

## Anti-apoptotic effects of minocycline on doxorubicin-induced cardiotoxicity in male Wistar rats

Hossein Piri<sup>1</sup>, Ehsan Aali<sup>2</sup>, Samaneh Keshavarz Hedayati<sup>3</sup>, Sanaz Keshavarz Shahbaz<sup>4</sup>, Yazdan Naderi<sup>5</sup>

1.Associate Professor, Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Prevention of Non-communicable Disease, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran. ORCID ID: 0000-0001-8402-7742

2.Associate Professor, Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Prevention of Non-communicable Disease, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran. ORCID ID: 0000-0002-2231-118X.

3.MSc of microbiology, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Qazvin University of Medical Science, Qazvin, Iran. ORCID ID: 0000-0003-3526-5917.

4.PhD in immunology, Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Prevention of Noncommunicable Disease, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran. ORCID ID: 0000-0001-73335969

5.Assistant Professor, Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Prevention of Non-communicable Disease, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran. (Corresponding author), Tel: +9828 3333 6001, Email: y.naderi@qums.ac.ir. . ORCID ID: 0000-0002-6096-3840, ORCID ID: 0000-0001-8402-7742

### ABSTRACT

**Background and Aim:** Doxorubicin is an effective chemotherapeutic agent. However, use of this drug is limited due to its dose-dependent cardiotoxicity. Activation of apoptotic pathways in myocardial tissue plays an important role in doxorubicin-induced cardiotoxicity. Minocycline is an antibiotic that has anti-apoptotic effects. In this study, we investigated the protective effects of minocycline against doxorubicin-induced cardiac toxicity in male rats.

**Materials and Methods:** Forty two adult male rats were divided into control (normal saline), doxorubicin (2.5 mg / kg), minocycline (45 and 90 mg / kg) and treatment (doxorubicin + minocycline 45 and 90 mg / kg) groups. Minocycline was injected intraperitoneally, once a day for 3 weeks. Ejection fraction (EF) and fractional shortening (FS) were measured using echocardiography. The activity of caspase 3/7 and the expression of Bax and Bcl2 were measured by biochemical methods. Bax and Bcl-2 genes expression levels were estimated by real-time PCR.

**Results:** In the minocycline-treated groups (45 and 90 mg / kg) the activity of caspase 3/7 and the expression of Bax gene were significantly lower and the levels of EF, FS and Bcl-2 expression were significantly higher than those in the doxorubicin group.

**Conclusion:** Minocycline reduces doxorubicin-induced cardiotoxicity. The anti-apoptotic effects of minocycline may play an important role in its protective effects.

**Keywords:** Doxorubicin, Minocycline, Cardiotoxicity, Apoptosis

**Received:** Dec 11, 2021

**Accepted:** May 10, 2022

**How to cite the article:** Hossein Piri, Ehsan Aali, Samaneh Keshavarz Hedayati, Sanaz Keshavarz Shahbaz, Yazdan Naderi. Anti-apoptotic effects of minocycline on doxorubicin-induced cardiotoxicity in male Wistar rats. *ŞJKU* 2023;28(5):13-24.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

## اثرات ضد آپوپتوز مینوسیکلین بر سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین در رت های نر نژاد

### ویستار

حسین پیری<sup>۱</sup>، احسان عالی<sup>۲</sup>، سمانه کشاورز هدایتی<sup>۳</sup>، ساناز کشاورز شهباز<sup>۴</sup>، یزدان نادری<sup>۵</sup>

۱. دانشیار بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، موسسه تحقیقاتی پیشگیری از بیماری‌های غیر واگیر، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۱-۸۴۰۲-۷۷۴۲

۲. دانشیار فارماکولوژی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، موسسه تحقیقاتی پیشگیری از بیماری‌های غیر واگیر، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۲۲۳۱-۱۱۸۸

۳. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، بخش فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۳-۳۵۲۶-۵۹۱۷

۴. دکترای ایمونولوژی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، موسسه تحقیقاتی پیشگیری از بیماری‌های غیر واگیر، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۱-۷۳۳۳-۵۹۶۹

۵. استادیار فارماکولوژی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، موسسه تحقیقاتی پیشگیری از بیماری‌های غیر واگیر، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران. پست الکترونیکی: y.naderi@qums.ac.ir، تلفن: ۰۲۸۳۳۳۶۰۰۱، کد ارکید: ۰۲۸۴۰-۶۰۹۶-۰۰۰۲-۰۰۰۰

### چکیده

**زمینه و هدف:** دوکسوروبیسین یک داروی شیمی‌درمانی مؤثر است؛ اما کاربرد این دارو به علت سمیت قلبی وابسته به دوز محدود شده است. فعال شدن مسیرهای آپوپتوز در بافت میوکارد نقش مهمی در سمیت قلبی دوکسوروبیسین دارد. مینوسیکلین یک آنتی بیوتیک از دسته تتراسیکلین‌ها است که دارای اثرات ضد آپوپتوز است. در این مطالعه اثرات محافظتی آن در برابر سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین در رت های نر بررسی شد.

**مواد و روش‌ها:** ۴۲ رأس رت نر بالغ به گروه‌های کنترل (نرمال سالین)، دوکسوروبیسین (۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، مینوسیکلین (۴۵ و ۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و درمان (دوکسوروبیسین + مینوسیکلین ۴۵ و ۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تقسیم شدند. مینوسیکلین یک بار در روز به مدت ۳ هفته به صورت داخل پریتونئز تزریق شد. کسر تخلیه (EF) و کسر کوتاه شدگی (FS) با استفاده از روش اکوکاردیوگرافی، فعالیت آنزیم‌های کاسپاز ۷/۳ با روش بیوشیمیایی و میزان بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 با روش Real-time PCR اندازه‌گیری شد.

**یافته‌ها:** در گروه‌های درمان با مینوسیکلین (۴۵ و ۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) فعالیت آنزیم‌های کاسپاز ۷/۳ و بیان ژن Bax به میزان قابل ملاحظه‌ای کمتر و میزان EF، FS و بیان ژن Bcl-2 به میزان قابل ملاحظه‌ای بیشتر از گروه دوکسوروبیسین بود. **نتیجه‌گیری:** مینوسیکلین سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین را کاهش می‌دهد. اثرات ضد آپوپتوز مینوسیکلین احتمالاً نقش مهمی در این اثرات محافظتی دارد.

**کلمات کلیدی:** مینوسیکلین، دوکسوروبیسین، سمیت قلبی، آپوپتوز

وصول مقاله: ۱۴۰۰/۹/۲۰ اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۱/۲/۱۰ پذیرش: ۱۴۰۱/۲/۲۰

## مقدمه

امروزه سرطان دومین علت مرگ و میر در جهان است و ۱ مورد از هر ۶ مرگ رخ داده در جهان ناشی از سرطان است. سرطان‌های ریه، پستان، پروستات، کولورکتال و معده شایع‌ترین انواع سرطان می‌باشند (۱). در ایران سالانه حدود ۱۱۲ هزار نفر به سرطان مبتلا می‌شوند و این بیماری تا ۱۵ سال آینده علت ۸۰ درصد مرگ و میرها در جهان خواهد بود (۲). شیمی‌درمانی از رایج‌ترین روش‌های درمانی برای نابود کردن سلول‌های سرطانی است که غالباً با ایجاد سمیت و عوارض جانبی همراه است که می‌تواند بر کیفیت زندگی بیمار تأثیر بگذارد. از عوارض شایع و اجتناب‌ناپذیر شیمی‌درمانی می‌توان به تهوع و استفراغ، زخم‌های دهانی، ریزش مو، کاهش اشتها و کاهش رده سلول‌های خونی اشاره کرد که می‌تواند بر کیفیت زندگی بیماران تأثیر بگذارد (۳). دوکسوروبیسین یک آنتی‌بیوتیک ضد تومور از دسته آنتراسیکلین‌ها است که از محیط کشت باکتری *Streptomyces peucetius var. caesius* استخراج می‌شود و در درمان انواع مختلف سرطان از قبیل سرطان پستان، تخمدان، مثانه، لنفوما، لوسمی کاربرد دارد (۴). دوکسوروبیسین دارای سمیت قلبی وابسته به دوز است که شدت آن از تغییرات خفیف در ساختار و عملکرد میوکارد تا کاردیومیوپاتی شدید و نارسایی احتقانی قلب متغیر است (۵). نارسایی قلبی ناشی از دوکسوروبیسین در موارد پیشرفته، می‌تواند منجر به نیاز به پیوند قلب یا مرگ بیمار شود. سمیت قلبی دوکسوروبیسین به دو صورت حاد و مزمن بروز می‌کند. سمیت حاد ۲ تا ۳ روز پس از شروع مصرف و سمیت مزمن از ۳۰ روز تا چند سال پس از مصرف آخرین دوز دارو بروز می‌کند (۶). نقش آپوپتوز در سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین به خوبی شناخته شده است. دوکسوروبیسین از طریق اختلال عملکرد میتوکندری و استرس اکسیداتیو باعث القای آپوپتوز در سلول‌های میوکارد می‌شود (۷، ۸).

برنامه‌ریزی شده است که در شرایط طبیعی باعث از بین رفتن سلول‌های پیر و آسیب دیده می‌شود. داروهای شیمی‌درمانی از قبیل دوکسوروبیسین علاوه بر سلول‌های سرطانی باعث القای آپوپتوز در سلول‌های سالم از جمله کاردیومیوسیت‌ها می‌شوند (۹). کاسپازها یک دسته از آنزیم‌های سیستین پروتئاز هستند که در القا و اجرای آپوپتوز نقش حیاتی دارند؛ بنابراین ارزیابی فعالیت کاسپاز به عنوان یک مارکر بیوشیمیایی آپوپتوز مطرح است (۱۰). مینوسیکلین یک آنتی‌بیوتیک از دسته تتراسیکلین‌هاست که در درمان انواع مختلفی از عفونت‌های باکتریایی استفاده می‌شود. مطالعات زیادی نشان داده است که مینوسیکلین دارای اثرات ضد آپوپتوز است (۱۱). مینوسیکلین باعث کاهش قابل توجه بیان آنزیم‌های کاسپاز ۱ و ۳ می‌شود. همچنین مینوسیکلین از طریق افزایش بیان پروتئین‌های ضد آپوپتوز از قبیل Bcl-2 و کاهش بیان پروتئین‌های پیش آپوپتوز از قبیل Bax باعث محافظت از میتوکندری سلول‌های مختلف می‌شود (۱۳، ۱۲). مطالعات گذشته نشان داده است که مینوسیکلین باعث محافظت از نورون‌ها در برابر آپوپتوز القا شده توسط رادیوتراپی می‌شود (۱۴). همچنین در مطالعات بالینی مینوسیکلین نوروپاتی ایجاد شده توسط شیمی‌درمانی را در بیماران مبتلا به سرطان کاهش می‌دهد (۱۵). با وجود اثرات ضد آپوپتوز مینوسیکلین، تا کنون هیچ مطالعه‌ای در زمینه اثرات این دارو در کاهش آپوپتوز ناشی از دوکسوروبیسین در بافت قلب انجام نشده است؛ بنابراین ما در این مطالعه اثرات محافظتی و ضد آپوپتوز مینوسیکلین را در برابر سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین در موش‌های صحرایی بررسی کردیم.

## مواد و روش‌ها

دوکسوروبیسین هیدروکلراید، مینوسیکلین هیدروکلراید، کتامین هیدروکلراید، زایلازین هیدروکلراید از شرکت سیگما آلدردیج خریداری شدند (Sigma Aldrich Co.).

دوکسوروبیسین (۲/۵ میلی گرم بر کیلوگرم) ۳ بار در هفته، در طی ۲ هفته (۶ دوز) به صورت داخل پریتون تزریق شد. اولین تزریق دوکسوروبیسین ۷ روز پس از شروع تزریق مینوسیکلین بود. حجم تزریق در تمام گروه ها ۱/۲۵ میلی لیتر بود.

#### اکوکاردیوگرافی

پس از تجویز آخرین دوز دارو حیوانات با استفاده از تجویز داخل پریتون کتامین (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی گرم بر کیلوگرم) بی‌هوش شدند. موهای ناحیه قفسه سینه حیوانات تراشیده شد و در وضعیت خوابیده به پشت قرار گرفتند. ژل اولتراسوند بر روی قفسه سینه حیوانات مالیده شد. قطر پایان دیاستولیک بطن چپ (LVEDD) و قطر پایان سیستولیک بطن چپ (LVESD) با روش ام-مود اکوکاردیوگرافیک اندازه‌گیری شد. متغیرهای کسر تخلیه (EF) و کسر کوتاه شدگی به روش زیر محاسبه شدند (۱۸):

$$EF (\%) = (LVEDD^3 - LVESD^3) / LVEDD^3$$

$$FS (\%) = (LVEDD - LVESD) / LVEDD$$

#### جمع‌آوری نمونه‌های بافتی:

۲۴ ساعت پس از تجویز آخرین دوز دارو، بیهوشی عمیق در رت‌ها با تزریق داخل پریتون کتامین (150 mg/kg) و زایلازین (15 mg/kg) انجام شد (۱۹). قلب حیوانات از قفسه سینه خارج شد و پس از شستشو با نرمال سالین در دمای ۸۰- درجه سلیسیوس نگه‌داری شد تا برای انجام مطالعات بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گیرد. برای هموژن کردن نمونه‌ها بافت قلب به قطعات کوچک‌تر تبدیل شد. پس از اضافه کردن پتاسیم کلرید 1.5% یک مخلوط هموژن ۱۰ درصد وزنی/حجمی از بافت قلب تهیه شد. مخلوط هموژن به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلیسیوس با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول بالایی جهت انجام آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت (۲۰).

#### Real time PCR (RT-PCR)

USA). این مطالعه با کد اخلاق IR.QUMS.REC.1398.284 در دانشگاه علوم پزشکی قزوین تصویب شده است. در این مطالعه تجربی تعداد ۴۲ رأس رت نر بالغ از نژاد ویستار با وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم از حیوانخانه دانشگاه علوم پزشکی قزوین خریداری شد. حیوانات در قفس‌های جداگانه و در شرایط ۱۲ ساعت نور ۱۲ ساعت تاریکی، در یک اتاق با تهویه مناسب، درجه حرارت ۲۲±۲ درجه سلیسیوس و رطوبت ۷۵±۵ درصد نگه‌داری شدند و در تمام مراحل آزمایش دسترسی آزاد به آب و غذای کافی داشتند. در تمام مراحل آزمایش دستورالعمل اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی (دستورالعمل کمیسیون اروپا) رعایت گردید. حیوانات به صورت تصادفی به ۶ گروه تقسیم شدند که شامل:

گروه کنترل (Control): نرمال سالین (۱/۲۵ میلی لیتر) به مدت ۳ هفته به صورت داخل پریتون تزریق شد.

گروه دوکسوروبیسین (Dox): دوکسوروبیسین (۲/۵ میلی گرم بر کیلوگرم) سه بار در هفته در طی ۲ هفته به صورت داخل پریتون تزریق شد (۱۶).

گروه مینوسیکلین ۱ (Min 45 mg/kg): مینوسیکلین (۴۵ میلی گرم بر کیلوگرم) به صورت یک بار در روز و به مدت ۳ هفته به صورت داخل پریتون تزریق شد (۱۷).

گروه مینوسیکلین ۲ (Min 90 mg/kg): مینوسیکلین (۹۰ میلی گرم بر کیلوگرم) به صورت یک بار در روز و به مدت ۳ هفته به صورت داخل پریتون تزریق شد (۱۷).

گروه درمان ۱ (Dox+Min 45 mg/kg): مینوسیکلین (۴۵ میلی گرم بر کیلوگرم) به صورت یک بار در روز و به مدت ۳ هفته و دوکسوروبیسین (۲/۵ میلی گرم بر کیلوگرم) ۳ بار در هفته، در طی ۲ هفته (۶ دوز) به صورت داخل پریتون تزریق شد. اولین تزریق دوکسوروبیسین ۷ روز پس از شروع تزریق مینوسیکلین بود.

گروه درمان ۲: مینوسیکلین (Dox+Min 90 mg/kg) به صورت یک بار در روز و به مدت ۳ هفته و

انجام شد: بعد از دناتوراسیون اولیه که در ۹۴ درجه به مدت ۳ دقیقه انجام شد، برای بیان ژن های Bax و Bcl-2 و همچنین  $\beta$ -actin به عنوان ژن مرجع، ۴۰ سیکل Amplification انجام شد. هر سیکل شامل یک مرحله دناتوراسیون (۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سلیسیوس)، یک مرحله اتصال (۳۰ ثانیه در ۶۲ درجه سلیسیوس) و یک مرحله elongation (۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سلیسیوس) بود. دمای نهایی elongation ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه بود (۲۱). پرایمرهای Bcl-2، Bax با استفاده از نرم افزار پرایمر-۳ طراحی شدند (۲۱، ۲۲). محصولات نهایی RT-PCR با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت. توالی پرایمرهای Bax و Bcl-2 و  $\beta$ -actin در جدول زیر نشان داده شده است. نتایج آزمایش به روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  مورد ارزیابی قرار گرفت.

برای اندازه گیری مقادیر نسبی بیان ژن های Bax و Bcl-2 از روش RT-PCR استفاده شد. ابتدا میزان کل RNA از نمونه های بافتی با استفاده از محلول RNX-plus شرکت سیناکلون استخراج شد. سپس RNA به دست آمده با استفاده از کیت سنتز cDNA شرکت فرمتناز (RevertAid First Strand cDNA kit, K1622, Fermentase co., China) به صورت معکوس رونویسی شد (RT به مدت ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه سلیسیوس). سپس، واکنش PCR با استفاده از کیت سایبرگرین شرکت تاکارا (TAKARA, Beijing, China) و بر اساس پروتکل شرکت سازنده انجام شد. هر واکنش به صورت Duplicate و در پلت های ۹۶ خانه انجام شد. RT-PCR با استفاده از دستگاه مدل کوربت ۵ ساخت کشور استرالیا و مطابق با شرایط دمایی و زمانی زیر

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در real-time PCR: توالی، دمای ذوب (Tm) و اندازه پرایمرها

اندازه	Tm(°C)	توالی پرایمر	پرایمر
189	57	F:GGACATCCGCAAAGACCTGTA R:ACATCTGCTGGAAGGTGGACA	$\beta$ -actin
154	57	F:TTTGCTTCAGGGTTTCATCC R:CAGCTCCATGTTACTGTCCA	Bax
119	62	F:GTGGATGACTGAGTACCTGA R:AGCCAGGAGAAATCAAACAGA	Bcl-2

آنزیم با اندازه گیری میزان غلظت pNA و به صورت پیکومول در دقیقه در میلی گرم پروتئین بیان می شود. آنالیز آماری داده ها با استفاده از نرم افزار Graphpad prism 8 آنالیز شدند. نتایج مطالعه به صورت Mean $\pm$ SEM گزارش شدند (n=10). میانگین گروه ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و متعاقب آن آزمون توکی مقایسه شدند و  $P < 0.05$  از نظر آماری معنا دار در نظر گرفته شد.

#### یافته ها

اندازه گیری فعالیت آنزیم های کاسپاز ۳ و ۷: فعالیت آنزیم های کاسپاز ۳ و ۷ با استفاده از کیت شرکت کیازیت (KCAS96, Kiazist., Tehran, Iran) با روش کالریمتریک و بر اساس پروتکل شرکت سازنده کیت انجام شد. در این کیت استیل-آسپارتیک اسید-گلوتامیک اسید-والین-آسپارتیک اسید-پارانیتر-آنیلین سوبسترای مشترک آنزیم های کاسپاز ۳ و ۷ است که پس از اتصال به آنزیم موجود در نمونه شکسته شده و تولید پارانیتر-آنیلین (pNA) می کند که رنگ زرد دارد. میزان جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده می شود. فعالیت

دوز کسورویسین + مینوسیکلین ۴۵ و ۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به میزان قابل ملاحظه‌ای بیشتر از گروه دوز کسورویسین است ( $P < 0.01$  (\*\*)). همچنین EF در گروه‌های درمان با مینوسیکلین ۴۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم ( $P < 0.001$  (\*\*\*)) و ۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ( $P < 0.01$  (\*\*)) به میزان قابل ملاحظه‌ای بیشتر از گروه دوز کسورویسین است (جدول ۲).

ارزیابی اکو کاردیوگرافیک عملکرد بطن چپ: نتایج نشان داد که تفاوت قابل ملاحظه‌ای در میزان LVEDD و LVESD بین گروه‌های مختلف وجود ندارد ( $P > 0.05$ ). FS ( $P < 0.05$ ) و EF ( $P < 0.01$ ) در گروه دوز کسورویسین به میزان قابل ملاحظه‌ای کمتر از گروه کنترل است. مقایسه گروه‌های مختلف با گروه دوز کسورویسین نشان داد که FS در گروه‌های درمان

جدول ۲: ارزیابی الکتروکاردیوگرافیک عملکرد بطن چپ در گروه‌های مورد مطالعه. گروه کنترل: تزریق داخل پریتونئال سالیین به مدت ۳ هفته، گروه دوز کسورویسین: تزریق داخل پریتونئال دوز کسورویسین (۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) سه بار در هفته به مدت ۲ هفته، گروه‌های مینوسیکلین ۱ و ۲: تزریق داخل پریتونئال ۴۵ و ۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مینوسیکلین به مدت ۳ هفته، گروه‌های درمان ۱ و ۲: تزریق داخل پریتونئال ۴۵ و ۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مینوسیکلین به مدت ۳ هفته و تزریق داخل پریتونئال دوز کسورویسین (۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) سه بار در هفته به مدت ۲ هفته. قطر پایان دیاستولیک بطن چپ (LVEDD)، قطر پایان سیستولیک بطن چپ (LVESD)، کسر تخلیه (EF) و کسر کوتاه شدگی (۱۳) در گروه‌های مختلف مقایسه شدند. مقادیر به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار مقایسه شده است ( $n=7$ ). ##  $p < 0.01$  اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل. \*  $p < 0.01$ ، \*\*\*  $p < 0.001$  اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه دوز کسورویسین.

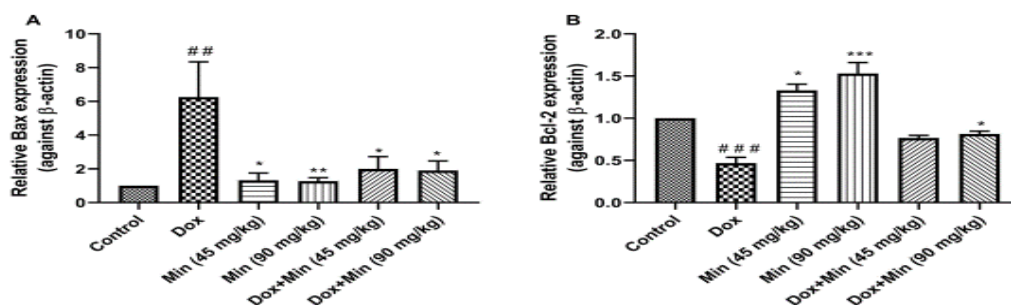
درمان ۲:	درمان	مینوسیکلین ۲ (۹۰)	مینوسیکلین ۱ (۴۵)	دوز کسورویسین	کنترل	گروه‌ها
دوکسورویسین + مینوسیکلین ۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم	دوکسورویسین + مینوسیکلین ۴۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم	مینوسیکلین ۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم	مینوسیکلین ۴۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم			
6.5 $\pm$ 0.24	6.3 $\pm$ 0.36	6.14 $\pm$ 0.26	6.41 $\pm$ 0.34	6.4 $\pm$ 0.25	6.6 $\pm$ 0.24	LVEDD (mm)
4.47 $\pm$ 0.21	4.25 $\pm$ 0.19	4.2 $\pm$ 0.27	4.4 $\pm$ 0.31	5.1 $\pm$ 0.26	4.5 $\pm$ 0.28	LVESD (mm)
31.71 $\pm$ 1.35**	32.71 $\pm$ 1.89**	32.42 $\pm$ 2.43**	31.85 $\pm$ 2.76**	21.14 $\pm$ 1##	32.71 $\pm$ 1.31	FS, %
66.85 $\pm$ 1.98**	68 $\pm$ 2.79***	66.85 $\pm$ 3.82**	66.42 $\pm$ 3.97**	49.57 $\pm$ 1.52##	67.42 $\pm$ 2.21	EF, %

Bax شد ( $P < 0.05$ ); اما تغییر معناداری در بیان ژن Bcl-2 ایجاد نکرد ( $P > 0.05$ ). همچنین درمان با مینوسیکلین در دوز ۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (درمان ۲) باعث کاهش قابل ملاحظه بیان ژن Bax ( $P < 0.05$ ) و افزایش قابل ملاحظه بیان ژن Bcl-2 ( $P < 0.05$ ) در مقایسه با گروه دوز کسورویسین شد. همچنین نتایج حاصل از گروه‌هایی که مینوسیکلین به تنهایی تجویز شده بود، نشان داد که در گروه مینوسیکلین ۱ (۴۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیان ژن Bax به میزان قابل ملاحظه‌ای کمتر و بیان ژن

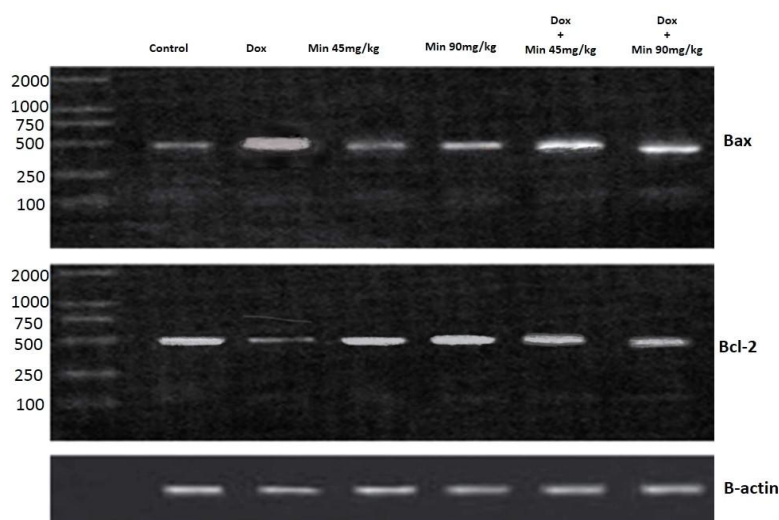
اثرات مینوسیکلین بر میزان بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 در نمونه‌های بافت قلب نتایج RT-pcr نشان داد تجویز داخل پریتونئال دوز کسورویسین (۲/۵ میلی‌گرم سه بار در هفته به مدت ۲ هفته) در مقایسه با گروه کنترل باعث افزایش قابل ملاحظه بیان ژن Bax ( $P < 0.01$ ) و کاهش قابل ملاحظه بیان ژن Bcl-2 ( $P < 0.001$ ) می‌شود. در مقایسه با گروه دوز کسورویسین، درمان با مینوسیکلین در دوز ۴۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم (درمان ۱)، باعث کاهش قابل ملاحظه بیان ژن

معناداری با گروه دوکسوروبیسین داشت (شکل ۱). همچنین تصویر باندهای Bax، Bcl-2 و  $\beta$ -actin در گروه های مورد مطالعه با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد نشان داده شد (شکل ۲)

Bcl-2 به میزان قابل ملاحظه‌ای بیشتر از گروه دوکسوروبیسین است ( $P < 0.05$ ). همچنین در گروه مینوسیکلین ۲ (۹۰ میلی گرم بر کیلوگرم)، بیان ژن های Bax ( $P < 0.01$ ) و Bcl-2 ( $P < 0.001$ ) تفاوت



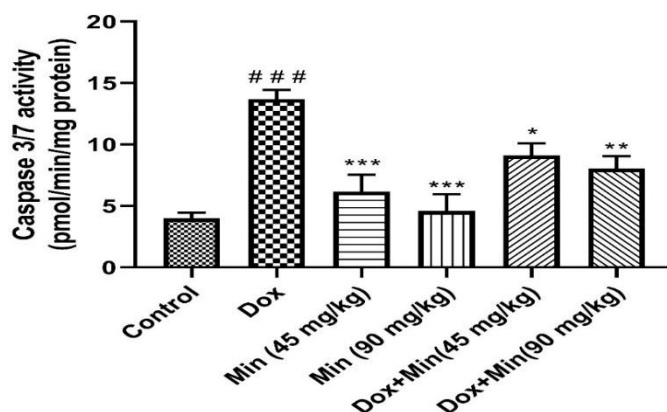
شکل ۱. اثر مینوسیکلین (Min) بر میزان بیان ژن های Bax (A) و Bcl-2 (B) در نمونه های بافت قلب رت های دریافت کننده دوکسوروبیسین (Dox). نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شدند (n=7). گروه کنترل (Control): تزریق داخل پریتونئرمال سالین به مدت ۳ هفته، گروه دوکسوروبیسین (Dox): تزریق داخل پریتونئرم دوکسوروبیسین (۲/۵ میلی گرم بر کیلوگرم) سه بار در هفته به مدت ۲ هفته، گروه های مینوسیکلین ۱ و ۲ (Min 45, 90 mg/kg): تزریق داخل پریتونئرم ۴۵ و ۹۰ میلی گرم بر کیلوگرم مینوسیکلین به مدت ۳ هفته، گروه های درمان ۱ و ۲ (Dox+Min): تزریق داخل پریتونئرم ۴۵ و ۹۰ میلی گرم بر کیلوگرم مینوسیکلین به مدت ۳ هفته و تزریق داخل پریتونئرم دوکسوروبیسین (۲/۵ میلی گرم بر کیلوگرم) سه بار در هفته به مدت ۲ هفته.  $p < 0.05$  \*،  $p < 0.01$  \*\*،  $p < 0.001$  \*\*\*, # # اختلاف معنادار با گروه کنترل، # # #  $p < 0.001$ ، # # #  $p < 0.01$ ، # # #  $p < 0.001$  اختلاف معنادار با گروه دوکسوروبیسین.



شکل ۲: تصویر باندهای Bax، Bcl-2 و  $\beta$ -actin در گروه های مورد مطالعه پس از الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد

دوکسوروبیسین، به میزان قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌دهد. اگرچه، تجویز مینوسیکلین به تنهایی در گروه‌های مینوسیکلین ۱ (۴۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و مینوسیکلین ۲ (۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، تغییر قابل ملاحظه‌ای در فعالیت آنزیم‌های کاسپاز ۳ و ۷، در مقایسه با گروه کنترل ایجاد نمی‌کند ( $P > 0.05$ )؛ اما فعالیت این آنزیم‌ها در این گروه‌ها به میزان معناداری کمتر از گروه دوکسوروبیسین است ( $P < 0.001$ ) (\*\*\*) (شکل ۳).

اثرات مینوسیکلین بر فعالیت آنزیم‌های کاسپاز ۳/۷ در نمونه‌های بافت قلب فعالیت آنزیم‌های کاسپاز ۳ و ۷ در گروه دوکسوروبیسین به میزان قابل ملاحظه‌ای بیشتر از گروه کنترل است ( $P < 0.001$ ####). نتایج در گروه‌های درمان نشان داد که مینوسیکلین در دوزهای ۴۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم ( $P < 0.05$ \*) و ۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ( $P < 0.01$ \*\*\*) فعالیت آنزیم‌های کاسپاز ۳ و ۷ را در مقایسه با گروه



شکل ۳. اثر مینوسیکلین (Min) بر میزان فعالیت آنزیم کاسپاز ۳/۷ در نمونه‌های بافت قلب رت‌های دریافت‌کننده دوکسوروبیسین (Dox). نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شدند ( $n=7$ ). گروه کنترل (Control): تزریق داخل پری‌توتن نرمال سالین به مدت ۳ هفته، گروه دوکسوروبیسین (Dox): تزریق داخل پری‌توتن دوکسوروبیسین (۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) سه بار در هفته به مدت ۲ هفته، گروه‌های مینوسیکلین ۱ و ۲ (Min 45, 90 mg/kg): تزریق داخل پری‌توتن ۴۵ و ۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مینوسیکلین به مدت ۳ هفته، گروه‌های درمان ۱ و ۲ (Dox+Min 45, 90 mg/kg): تزریق داخل پری‌توتن ۴۵ و ۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مینوسیکلین به مدت ۳ هفته و تزریق داخل پری‌توتن دوکسوروبیسین (۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) سه بار در هفته به مدت ۲ هفته. # # #  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  اختلاف معنادار با گروه کنترل، \* اختلاف معنادار با گروه دوکسوروبیسین.

کوتاه شدگی، باعث اختلال عملکرد بطن چپ می‌شود. تجویز هم‌زمان مینوسیکلین با دوکسوروبیسین باعث محافظت از بطن چپ در برابر آسیب قلبی ناشی از دوکسوروبیسین می‌شود. علاوه بر این نتایج نشان داد که دوکسوروبیسین باعث افزایش بیان پروتئین Bax، کاهش بیان پروتئین Bcl-2 و همچنین افزایش فعالیت آنزیم کاسپاز ۳/۷ در بافت میوکارد قلب می‌شود؛ اما تجویز هم‌زمان دوکسوروبیسین با مینوسیکلین آپوپتوز القا شده توسط دوکسوروبیسین را به میزان قابل توجهی مهار می‌کند.

## بحث

دوکسوروبیسین یک داروی شناخته شده در شیمی‌درمانی سرطان است که سمیت قلبی از عوارض جانبی شایع و قابل توجه آن است. مکانیسم‌های متعددی در سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین نقش دارند که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به آپوپتوز اشاره کرد (۲۳). مینوسیکلین یک آنتی‌بیوتیک وسیع‌الطیف از دسته تتراسیکلین‌ها است که دارای اثرات ضد آپوپتوز قابل توجه است (۳۲). نتایج مطالعه نشان داد که دوکسوروبیسین با کاهش معنادار کسر تخلیه و کسر

آپوپتوز در بافت میوکارد قلب می شود (۲۸). همسو با نتایج مطالعات گذشته، نتایج مطالعه ما نشان داد که در رت های دریافت کننده دوکسوروبیسین بیان Bax و همچنین فعالیت آنزیم های کاسپاز ۳ و ۷ در بافت قلب به میزان قابل ملاحظه ای در مقایسه با گروه کنترل افزایش پیدا می کند که نشان دهنده القای آپوپتوز ناشی از دوکسوروبیسین می باشد. علاوه بر این دوکسوروبیسین بیان Bcl-2 به عنوان یک پروتئین ضد آپوپتوز را کاهش داد.

دکسرازوکسان تنها داروی تأیید شده FDA برای پیشگیری از عارضه قلبی ناشی از دوکسوروبیسین است. اگرچه مطالعات اخیر نشان داده است که پیش درمان با این دارو نمی تواند به صورت کامل باعث پیشگیری از سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین شود (۲۹). همچنین در یک مطالعه که در بیماران مبتلا به سرطان پستان انجام شده است، در بیماران دریافت کننده دکسرازوکسان در مقایسه با بیمارانی که دوکسوروبیسین به تنهایی دریافت کرده اند، میزان بالاتری از عوارض هماتولوژیک از قبیل لکوپنی، نوتروپنی و ترومبوسیتوپنی مشاهده شده است (۳۰). مطالعات زیادی در زمینه اثرات محافظتی عوامل آنتی اکسیدانت، ضد التهاب و ضد آپوپتوز در برابر سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین انجام شده است. به عنوان مثال آدیونکتین که دارای اثرات قابل ملاحظه ضد آپوپتوز است از طریق کاهش بیان Bax و افزایش بیان Bcl-2 باعث محافظت از بافت میوکارد در برابر آسیب قلبی ناشی از دوکسوروبیسین می شود (۳۱).

مینوسیکلین یک آنتی بیوتیک نیمه سنتتیک از دسته تتراسیکلین هاست که در بیماری های عفونی مورد استفاده قرار می گیرد. در این مطالعه نتایج نشان داد که درمان با مینوسیکلین با دوزهای ۴۵ و ۹۰ میلی گرم بر کیلوگرم (گروه های درمان ۱ و ۲) باعث افزایش قابل ملاحظه در شاخص های EF و FS در رت های دریافت کننده دوکسوروبیسین می شود. این نتایج نشان می دهد که مینوسیکلین می تواند شدت نارسایی قلبی ناشی از

دوکسوروبیسین به عنوان یک داروی ضد سرطان در بسیاری از بدخیمی ها از قبیل سرطان پستان و لنفوما کاربرد دارد (۲۳). سمیت قلبی دوکسوروبیسین که به صورت حاد و مزمن بروز می کند، یک عارضه جانبی شناخته شده و شایع است که استفاده از این دارو را محدود کرده است (۲۴). لاکتات دهیدروژناز (LDH) و کرانین کیناز (۱۴) به عنوان شاخص های سمیت قلبی در نظر گرفته می شوند و افزایش سطح سرمی آنها نشان دهنده آسیب به عضله میوکارد قلب است. مطالعات زیادی نشان داده است که تزریق دوکسوروبیسین باعث افزایش سطح سرمی LDH و CK-MB می شود (۲۵). در این مطالعه با اندازه گیری پارامترهای اکوکاردیوگرافی عملکرد انقباضی بطن چپ مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج مطالعه نشان داد که شاخص های EF و FS در حیوانات دریافت کننده دوکسوروبیسین به میزان قابل ملاحظه ای کمتر از گروه کنترل است. این نتایج نشان دهنده نارسایی قلبی ناشی از دوکسوروبیسین در مدل های حیوانی است؛ زیرا دوکسوروبیسین قدرت انقباض قلب و میزان کسر تخلیه را در رت ها به میزان قابل ملاحظه ای کاهش داد. مطالعات زیادی در گذشته نشان داده است که دوزهای تجمعی دوکسوروبیسین باعث تغییرات قابل توجه در شاخص های اکوکاردیوگرافی در مدل های حیوانی و همچنین بیماران دریافت کننده دوکسوروبیسین شده است (۲۶).

مکانیسم های مختلفی در سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین مطرح شده است. هر چند هنوز مشخص نیست که کدام از این مکانیسم ها نقش اصلی را در بروز این عارضه جانبی دارند. دوکسوروبیسین باعث فعال شدن آپوپتوز از هر دو مسیر داخلی و خارجی می شود (۲۷). مسیر داخلی وابسته به میتوکندری در سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین نقش مهمی دارد. در این مسیر دوکسوروبیسین با افزایش بیان پروتئین های پیش آپوپتوز از قبیل Bax و کاهش بیان پروتئین های ضد آپوپتوز از قبیل Bcl-2 باعث فعال شدن کاسپاز-۳ و در نتیجه القای

آپوپتوز می شود. با توجه به مطالعات گذشته اثر مینوسیکلین به تنهایی در افزایش بیان Bcl-2 قابل پیش بینی بود. در این مطالعه مینوسیکلین در گروه های درمان در مقایسه با گروه دوکسوروبیسین باعث کاهش بیان پروتئین Bax به عنوان پروتئین پیش آپوپتوز و همچنین افزایش بیان پروتئین Bcl-2 به عنوان پروتئین ضد آپوپتوز در بافت قلب در رت های دریافت کننده دوکسوروبیسین شد. نتایج مطالعه ما نشان داد که مینوسیکلین در گروه های درمان ۱ و ۲ با کاهش فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ و ۷، افزایش بیان Bcl-2 و کاهش بیان Bax ممکن است در مهار آپوپتوز ناشی از دوکسوروبیسین در بافت میوکاردا قلب نقش داشته باشد.

### نتیجه گیری

نتایج مطالعه ما نشان داد که مینوسیکلین اختلال عملکرد بطن چپ ناشی از داروی دوکسوروبیسین را به میزان قابل ملاحظه ای بهبود می بخشد. بخشی از این اثرات محافظتی مینوسیکلین ممکن است مرتبط با اثرات ضد آپوپتوز آن باشد.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین اعلام می دارند. این مطالعه با کد اخلاق IR.QUMS.REC.1397.330 در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی قزوین به ثبت رسیده است. هیچ کدام از نویسندگان این مقاله تعارض منافی برای انتشار این مقاله ندارند.

دوکسوروبیسین را به میزان قابل توجهی کاهش دهد. در مطالعات بالینی گذشته مینوسیکلین باعث کاهش عوارض جانبی ناشی از داروهای شیمی درمانی و رادیوتراپی در بیماران مبتلا به سرطان شده است. به عنوان مثال تجویز مینوسیکلین به مدت ۶ تا ۸ هفته در بیماران مبتلا به سرطان ریه باعث کاهش عوارض جانبی ناشی از داروهای شیمی درمانی از قبیل خستگی، کاهش اشتها، تنگی نفس و سرفه می شود (۳۲). همچنین مینوسیکلین میزان نوروپاتی محیطی را در بیماران مبتلا به سرطان پستان که تحت درمان با پاکلی تاکسل قرار گرفته اند کاهش می دهد (۱۵). اثرات ضد آپوپتوز مینوسیکلین در مطالعات مختلف به اثبات رسیده است. مینوسیکلین با کاهش بیان پروتئین های پیش آپوپتوز، افزایش بیان پروتئین های ضد آپوپتوز و همچنین کاهش فعالیت آنزیم های کاسپاز باعث محافظت از سلول ها در برابر مرگ سلولی برنامه ریزی شده می شود (۳۳). مقایسه گروه های درمان با گروه دوکسوروبیسین نشان داد که مینوسیکلین می تواند میزان آپوپتوز را در بافت قلب به میزان قابل ملاحظه ای کاهش دهد که همسو با مطالعات گذشته است که نشان می دهد مینوسیکلین اثرات ضد آپوپتوز قابل توجهی دارد. با توجه به کاهش شاخص های اکوکاردیوگرافیک توسط مینوسیکلین این دارو احتمالاً نقش قابل توجهی در بهبود علائم نارسایی قلبی در رت های دریافت کننده دوکسوروبیسین دارد. همچنین مقایسه گروه های مینوسیکلین ۱ و ۲ با گروه کنترل نشان داد که مینوسیکلین به تنهایی تغییر قابل ملاحظه ای در شاخص های EF و FS ایجاد نمی کند؛ بنابراین تجویز مینوسیکلین به تنهایی اثرات منفی بر عملکرد قلبی در رت ها ندارد. علاوه بر این مقایسه گروه های مینوسیکلین با گروه کنترل نشان می دهد که تجویز مینوسیکلین تأثیر قابل ملاحظه ای در بیان پروتئین Bax و همچنین فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ و ۷ ندارد. این نتایج نشان می دهد که مینوسیکلین به تنهایی باعث القای آپوپتوز در بافت قلب در رت ها نمی شود. هر چند به میزان کمی باعث افزایش بیان Bcl-2 به عنوان یک پروتئین ضد

1. Hu G, Guo M, Xu J, Wu F, Fan J, Huang Q, et al. Nanoparticles targeting macrophages as potential clinical therapeutic agents against cancer and inflammation. *Frontiers in immunology*. 2019;10:1998.
2. Farhood B, Geraily G, Alizadeh A. Incidence and mortality of various cancers in Iran and compare to other countries: a review article. *Iranian journal of public health*. 2018;47(3):309.
3. El-Kass A, Ragheb MM, Hamed SM, Turkman AM, Zaki AT. Needs and Self-Care Efficacy for Cancer Patients Suffering from Side Effects of Chemotherapy. *Journal of Oncology*. 2021;2021.
4. Douedi S, Carson MP. Anthracycline Medications (Doxorubicin). *Stat Pearls: Stat Pearls Publishing, Treasure Island (FL)*. 2020.
5. Rawat PS, Jaiswal A, Khurana A, Bhatti JS, Navik U. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: An update on the molecular mechanism and novel therapeutic strategies for effective management. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021;139:111708.
6. Cai F, Luis MAF, Lin X, Wang M, Cai L, Cen C, et al. Anthracycline-induced cardiotoxicity in the chemotherapy treatment of breast cancer: Preventive strategies and treatment. *Molecular and clinical oncology*. 2019;11(1):15-23.
7. Christidi E, Brunham LR. Regulated cell death pathways in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Cell Death & Disease*. 2021;12(4):1-15.
8. Jian CY, Ouyang HB, Xiang XH, Chen JL, Li YX, Zhou X, et al. Naringin protects myocardial cells from doxorubicin-induced apoptosis partially by inhibiting the p38MAPK pathway. *Molecular medicine reports*. 2017;16(6):9457-63.
9. Ricci MS, Zong W-X. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. *The oncologist*. 2006;11(4):342.
10. López AR, Monzón P, Acerenza L. A model for the regulation of apoptosis intrinsic pathway: The potential role of the transcriptional regulator E2F in the point of no return. *Journal of Theoretical Biology*. 2021;525:110765.
11. Garrido-Mesa N, Zarzuelo A, Gálvez J. Minocycline: far beyond an antibiotic. *British journal of pharmacology*. 2013;169(2):337-52.
12. Yuan H, Zhang X, Zheng W, Zhou H, Zhang B-Y, Zhao D. Minocycline attenuates kidney injury in a rat model of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2016;39(8):1231-7.
13. Afshari AR, Mollazadeh H, Sahebkar A. Minocycline in Treating Glioblastoma Multiforme: Far beyond a Conventional Antibiotic. *Journal of oncology*. 2020;2020.
14. Gunn GB, Mendoza TR, Garden AS, Wang XS, Shi Q, Morrison WH, et al. Minocycline for symptom reduction during radiation therapy for head and neck cancer: a randomized clinical trial. *Supportive Care in Cancer*. 2020;28(1):261-9.
15. Pachman DR, Dockter T, Zekan PJ, Fruth B, Ruddy KJ, Ta LE, et al. A pilot study of minocycline for the prevention of paclitaxel-associated neuropathy: ACCRU study RU221408I. *Supportive Care in Cancer*. 2017;25(11):3407-16.
16. Piegari E, Cozzolino A, Ciuffreda LP, Cappetta D, De Angelis A, Urbanek K, et al. Cardioprotective effects of miR-34a silencing in a rat model of doxorubicin toxicity. *Scientific reports*. 2020;10(1):1-12.
17. Zhang G, Zha J, Liu J, Di J. Minocycline impedes mitochondrial-dependent cell death and stabilizes expression of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  in spinal cord injury. *Archives of medical science: AMS*. 2019;15(2):475.

18. Georgiadis N, Tsarouhas K, Rezaee R, Nepka H, Kass GE, Dorne JL, et al. What is considered cardiotoxicity of anthracyclines in animal studies Corrigendum in/10.3892/or.2020.7717. *oncology reports*. 2020;44(3):798-818.
19. Procópio IM, Pereira-Sampaio MA, Costa WS, Sampaio FJ, Souza DB. Histomorphometric comparison of the corpus cavernosum of rats submitted to euthanasia with ketamine and xylazine or isoflurane. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2021 Dec 8;36.
20. Argun M, Üzüm K, Sönmez MF, Özyurt A, Karabulut D, Soyersarıca Z, et al. Cardioprotective effect of metformin against doxorubicin cardiotoxicity in rats. *Anatolian Journal of Cardiology*. 2016;16(4):234.
21. Ramezani N, Vanaky B, Shakeri N, Soltanian Z, Fakhari Rad F, Shams Z. Evaluation of Bcl-2 and Bax Expression in the Heart of Diabetic Rats after Four Weeks of High Intensity Interval Training. *Medical Laboratory Journal*. 2019;13(1):15-20.
22. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research*. 2012;40(15):e115-e.
23. Li N, Xie X, Hu Y, He H, Fu X, Fang T, et al. Herceptin-conjugated liposomes co-loaded with doxorubicin and simvastatin in targeted prostate cancer therapy. *American journal of translational research*. 2019;11(3):1255.
24. Abdullah CS, Alam S, Aishwarya R, Miriyala S, Bhuiyan MAN, Panchatcharam M, et al. Doxorubicin-induced cardiomyopathy associated with inhibition of autophagic degradation process and defects in mitochondrial respiration. *Scientific reports*. 2019;9(1):1-20.
25. Zilinyi R, Czompa A, Czegledi A, Gajtko A, Pituk D, Lekli I, et al. The cardioprotective effect of metformin in doxorubicin-induced cardiotoxicity: the role of autophagy. *Molecules*. 2018;23(5):1184.
26. Mitry MA, Edwards JG. Doxorubicin induced heart failure: Phenotype and molecular mechanisms. *IJC heart & vasculature*. 2016;10:17-24.
27. Benzer F, Kandemir FM, Ozkaraca M, Kucukler S, Caglayan C. Curcumin ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity by abrogation of inflammation, apoptosis, oxidative DNA damage, and protein oxidation in rats. *Journal of biochemical and molecular toxicology*. 2018;32(2):e22030.
28. He Y, Yang Z, Li J, Li E. Dexmedetomidine reduces the inflammation and apoptosis of doxorubicin-induced myocardial cells. *Experimental and molecular pathology*. 2020;113:104371.
29. Macedo AV, Hajjar LA, Lyon AR, Nascimento BR, Putzu A, Rossi L, et al. Efficacy of dexrazoxane in preventing anthracycline cardiotoxicity in breast cancer. *Cardio Oncology*. 2019;1(1):68-79.
30. Ceruso MS, Napolitano A, Silletta M, Mazzocca A, Valeri S, Improta L, et al. Use of cardioprotective dexrazoxane is associated with increased myelotoxicity in anthracycline-treated soft-tissue sarcoma patients. *Chemotherapy*. 2019;64(2):105-9.
31. Maruyama S, Shibata R, Ohashi K, Ohashi T, Daida H, Walsh K, et al. Adiponectin ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity through Akt protein-dependent mechanism. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(37):32790-800.
32. Wang XS, Shi Q, Mendoza T, Lin S, Chang JY, Bokhari RH, et al. Minocycline reduces chemoradiation-related symptom burden in patients with non-small cell lung cancer: A phase 2 randomized trial. *International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics*. 2020;106(1):100-7.
33. Naderi Y, Panahi Y, Barreto GE, Sahebkar A. Neuroprotective effects of minocycline on focal cerebral ischemia injury: a systematic review. *Neural regeneration research*. 2020;15(5):773.