.85 ± 0.317 \$	233 ± 17.84	3.75 ± 0.104
50Dox+Api	8.45 ± 0.440 *	212.3 ± 10.91 *	3.85 ± 0.246
75Dox+Api	8.35 ± 0.397 *	213.5 ± 11.27 *	3.9 ± 0.204

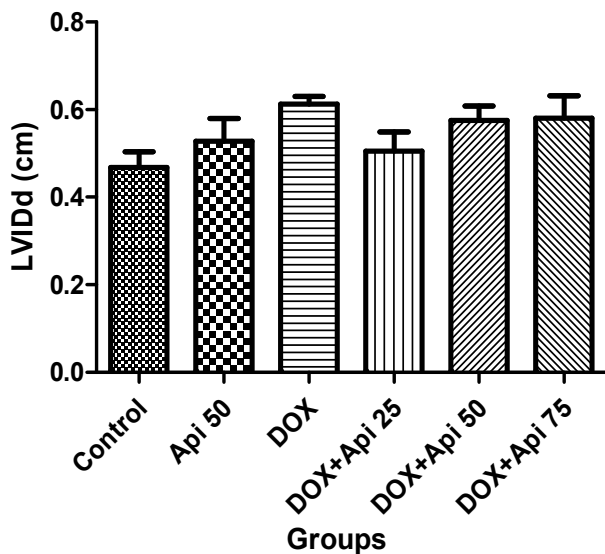
BW: وزن بدن (gr); HW: وزن بافت قلبی (gr); HW/BW: نسبت وزن بافت قلبی به وزن بدن (mg/gr); Api: آپی ژنین و Dox: دوکسوروبیسین. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  SEM بیان شده است. \*  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه کنترل، \*\*  $P < 0.01$  در مقایسه با گروه کنترل، \$  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه Dox.

#### نتایج اکوکاردیوگرافی

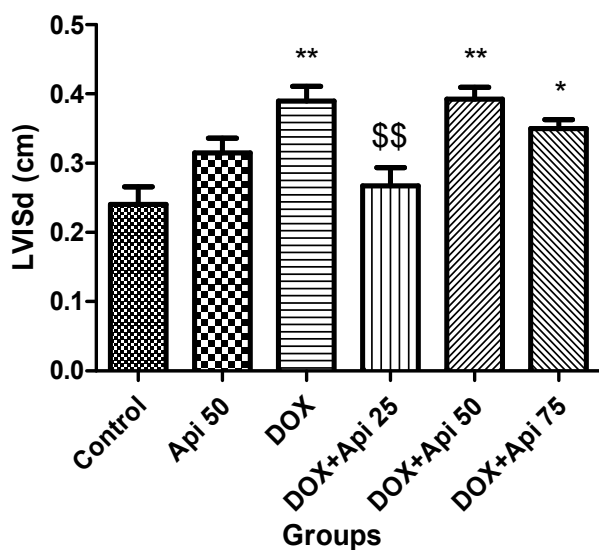
کسر تخلیه (EF): همانطور که در نمودار شماره A-1 نشان داده شده است، میزان EF در گروه‌های Dox و Dox+Api 75 در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد ( $P < 0.05$ ), در حالی که درمان با دوزهای 25 و 50 میلی‌گرم آپی ژنین به ازای کیلوگرم وزن بدن از کاهش معنی‌دار EF قلبی جلوگیری کرده است. همچنین درمان با دوز 25 میلی‌گرم آپی ژنین به ازای کیلوگرم وزن بدن باعث افزایش معنی‌دار EF نسبت به گروه Dox شده است ( $P < 0.05$ ).

#### کسر کوتاه شدگی (FS): این مقدار در گروه Dox در

مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری کاهش یافت ( $P < 0.05$ ). درمان با هر سه دوز آپی ژنین از کاهش معنی‌دار FS نسبت به گروه کنترل جلوگیری کرده است اما فقط درمان با دوز 25 میلی‌گرم آپی ژنین به ازای کیلوگرم وزن بدن باعث افزایش معنی‌دار EF در مقایسه با گروه Dox گردیده است ( $P < 0.05$ ) (نمودار B-1).



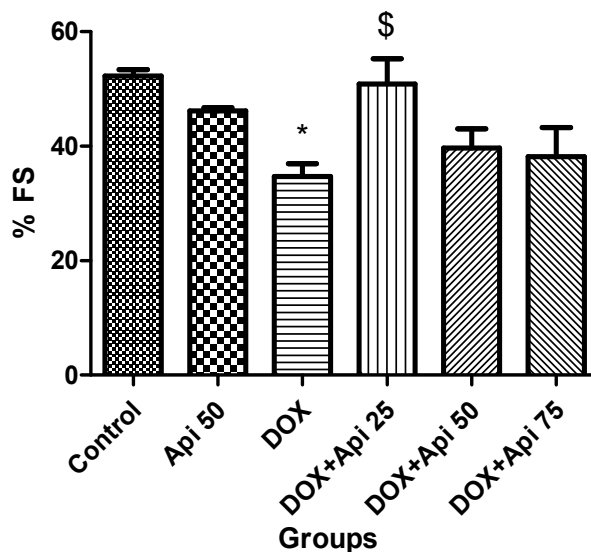
نمودار C-1. میزان قطر داخلی پایان دیاستولی بطن چپ در گروه‌های مورد مطالعه. Api؛ آپی‌ژنین و Dox؛ دوکسوروبیسین. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  SEM بیان شده است.



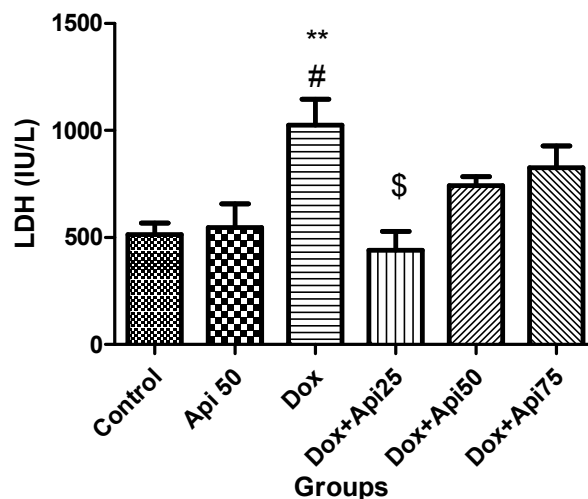
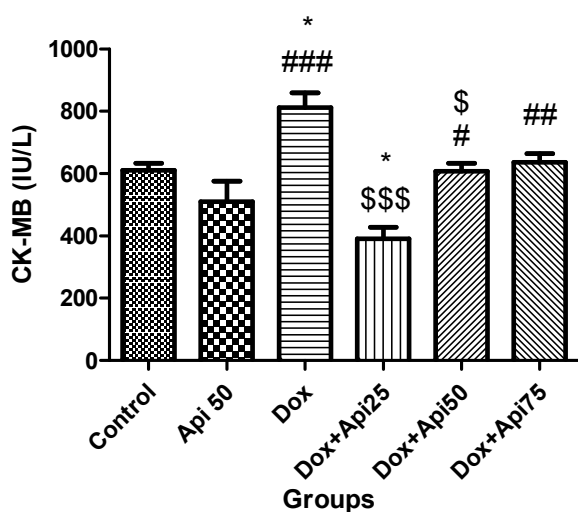
نمودار D-1. میزان قطر داخلی پایان سیستولی بطن چپ در گروه‌های مورد مطالعه. Api؛ آپی‌ژنین و Dox؛ دوکسوروبیسین. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  SEM بیان شده است. \*  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه کنترل، \*\*  $P < 0.01$  در مقایسه با گروه کنترل، \$\$\$  $P < 0.001$  در مقایسه با گروه Dox.

کنترل جلوگیری کرده است اما تنها درمان با دوز ۲۵ آپی‌ژنین باعث کاهش معنی‌دار LDH در مقایسه با گروه Dox شده است ( $P < 0.05$ )، (نمودار ۲).

کراتین کیناز (CK-MB): نمودار ۳ نشان می‌دهد که میزان سرمی آنزیم CK-MB در گروه Dox نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار داشت ( $P < 0.05$ ). درمان با دوزهای ۲۵ ( $P < 0.001$ ) و ۵۰ میلی‌گرم آپی‌ژنین به ازای کیلوگرم در مقایسه با گروه Dox باعث کاهش معنی‌دار CK-MB شد. درمان با دوزهای ۵۰ و ۷۵ آپی‌ژنین از افزایش معنی‌دار CK-MB در مقایسه با گروه کنترل جلوگیری کرده و درمان با دوز ۲۵ آپی‌ژنین، میزان CK-MB را در مقایسه با گروه کنترل کاهش داد ( $P < 0.05$ ).



نمودار B-1. میزان درصد کسر کوتاه شدگی (%FS) در گروه‌های مورد مطالعه. Api؛ آپی‌ژنین و Dox؛ دوکسوروبیسین. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  SEM بیان شده است. \*  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه کنترل، \$  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه Api ۵۰.



نمودار ۳. میزان سرمی آنزیم کراتین کیناز (CK-MB) در گروه‌های مورد مطالعه. Api؛ آپی‌ژنین و Dox؛ دوکسوروبیسین. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  SEM بیان شده است. \*  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه کنترل، #  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه Api 50، ##  $P < 0.01$  در مقایسه با گروه Api 50، ###  $P < 0.001$  در مقایسه با گروه Dox، \$\$\$  $P < 0.001$  در مقایسه با گروه Dox.

.Dox

نمودار ۲. میزان سرمی آنزیم لاکتات دئیدروژناز (LDH) در گروه‌های مورد مطالعه. Api؛ آپی‌ژنین و Dox؛ دوکسوروبیسین. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  SEM بیان شده است. \*  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه کنترل، #  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه Api 50، \$  $P < 0.05$  در مقایسه با گروه Dox.

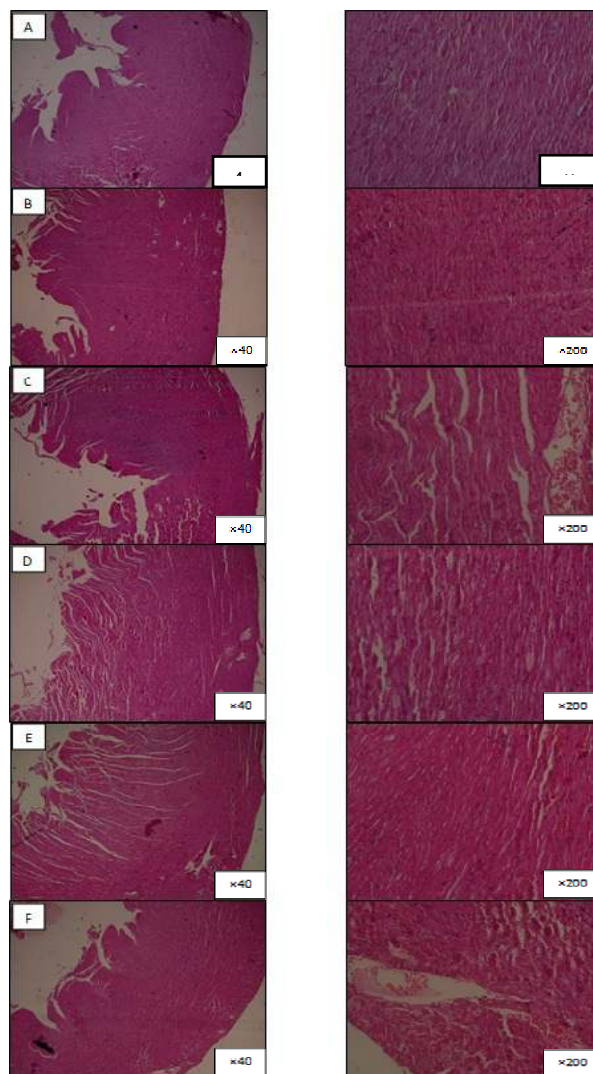
#### نتایج تغییرات بافت شناختی

در گروه‌های کنترل و Api 50، فواصل بین سلولی طبیعی و فیبرهای عضلانی قلب ساختار منشعب دارند. در گروه Dox، فواصل بین سلولی افزایش یافته، فیبرهای عضلانی موجی شکل شده و از حالت انشعابی طبیعی خارج شده است. دژنراسیون گسترده کاردیومیوسیت‌ها، نکروز سلولی و نقاط کانونی هموراژیک نیز به وضوح قابل مشاهده است. در گروه Dox+Api 25، فواصل بین سلولی کاهش یافته، از دژنراسیون کاردیومیوسیت‌ها و نکروز سلولی در مقایسه با گروه Dox تا حد زیادی جلوگیری شده است. در گروه‌های Dox+Api 50 و Dox+Api 75، فواصل بین سلولی و کانون‌های هموراژیک تا حدودی کاهش یافته است (شکل ۱).

## بحث و نتیجه‌گیری

یافته‌های مطالعه پیش‌رو نشان داد که دریافت داروی دوکسوروبیسین باعث کاهش شاخص‌های عملکردی قلب مثل کسر تخلیه و کسر کوتاه‌شدگی و افزایش قطر پایان سیستولی بطن چپ گردید. همچنین میزان سطوح سرمی آنزیم‌های LDH و CK-MB نیز با تزریق دوکسوروبیسین افزایش یافت. از سوی دیگر مصرف آپی‌ژنین با دوز ۲۵ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن، از کاهش معنی‌دار کسر تخلیه و کسر کوتاه‌شدگی جلوگیری کرده و با کاهش قطر پایان سیستولی بطن چپ و همچنین کاهش میزان سرمی آنزیم‌های LDH و CK-MB باعث بهبود علائم سمیت قلبی در مقایسه با گروه DOX شد.

موسسه بین‌المللی سرطان، مسمومیت دارویی که بر روی قلب اثر می‌کند را به طور عمومی سمیت قلبی (cardiotoxicity) نام‌گذاری کرده است (۲۲). DOX به طور وسیع و موفقیت‌آمیز در درمان انواع زیادی از سرطان‌ها به کار می‌رود؛ اما مسمومیت قلبی ایجاد شده توسط DOX در دهه‌های اخیر تبدیل به یکی از نگرانی‌های بزرگ انکولوژیست‌ها شده است. مسمومیت قلبی القا شده توسط DOX می‌تواند به صورت حاد یا مزمن بروز کند. نوع حاد نادر بوده و بعد از دریافت دوز بالای DOX اتفاق افتاده و منجر به تاکی‌کاردی و نارسایی حاد قلبی می‌شود. درحالی‌که نوع مزمن ممکن است چندین سال بعد از دریافت آخرین دوز DOX در شیمی‌درمانی خود را نشان دهد (۲۳) و از آنجا که در برخی از بیماران مبتلا به سرطان نشانه‌های سمیت قلبی ۴ تا ۲۰ سال پس از درمان با دوکسوروبیسین خود را نشان می‌دهد لذا گسترش سمیت قلبی عامل تهدید کننده حیات در این بیماران به شمار می‌رود (۲۴). مکانیسم‌هایی که در مسمومیت قلبی دخیل هستند پیچیده و چند عاملی بوده و



شکل ۱: تغییرات بافت شناختی قلب در پایان آزمایش. برش‌های عرضی ۶ میکرومتری از قاعده به سمت رأس قلب که با هماتوکسلین-انوزین رنگ‌آمیزی شده‌اند. تصویر میکروسکوپ نوری بافت قلبی با بزرگنمایی ۴۰ (سمت چپ) و بزرگنمایی ۲۰۰ همان بافت (سمت راست) در گروه‌های مورد مطالعه. در گروه‌های ۲۵ DOX+Api و ۷۵ DOX+Api، فواصل بین سلولی و کانون‌های هموراژیک تا حدودی کاهش یافته است. A: گروه کنترل، B: گروه ۵۰ Api، C: گروه DOX، D: گروه ۲۵ DOX+Api، E: گروه DOX+Api ۵۰، F: گروه DOX+Api ۷۵.



شامل انواع مرگ سلولی (آپوپتوز، نکروز، اتوفازی) (۲۵)، استرس اکسیداتیو (۲۶)، هایپرتروفی سلولی (۲۷)، تغییر بیان ژن (۲۸)، تغییر حالت ماتریکس خارج سلولی (ECM) و اختلال گذرا در هومئوستاز کلسیم (۲۹) و تغییر حالت بطن (۳۰) می‌باشد. هرچند که به نظر می‌رسد در تمامی این مکانیسم‌ها شکل‌گیری رادیکال‌های آزاد در اثرات آسیب‌زای دوکسوروبیسین نقش داشته باشد (۳۱،۳۲)؛ بنابراین منطقی به نظر می‌رسد که استفاده از موادی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی مثل آپی‌ژنین بتواند با تعدیل استرس اکسیداتیو عوامل دخیل در سمیت قلبی را کاهش دهد. بر پایه تحقیقات گزارش شده قلبی آپی‌ژنین دارای اعمال فارماکولوژیکی متنوعی از قبیل ضد استرس اکسیداتیو، ضد تومور و ضد آسیب DNA است (۳۳). به دنبال آسیب میوسیت‌های قلبی، آنزیم‌های متابولیکی قلبی شامل CK-MB و LDH، از میوکارد به پلاسما رها می‌شوند. افزایش سطوح سرمی CK-MB و LDH به عنوان مارکرهای مهم آسیب میوسیتی شناخته می‌شوند (۳۴). در مطالعه حاضر نیز القای سمیت قلبی با استفاده از داروی دوکسوروبیسین باعث افزایش میزان LDH و CK-MB در مقایسه با گروه‌های سالم شد که بیانگر آسیب میوسیت‌های قلبی توسط داروی دوکسوروبیسین است و درمان با آپی‌ژنین در هر سه گروه درمانی توانسته با اثر محافظتی بر کاردیومیوسیت‌ها از افزایش آنزیم‌های آسیب قلبی جلوگیری کند. بعلاوه اینکه درمان با دوز ۲۵ میلی‌گرم آپی‌ژنین به ازای کیلوگرم وزن بدن، سطوح سرمی این دو آنزیم را نسبت به گروه سمیت قلبی (Dox) کاهش داد. همسو با نتایج ما هو و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که مصرف آپی‌ژنین باعث بروز اثرات حفاظت قلبی نظیر کاهش میزان آنزیم‌های LDH و CK-MB، کاهش سایز انفارکتوس و کاهش میزان آپوپتوز در قلب ایزوله موش صحرایی نر می‌شود (۲۱)؛ بنابراین این

احتمال وجود دارد که آپی‌ژنین با ایجاد محافظت قلبی کاردیومیوسیت‌ها در برابر مرگ سلولی ناشی از دوکسوروبیسین، باعث بهبود شاخص‌های عملکرد قلبی نظیر کسر تخلیه و کسر کوتاه شدگی شده است همچنان که وزن بافت قلبی هم در گروه دریافت‌کننده آپی‌ژنین نسبت به گروه DOX کاهش کمتری را از خود نشان داد. هرچند که نسبت وزن بافت قلبی به وزن بدن در بین گروه‌های مختلف تغییری ندارد که احتمالاً به خاطر اثر داروی دوکسوروبیسین بر کاهش وزن عمومی در بین حیوانات مورد آزمایش است.

ماهیت بافت قلبی بدین گونه است که سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نظیر سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) در آن در شرایط عادی پایین است که این امر موجب افزایش آسیب‌پذیری قلب به تولیدات ROS و استرس اکسیداتیو می‌شود. ثابت شده است که سمیت قلبی (القا شده توسط ایزوپروترونول) باعث تولید سوپراکسیدهای آنیون و گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود که محیط اکسیداتیوی تشکیل شده و استرس اکسیداتیو ایجاد می‌گردد. آنتی‌اکسیدان‌های درونزاد بدن مثل سوپراکسید دیسموتاز و گلووتاتیون پراکسیداز خط دفاعی اول در برابر استرس اکسیداتیو هستند (۳۵) که نشان داده شده این آنتی‌اکسیدان‌های درونزاد عضله قلبی در سمیت قلبی ناشی از ایزوپروترونول کاهش می‌یابند (۳۶). در مطالعه بوا و همکاران در سال ۲۰۱۶ نشان داده شد که آپی‌ژنین با دوز ۷۵ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم باعث افزایش سطوح آنتی‌اکسیدان‌های سوپراکسید دیسموتاز، گلووتاتیون پراکسیداز و کاتالاز و کاهش مالون دی‌آلدید در بافت قلبی به دنبال آسیب عضله قلبی توسط ایزوپروترونول می‌شود (۳۷) بنابراین این احتمال وجود دارد که در مطالعه انجام گرفته توسط ما نیز آپی‌ژنین از طریق خواص آنتی‌اکسیدانی خود از

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که درمان با آپی‌ژنین با جلوگیری از افزایش میزان آنزیم‌های LDH و CKMB، جلوگیری از کاهش میزان EF و FS و با بهبود تغییرات بافت شناختی عضله قلبی باعث کاهش آسیب ناشی از سمیت قلبی القا شده توسط دوکسوروبیسین می‌گردد.

### تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران مورد حمایت مالی قرار گرفت که بدینوسیله مراتب قدردانی اعلام می‌گردد.

آسیب به عضله قلبی جلوگیری کرده و علائم سمیت قلبی را کاهش داده است.

مکانیسم دیگری که در آسیب‌زایی سمیت قلبی نقش دارد، آپوپتوز است. مطالعات زیادی نشان دادند که القای آپوپتوز توسط DOX از هر دو مسیر داخلی و خارجی آپوپتوز صورت می‌گیرد. در مسیر داخلی، DOX با افزایش بیان افزایش فسفریلاسیون پروتئین P53 باعث افزایش بیان پروتئین‌هایی نظیر Bax شده و بدین ترتیب مسیر داخلی آپوپتوز فعال می‌شود (۳۸،۳۹). نشان داده شده که آپی‌ژنین با افزایش پروتئین‌های ضد آپوپتوزی مثل Bcl2 و کاهش پروتئین‌های آپوپتوزی مثل Bax و در کل با کاهش نسبت  $bax/bcl2$  باعث کاهش آسیب قلبی متعاقب ۳۰ دقیقه ایسکمی و ۵۰ دقیقه پرفیوژن مجدد، بر روی قلب ایزوله موش صحرایی نر (مدل لانگندورف) می‌شود (۲۱). از آنجا که آپوپتوز در پاتوژنز سمیت قلبی نیز دخیل است و آپی‌ژنین هم دارای خواص ضد آپوپتوزی است پس در مطالعه حاضر احتمالاً اعمال ضدآپوپتوزی آپی‌ژنین نیز می‌تواند در محافظت کاردیومیوسیت‌ها در برابر آسیب ناشی از دوکسوروبیسین دخالت داشته باشد. البته از آنجا که در این کار تحقیقاتی مکانیسم‌های دخیل در سمیت قلبی نظیر استرس اکسیداتیو و آپوپتوز مورد بررسی قرار نگرفتند، لذا پیشنهاد می‌شود تا در مطالعات آینده بررسی مکانیسم اثرات آپی‌ژنین در کاهش آسیب سمیت قلبی مورد بررسی قرار بگیرد.

**References:**

1. Takemura G, Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog Cardiovasc Dis*. 2007; 49(5): 330-352.
2. Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol*. 1999; 57(7): 727-741.
3. 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(2): 185-229.
4. Allen A. The cardiotoxicity of chemotherapeutic drugs. *Seminars in oncology*; 1992: Elsevier.
5. Angsutararux P, Luanpitpong S, Issaragrisil S. Chemotherapy-Induced Cardiotoxicity: Overview of the Roles of Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2015; 2015: 795602.
6. Singal PK, Deally CM, Weinberg LE. Subcellular effects of adriamycin in the heart: a concise review. *J Mol Cell Cardiol*. 1987; 19(8): 817-828.
7. Kalyanaraman B, Perez-Reyes E, Mason RP. Spin-trapping and direct electron spin resonance investigations of the redox metabolism of quinone anticancer drugs. *Biochim Biophys Acta*. 1980; 630(1): 119-130.
8. Doroshow JH. Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. *Cancer Res*. 1983; 43(2): 460-472.
9. Arena E, D'Alessandro N, Dusonchet L, Geraci M, Rausa L, Sanguedolce R. Repair kinetics of DNA, RNA and proteins in the tissues of mice treated with doxorubicin. *Arzneimittel-Forschung*. 1978; 29(6): 901-902.
10. Monti E, Prosperi E, Supino R, Bottiroli G. Free radical-dependent DNA lesions are involved in the delayed cardiotoxicity induced by adriamycin in the rat. *Anticancer research*. 1994; 15(1): 193-197.
11. Bristow MR, Sageman WS, Scott RH, Billingham ME, Bowden RE, Kernoff RS, et al. Acute and chronic cardiovascular effects of doxorubicin in the dog: the cardiovascular pharmacology of drug-induced histamine release. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1980; 2(5): 487-515.
12. Tong J, Ganguly P, Singal P. Myocardial adrenergic changes at two stages of heart failure due to adriamycin treatment in rats. *Am J Physiology-Heart Circulat Physiol*. 1991; 260(3): H909-H916.
13. Formica JV, Regelson W. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol*. 1995; 33(12): 1061-1080.
14. Liang Y-C, Tsai S-H, Tsai D-C, Lin-Shiau S-Y, Lin J-K. Suppression of inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase through activation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  by flavonoids in mouse macrophages. *FEBS letters*. 2001; 496(1): 12-18.
15. Garretson JT, Teubner BJ, Grove KL, Vazdarjanova A, Ryu V, Bartness TJ. Peroxisome proliferator-activated receptor

- gamma controls ingestive behavior, agouti-related protein, and neuropeptide Y mRNA in the arcuate hypothalamus. *J Neurosci*. 2015; 35(11): 4571-4581.
16. Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther*. 2002; 96(2-3): 67-202.
  17. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 2004; 79(5): 727-747.
  18. Clere N, Faure S, Carmen Martinez M, Andriantsitohaina R. Anticancer properties of flavonoids: roles in various stages of carcinogenesis. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2011; 9(2): 62-77.
  19. Li RJ, He KL, Li X, Wang LL, Liu CL, He YY. Salubrinal protects cardiomyocytes against apoptosis in a rat myocardial infarction model via suppressing the dephosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$ . *Molecular Med Rep*. 2015; 12(1): 1043-1049.
  20. Chen S, Zheng S, Liu Z, Tang C, Zhao B, Du J, et al. Endogenous sulfur dioxide protects against oleic acid-induced acute lung injury in association with inhibition of oxidative stress in rats. *Lab Invest*. 2015; 95(2): 142-156.
  21. Hu J, Li Z, Xu LT, Sun AJ, Fu XY, Zhang L, et al. Protective effect of apigenin on ischemia/reperfusion injury of the isolated rat heart. *Cardiovasc Toxicol*. 2015; 15(3): 241-249.
  22. Hershman DL, McBride RB, Eisenberger A, Tsai WY, Grann VR, Jacobson JS. Doxorubicin, cardiac risk factors, and cardiac toxicity in elderly patients with diffuse B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2008; 26(19): 3159-3165.
  23. Wallace KB. Doxorubicin-induced cardiac mitochondriopathy. *Pharmacol Toxicol*. 2003; 93(3): 105-115.
  24. Singal P, Li T, Kumar D, Danelisen I, Iliskovic N. Adriamycin-induced heart failure: mechanisms and modulation. *Molecular and cellular biochemistry*. 2000; 207(1): 77-86.
  25. Zhang YW, Shi J, Li YJ, Wei L. Cardiomyocyte death in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2009; 57(6): 435-445.
  26. Panis C, Herrera AC, Victorino VJ, Campos FC, Freitas LF, De Rossi T, et al. Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2012; 133(1): 89-97.
  27. Sabri A, Hughie HH, Lucchesi PA. Regulation of hypertrophic and apoptotic signaling pathways by reactive oxygen species in cardiac myocytes. *Antioxid Redox Signal*. 2003; 5(6): 731-740.
  28. Siwik DA, Tzortzis JD, Pimental DR, Chang DL, Pagano PJ, Singh K, et al. Inhibition of copper-zinc superoxide dismutase induces cell growth, hypertrophic phenotype, and apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes in vitro. *Circ Res*. 1999; 85(2): 147-153.
  29. Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens*. 2000; 18(6): 655-673.

30. Kwon SH, Pimentel DR, Remondino A, Sawyer DB, Colucci WS. H(2)O(2) regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct kinase pathways. *J Mol Cell Cardiol.* 2003; 35(6): 615-621.
31. Andreadou I, Sigala F, Iliodromitis EK, Papaefthimiou M, Sigalas C, Aligiannis N, et al. Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress. *J Molecul Cell Cardiol.* 2007; 42(3): 549-558.
32. Swamy AV, Wangikar U, Koti B, Thippeswamy A, Ronad P, Manjula D. Cardioprotective effect of ascorbic acid on doxorubicin-induced myocardial toxicity in rats. *Indian J Pharmacol.* 2011; 43(5): 507-511.
33. He J, Xu Q, Wang M, Li C, Qian X, Shi Z, et al. Oral administration of apigenin inhibits metastasis through akt/p70s6k1/mmp-9 pathway in orthotopic ovarian tumor model. *International journal of molecular sciences.* 2012; 13(6): 7271-7282.
34. Nazari A, Sadr A, Campillo Funollet M, Nakashima S, Shimada Y, Tagami J, et al. Effect of hydration on assessment of early enamel lesion using swept-source optical coherence tomography. *J Biophotonics.* 2013; 6(2): 171-177.
35. Golikov AP, Polumiskov V, Davydov BV, Karev VA, Bashkatova VG, Belozero GE, et al. [Lipid peroxidation and the major factors of its activation in patients with myocardial infarction]. *Kardiologiia.* 1989; 29(7): 53-59.
36. Dianita R, Jantan I, Amran AZ, Jalil J. Protective effects of *Labisia pumila* var. *alata* on biochemical and histopathological alterations of cardiac muscle cells in isoproterenol-induced myocardial infarction rats. *Molecules.* 2015; 20(3): 4746-4763.
37. Buwa CC, Mahajan UB, Patil CR, Goyal SN. Apigenin Attenuates beta-Receptor-Stimulated Myocardial Injury Via Safeguarding Cardiac Functions and Escalation of Antioxidant Defence System. *Cardiovasc Toxicol.* 2016; 16(3): 286-297.
38. L'Ecuyer T, Sanjeev S, Thomas R, Novak R, Das L, Campbell W, et al. DNA damage is an early event in doxorubicin-induced cardiac myocyte death. *Am J Physiology-Heart Circulat Physiol.* 2006; 291(3): H1273-H1280.
39. Liu X, Chua CC, Gao J, Chen Z, Landy CL, Hamdy R, et al. Pifithrin-alpha protects against doxorubicin-induced apoptosis and acute cardiotoxicity in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 286(3): H933-939.

## Apigenin improves myocardial function and attenuates cardiotoxicity induced by doxorubicin in male rats

Fallah Rajabpour Zare M<sup>1</sup>, Rakhshan K<sup>2</sup>, Aboutaleb N<sup>3</sup>, Nikbakht F<sup>4</sup>, Bakhshesh M<sup>5</sup>, Azizi Y<sup>6\*</sup>

1. MSc student, Department of Physiology, faculty of medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2. Ph.D student, Department of Physiology, faculty of medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3. Professor associated, Physiology research center and Department of physiology, faculty of medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

4. Professor associated, Department of Physiology, faculty of medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

5. Professor assistant, Department of Physiology, faculty of medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.

6. Professor assistant, Physiology research center and Department of physiology, faculty of medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran, azizi.y@iums.ac.ir

Received: 21 Jun 2018 Accepted: 10 March 2018

### Abstract

**Background:** Doxorubicin has been used in the treatment of malignancies, including lymphoma, leukemia and breast cancer. Cardiotoxicity is the main adverse effect of doxorubicin. Apigenin, as a flavonoid, has antioxidant, anti-inflammatory and anti tumoral properties. The aim of this study is the assessment of the effect of apigenin on cardiotoxicity induced by doxorubicin.

**Materials and Methods:** 60 male wistar rats were divided into 6 groups. Cardiotoxicity was induced by 6 injections of doxorubicin (2 mg/kg, ip) over 12 days. The treatment groups received orally 25, 50 and 75 mg/kg/day apigenin for 12 days simultaneously with cardiotoxicity induction.

**Results:** The heart weight to body weight ratio showed no significant difference between different groups. In the apigenin group (25 mg/kg), EF and FS showed a significant increase ( $P < 0.05$ ) and LVEDs, LDH and CK-MB showed a significant decrease, in comparison to the cardiotoxicity group.

**Conclusion:** Apigenin prevents LDH and CK-MB elevation and also EF and FS reduction and improves cardiac tissue changes and leads to a decrease in cardiac damage induced by doxorubicin.

**Keywords:** Apigenin, Doxorubicin, Cardiotoxicity, Echocardiography, Cardiac enzymes.

\***Citation:** Fallah Rajabpour Zare M, Rakhshan K, Aboutaleb N, Nikbakht F, Bakhshesh M, Azizi Y. Apigenin improves myocardial function and attenuates cardiotoxicity induced by doxorubicin in male rats. *Yafte*. 2018; 20(1):85-98.