

Original Paper

## Effect of doxorubicin on Bcl2 and Bax expression in Rat heart

Mohammadi Gorji S (PhD)<sup>1</sup>, Karimpour Malekshah AA (PhD)\*<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Assistant Professor, Department of Biology, Islamic Azad University, Sari Branch, Sari, Iran. <sup>2</sup>Professor, Department of Anatomy and Embryology, Cellular and Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Science, Sari, Iran.

---

### Abstract

**Background and Objective:** The anthracyclin drug doxorubicin (Adriamycin) is one of the most effective antineoplastic agents, and widely used to treat a number of malignancies. However, its use has been restricted due to the dose-dependent cardiotoxicity. The mechanisms of Doxorubicin - induced cardiotoxicity is not entirely clear. This study investigates the effect of Doxorubicin on Bcl2 and Bax genes expression as key molecules that involve in intrinsic pathway of apoptosis in rat heart.

**Materials and Methods:** In this experimental study Doxorubicin administration, male Wistar rats were exposed to intraperitoneal injections (2.5 mg/kg, six times for 2 weeks, n=20). Animals were randomly assigned to the healthy untreated control (n=10) and to the Doxorubicin treatment groups (n=10). Three weeks after completion of treatment myocardial fibrosis, Bcl2 and Bax genes expression were investigated by Masson's trichrome staining and Real Time- PCR analysis respectively. Statistical analysis was performed using the SPSS-16 and independent samples t-test, Mann-Whitney and Kaplan-Meyer method.

**Results:** Masson's trichrome staining showed that Doxorubicin increased fibrosis in the cardiac muscle (16.4±1) in compare to control group (1±0.79). Real Time- PCR analysis showed that Doxorubicin decreased Bcl2 expression levels (0.1±0.07) and increased Bax expression levels (2.1±0.1) in the myocardium in compare to control group (P<0.01).

**Conclusion:** This study showed that administration of Doxorubicin increase interstitial fibrosis of myocardium and Bax expression levels and decrease Bcl2 expression that are the key genes of mitochondria-dependent apoptotic pathway.

**Keywords:** Doxorubicin, Cardiotoxicity, Myocardium, Fibrosis, Apoptosis, Bcl2, Bax

---

\* **Corresponding Author:** Karimpour Malekshah AA (PhD), E-mail: amalekshah@gmail.com

Received 21 November 2011    Revised 10 January 2012    Accepted 11 January 2012

## اثر داروی داکسوروبیسین بر بیان ژنهای آپوپتوز Bcl2 و Bax قلب موش صحرائی

دکتر سیمین محمدی گرجی<sup>۱</sup>، دکتر عباسعلی کریم پور<sup>۲\*</sup>

۱- استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری.

۲- استاد گروه علوم نشریحی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران.

### چکیده

زمینه و هدف: آنتراسیکلین‌ها یک گروه از آنتی‌بیوتیک‌ها با منشاء میکروبی می‌باشند که در شیمی‌درمانی استفاده می‌شوند و کاربرد بالینی بسیار وسیعی دارند. داکسوروبیسین یا آدریامایسین یکی از قوی‌ترین داروهای آنتراسیکلین است که برای درمان سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرد. هرچند کاردیوتوکسیسیته وابسته به دوز ایجاد شده به وسیله این دارو استفاده از آن را محدود کرده است؛ اما مکانیسم عملکرد این دارو به طور کامل مشخص نشده است. ژنهای Bcl2 و Bax از جمله ژنهای کلیدی مسیر داخلی آپوپتوز می‌باشند. این مطالعه به منظور تعیین اثر داروی داکسوروبیسین بر بیان ژنهای آپوپتوز Bcl2 و Bax قلب موش صحرائی انجام شد.

روش بررسی: این مطالعه تجربی روی ۲۰ سر موش صحرائی نر نژاد ویستار ۱۰-۹ هفته‌ای با وزن تقریبی ۲۰۰-۱۸۰ گرم انجام شد. حیوانات به طور تصادفی به دو گروه ۱۰ تایی کنترل و آزمایش تقسیم شدند. به گروه آزمایش ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم از داکسوروبیسین طی دو هفته به صورت داخل صفاقی طی ۶ دوز مساوی و هر دوز برابر ۲/۵ mg/kg تزریق شد. سه هفته بعد از آخرین تزریق، فیروز درون میوکارد و بیان ژنهای Bcl2 و Bax به ترتیب به وسیله رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون و Real Time-PCR مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-16 و آزمون‌های تی مستقل، Kaplan-Meier و Mann-Whitney تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: داکسوروبیسین فیروز درون میوکارد (۱۶/۱۴±۱) را به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل (۱±۰/۷۹) افزایش داد ( $P < ۰/۰۱$ ). همچنین نتایج حاصل از Real Time-PCR نشان دادند که در گروه داکسوروبیسین بیان ژن آنتی‌آپوپتوتیک Bcl2 در مقایسه با گروه کنترل (به ترتیب ۰/۱±۰/۰۷ و ۱) کاهش پیدا کرده است. همچنین میزان بیان ژن پروآپوپتوتیک Bax در گروه داکسوروبیسین در مقایسه با گروه کنترل (به ترتیب ۰/۱±۰/۲ و ۱) ( $P < ۰/۰۱$ ) افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که داکسوروبیسین فیروز درون میوکارد را افزایش می‌دهد و موجب کاهش بیان ژن Bcl2 و افزایش بیان ژن Bax می‌گردد.

کلید واژه‌ها: داکسوروبیسین، کاردیوتوکسیسیته، میوکارد، فیروز، آپوپتوز، Bcl2، Bax

\* نویسنده مسئول: دکتر عباسعلی کریم پور، پست الکترونیکی amalekshah@gmail.com

نشانی: ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده پزشکی، دپارتمان آناتومی و جنین‌شناسی، تلفن ۲۱۳۳۷۶۰، شماره ۲۱۳۳۷۵۱-۰۱۵۱  
وصول مقاله: ۹۰/۸/۳۰، اصلاح نهایی: ۹۰/۱۰/۲۰، پذیرش مقاله: ۹۰/۱۰/۲۱

### مقدمه

شود. آسیب مزمن ۲۰-۴ سال بعد از مصرف بروز می‌کند و موجب کاردیومیوپاتی می‌شود (۶۵). مکانیسم آنتی‌تومور داکسوروبیسین از طریق مهار کردن آنزیم‌های توپوایزومراز ۲ و DNA سنتتاز است و با مکانیسم کاردیوتوکسیک آن کاملاً متفاوت است (۷). داکسوروبیسین با تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن موجب آسیب به غشاء میتوکندری، آزاد شدن سیتوکروم C و در نتیجه القاء آپوپتوز در کاردیومیوسیت‌ها می‌شود (۹و۸). آزاد شدن سیتوکروم C به وسیله خانواده پروتئین‌های Bcl-2 که در غشاء داخلی میتوکندری واقع شده‌اند؛ کنترل می‌شود (۱۰). پروتئین‌های خانواده Bcl-2 از دو گروه آنتی‌آپوپتوتیک و پروآپوپتوتیک تشکیل شده‌اند.

آنتراسیکلین‌ها یک گروه از آنتی‌بیوتیک‌ها با منشاء میکروبی می‌باشند که در شیمی‌درمانی استفاده می‌شوند و کاربرد بالینی بسیار وسیعی دارند. داکسوروبیسین یا آدریامایسین یکی از قوی‌ترین داروهای آنتراسیکلین است که برای درمان چندین نوع از سرطان‌ها مانند کارسینوما، لیمفوما و سارکوما مورد استفاده قرار می‌گیرد؛ هرچند کاردیوتوکسیسیته حاد و مزمن وابسته به دوز ایجاد شده به وسیله این دارو، استفاده از آن را محدود کرده است (۴-۱). آسیب حاد سریعاً بعد از درمان اتفاق می‌افتد و ممکن است موجب آریتمی موقت، پریکاردیت و اختلال موقت در عملکرد بطن چپ

برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرون تهیه و با تری کروم‌ماسون رنگ‌آمیزی شدند. برای بررسی میزان فیبروز در میوکارد برش‌های عرضی به طور تصادفی از سه سطح تحتانی، میانی و فوقانی تهیه شد و از هر سطح ۵ برش (در هر موش ۱۵ برش) بررسی گردید. سپس لام‌های تهیه شده به وسیله نرم‌افزار آنالیز کننده تصاویر (Olympus microscope and Olysa software) اسکن شد و نواحی رسوب کلاژن مورد محاسبه قرار گرفت. برای تعیین تجمع کلاژن در بافت برش‌های عرضی در سه سطح پایه، میانی و تحتانی از قلب حیوان به دست آمد. سپس از هر سطح پنج برش به طور تصادفی (۱۵ برش در هر حیوان) انتخاب و بررسی شد. برای بررسی از تمام مناطق هر لام عکسبرداری شد و تمام بخش‌های تجمع کلاژن اندازه‌گیری شد. سپس مجموع مناطق تجمع کلاژن تقسیم بر اندازه کل لام شد.

#### استخراج RNA و سنتز cDNA

برای بررسی بیان ژن‌های آپوپتوتیک از ۳ سر موش هر دو گروه به مقدار ۵۰ mg بافت از بطن چپ جدا شد و در محلول Qiazol Lysis Regnant (Qiagen, Europe) هموژنایز شد. سپس RNA کل بافت با استفاده از کیت مخصوص (RNeasy lipid tissue mini Kit, Qiagen, Europe) بر طبق پروتکل استخراج شد و با استفاده از پیکودراپ (picodrop spectrometer, UK) مقدار خلوص RNA کل تعیین و نسبت جذب نوری (Optical Density: OD) RNA در طول موج‌های ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر سنجیده شد. در این مطالعه از نمونه‌هایی که نسبت OD ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر آنها بین ۱/۸ تا ۲/۲ بود برای سنتز cDNA استفاده گردید. سپس مقدار یک میکروگرم از RNA را با استفاده از کیت مخصوص (Quantitect Reverse transcription Kit, QIAGEN, Europe) طبق پروتکل به cDNA تبدیل نمودیم. به طور خلاصه ابتدا نمونه‌های RNA به منظور حذف DNA ژنومی به مدت ۲ دقیقه در gDNA Wipout buffer در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از این مرحله نمونه‌های RNA برای ساخت cDNA آماده شدند. واکنش کلی در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و سپس یک مرحله انکوباسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. به دنبال

گروه آنتی‌آپوپتوتیک شامل Bcl-2 و Bcl-XL است که از آزاد شدن سیتوکروم C به‌درون سیتوزول جلوگیری می‌کند و گروه پروآپوپتوتیک از Bax و Bad تشکیل شده است که موجب آزاد شدن سیتوکروم C از میتوکندری به سیتوزول می‌شوند (۱۱)؛ اما اثر داکسوروبیسین روی بیان ژن‌های خانواده Bcl-2 به‌درستی مشخص نشده است. این مطالعه به منظور تعیین اثر داروی داکسوروبیسین بر بیان ژن‌های آپوپتوز Bcl2 و Bax قلب موش صحرایی انجام شد.

#### روش بررسی حیوانات آزمایشگاهی

این مطالعه تجربی روی ۲۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار ۹-۱۰ هفته‌ای با وزن تقریبی ۲۰۰-۱۸۰ گرم تهیه شده از انستیتو پاستور آمل در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشکده پزشکی ساری در سال ۱۳۸۹ انجام شد.

موش‌ها در حیوانخانه مرکزی دانشگاه علوم پزشکی مازندران در دمای ۲۴-۲۲ درجه سانتی‌گراد و ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری و با غذای تجاری مخصوص جوندگان تغذیه شدند. بعد از سازش حیوانات به محیط جدید، به‌طور تصادفی به دو گروه ۱۰ تایی کنترل و آزمایش تقسیم شدند. در این مطالعه تمامی نکات پروتکل بین‌المللی کار بر روی حیوانات رعایت گردید.

#### روش تزریق داکسوروبیسین

به گروه آزمایش ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم از داکسوروبیسین (کمپانی Pharmacia آمریکا) طی دو هفته به صورت داخل صفاقی طی ۶ دوز مساوی و هر دوز برابر ۲/۵ mg/kg تزریق شد (۱۲). این دوز مساوی با دوز تزریقی در بیماران سرطانی است که موجب ایجاد برادیکاردی و کاهش قدرت انقباض قلب می‌شود (۱۳). سپس موش‌ها سه هفته بعد از آخرین تزریق مورد بررسی قرار گرفتند و مرگ و میر آنها محاسبه شد.

#### بررسی بافتی میوکارد

سه هفته بعد از اتمام تزریق داکسوروبیسین موش‌ها قربانی شدند و قلب حیوانات (از هر گروه ۳ نمونه) جمع‌آوری شد و به‌سرعت بطن‌ها از دهلیزها جدا شدند. سپس بطن‌ها به مدت ۲۴ ساعت در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شدند. پس از انجام مراحل تهیه بافت،

جدول ۱: توالی، اندازه و دمای اتصال پرایمرهای استفاده شده

نام	primer sequence(5'-3')	Size(bp)	Annealing درجه سانتی‌گراد
Bax	F:CCAGGACGCATCCACCAAGAAGC R:TGCCACACGGAAGAAGACCTCTCG	۱۳۶	۶۰
Bcl2	F: GGATGACTTCTCTCGTACCGT R:CGAGTGAGGATGTGCATGAA	۱۱۸	۶۰
B-actin	F:GAACCCTAAGGCCAACCGTG R:AGGCATACAGGGACAACACAGC	۱۰۵	۵۹

Kaplan-Meyer و تست log-rank تعیین شد. بررسی بیان نسیبی ژن‌ها بر اساس مقایسه سیکل‌های آستانه نمونه‌های هر سه گروه با روش  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak) انجام شد و روش Mann-Whitney برای تجزیه و تحلیل داده‌ها به کار رفت. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

#### یافته‌ها

##### وزن حیوانات و میزان مرگ و میر

سه هفته بعد از آخرین تزریق داکسوروبیسین میزان بقا در گروه کنترل ۱۰۰ درصد بود؛ اما در گروه آزمایش به ۲۵ درصد رسید (۰/۰۵ < P، شکل یک). وزن حیوانات گروه آزمایش (۳/۳۷۴۷۴ ± ۱/۴۸۵) نسبت به گروه کنترل (۹/۷۷۵۲۵ ± ۱/۸۳۰) کاهش یافت (P < ۰/۰۱).

##### مطالعات بافتی

در بررسی نمونه‌های بافتی حفرات قلبی در گروه آزمایش در مقایسه با گروه کنترل اتساع پیدا کردند (شکل ۲). با توجه به رنگ آمیزی تری کروم ماسون، میزان فیبروز در فضای میان بافتی گروه آزمایش (۱ ± ۱۶/۱۴) افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل (۷۹ ± ۱) پیدا کرد (P < ۰/۰۱، شکل ۳).

##### منحنی استاندارد و تجزیه و تحلیل منحنی ذوب

پس از ترسیم منحنی استاندارد برای ژن مرجع (B-actine) و ژن‌های Bcl2 و Bax شیب منحنی استاندارد برای هر کدام از این ژن‌ها به ترتیب ۳/۱۴۰-، ۳/۴۴۵- و ۳/۱۸۹- محاسبه شد. میزان بازده واکنش با استفاده از شیب منحنی استاندارد برای هر یک از این ژن‌ها به ترتیب ۱۰۵ درصد، ۹۵/۱ درصد و ۱۰۵ درصد به دست آمد. همچنین نمودارهای به دست آمده از منحنی ذوب تکثیر اختصاصی قطعات ژنی مورد نظر، عدم جفت شدن پرایمرها و عدم تکثیر غیر اختصاصی برای هر ژن را نشان داد.

##### بیان ژن‌ها

در گروه آزمایش سطح بیان ژن آنتی آپوپتوتیک Bcl2  $0.7259 \pm 0.1856$  در مقایسه با گروه کنترل کاهش پیدا کرد (P < ۰/۰۱). همچنین میزان بیان ژن پرو آپوپتوتیک Bax  $(0.1873 \pm 0.1840)$  در مقایسه با گروه کنترل  $(0.2281 \pm 0.1573)$  افزایش یافت (P < ۰/۰۱).

##### بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که داکسوروبیسین باعث اتساع حفرات قلبی در مقایسه با گروه کنترل می‌شود. در مطالعه‌ای نیز کاردیوتوکسیسیته ایجاد شده با داکسوروبیسین با اتساع حفرات قلبی همراه بود (۱۴).

به علاوه مطالعه حاضر مشخص کرد که سه هفته بعد از اتمام تزریق داکسوروبیسین میزان فیبروز در فضای بافتی قلب افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل پیدا نموده است. در مطالعه Chen و

سنتز cDNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) (polymerase chain reaction) صورت گرفت.

##### واکنش Real-time PCR (SYBER Green)

تمام واکنش‌های Real-time PCR در دستگاه iCycler IQ5 (کمپانی Bio Rad آمریکا) انجام شد. پرایمرهای ژن‌های آپوپتوتیک (Bcl2, Bax) و ژن B-actin (ژن رفرنس) در جدول یک توصیف شده است. این واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر به صورت تکرار دوتایی در لوله‌های ۹۶ تایی انجام شد. ترکیبات هر واکنش شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از QantiFast SYBR® Green PCR Master Mix (Qiagen, Europe)، ۹/۵ میکرولیتر از آب دیونایز و ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ پیکومولار و ۲ میکرولیتر cDNA الگو بود.

برنامه زمانی - دمایی دستگاه در سه مرحله تنظیم گردید:

مرحله اول منجر به واسرشتگی (denaturation) مولکول‌های cDNA می‌شود (۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه). مرحله دوم ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای واسرشتگی، ۳۵ ثانیه در دماهای مختلف اتصال (جدول یک) برای جفت شدن (annealing) و ۳۰ ثانیه در ۷۲ سانتی‌گراد در ۴۰ سیکل متوالی بود. مرحله سوم ۳ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای کشیدگی (extension) انجام شد.

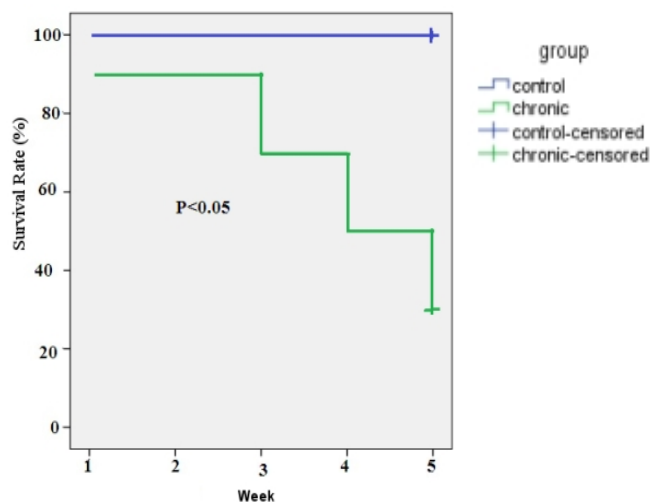
برای تایید تکثیر قطعات اختصاصی هر ژن و عدم حضور محصولات غیر اختصاصی و جفت شدن پرایمرها در مطالعات ابتدایی از الکتروفورز با ژل آگارز ۲ درصد و به صورت روتین از منحنی ذوب (Melting curve) استفاده شد. برای ترسیم منحنی ذوب، دما در هر تکرار از ۵۰ تا ۹۹ درجه سانتی‌گراد هر ۵ ثانیه یک درجه افزایش یافت.

##### رسم منحنی استاندارد

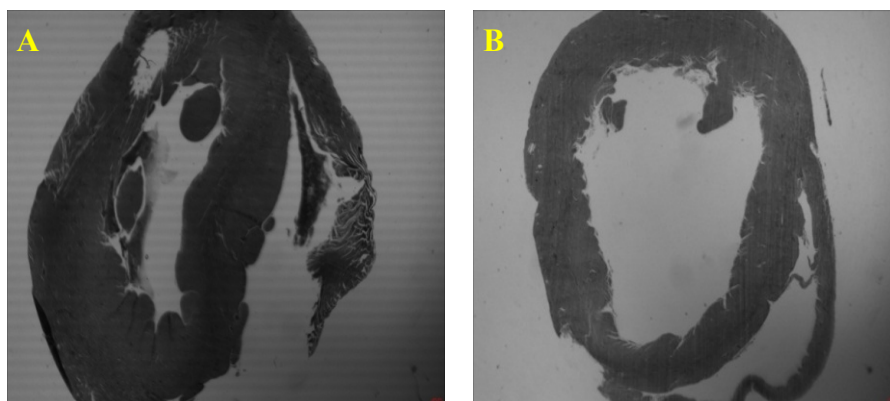
یکی از cDNA های کنترل دارای غلظت مناسب، انتخاب شد و سپس رقت‌های متوالی از آن [۵۴-۵۱] را برای رسم منحنی استاندارد مورد استفاده قرار دادیم. منحنی استاندارد بر اساس لگاریتم غلظت cDNA (محور افقی) و سیکل آستانه (Ct) (محور عمودی) برای هر ژن ترسیم شد. میزان بازده PCR (PCR efficiency) بر اساس منحنی استاندارد برای هر ژن تعیین گردید. از نمونه فاقد cDNA الگو به عنوان کنترل منفی استفاده نمودیم. برای هر واکنش PCR یک منحنی تکثیر (Amplification Curve) رسم شد. تجزیه و تحلیل بر اساس مقایسه سیکل‌های آستانه (Ct Value) نمونه‌های گروه تزریقی داکسوروبیسین و گروه کنترل صورت گرفت.

##### تجزیه و تحلیل داده‌ها

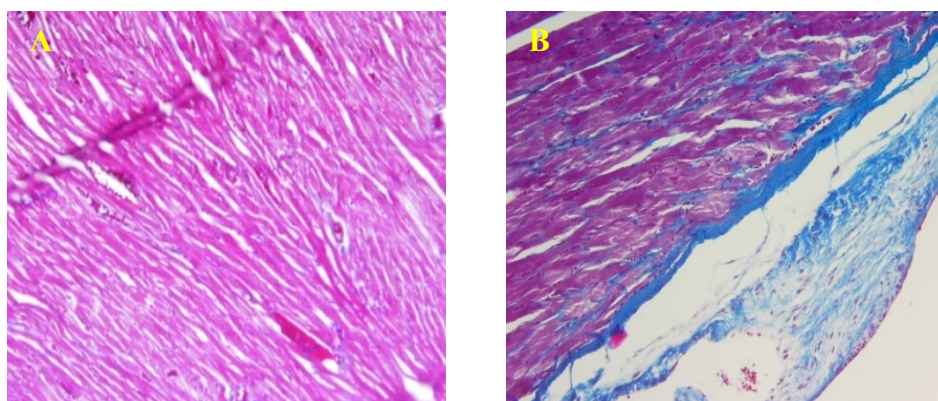
داده‌ها در نرم افزار آماری SPSS-16 ثبت شدند و میزان فیبروز میوکارد با استفاده از آزمون تی مستقل و میزان بقا از روش



شکل ۱: اثر داکسوروبیسین بر میزان بقا (Kaplan-Meyer method)



شکل ۲: برش عرضی از بطن چپ در قسمت میانی، A گروه کنترل، B گروه داکسوروبیسین



شکل ۳: داکسوروبیسین موجب افزایش فیروز در میوکارد در مقایسه با گروه کنترل شده است. رنگ آمیزی تری کروم ماسون، بزرگنمایی ۴۰ برابر A گروه کنترل، B گروه داکسوروبیسین

قبلی بر روی کشت کاردیومیوسیت‌ها نیز نشان دادند که داکسوروبیسین موجب افزایش بیان ژن Bax و از طرفی موجب کاهش بیان ژن Bcl-2 و در نهایت موجب القاء آپوپتوز در کاردیومیوسیت‌ها شده است (۱۵ و ۱۶). پروتئین‌های خانواده Bcl-2 یکپارچگی غشاء خارجی

همکاران نیز تزریق داکسوروبیسین با افزایش میزان فیروز در میوکارد موش صحرایی همراه بود (۱۵).

در مطالعه حاضر داکسوروبیسین باعث افزایش بیان ژن پروآپوپتوتیک Bax و در عین حال موجب کاهش بیان ژن آنتی آپوپتوتیک Bcl-2 در مقایسه با گروه کنترل گردید. مطالعات

### نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که داکسوروبیسین فیروز درون میوکارد را افزایش می‌دهد و موجب کاهش بیان ژن Bcl2 و افزایش بیان ژن Bax می‌گردد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه خانم سیمین محمدی گرجی برای اخذ درجه دکتری در رشته زیست‌شناسی جانوری گرایش تکوین از دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران بود و بودجه این پایان‌نامه توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران تامین گردید.

### References

1. Ferreira AL, Matsubara LS, Matsubara BB. Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2008 Oct;6(4):278-81.
2. Chen Q, Alexander D, Sun H, Xie L, Lin Y, Terrand J, et al. Corticosteroids inhibit cell death induced by doxorubicin in cardiomyocytes: induction of anti-apoptosis, antioxidant and detoxification genes. *Mol Pharm*. 2005;67(6):1861-73.
3. Frias MA, Lang U, Gerber-Wicht C, James RW. Native and reconstituted HDL protect cardiomyocytes from doxorubicin-induced apoptosis. *Cardiovasc Res*. 2010 Jan;85(1):118-26.
4. Shan K, Lincoff AM, Young JB. Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Ann Intern Med*. 1996 Jul;125(1):47-58.
5. Takemura G, Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog Cardiovasc Dis*. 2007 Mar-Apr;49(5):330-52.
6. Singal PK, Iliskovic N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 1998 Sep; 339: 900-5.
7. Mizutani H, Tada-Oikawa S, Hiraku Y, Kojima M, Kawanishi S. Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. *Life Sci*. 2005 Feb;76(13):1439-53.
8. Frias MA, Somers S, Gerber-Wicht C, Opie LH, Lecour S, Lang U. The PGE2-Stat3 interaction in doxorubicin-induced myocardial apoptosis. *Cardiovasc Res*. 2008 Oct;80(1):69-77.
9. Chandran K, Aggarwal D, Migrino RQ, Joseph J, McAllister D, Konorev EA, et al. Doxorubicin inactivates myocardial cytochrome c oxidase in rats: cardioprotection by Mito-Q. *Biophys J*. 2009 Feb;96(4):1388-98.

میتوکندری را حفظ می‌کنند و از اعضاء آنتی‌آپوپتوتیک و پروآپوپتوتیک تشکیل شده‌اند. این خانواده آزاد شدن سیتوکروم C به درون سیتوزول و در نتیجه فعال شدن، caspase-3 را تنظیم می‌کنند (۱۷ و ۱۸). در مطالعه حاضر نیز با افزایش بیان ژن Bax و از طرفی کاهش بیان ژن Bcl2، بعد از تزریق داکسوروبیسین، ناپایداری غشاء میتوکندری افزایش یافت و در نتیجه نفوذپذیری آن نسبت به سیتوکروم C افزایش پیدا کرد. لذا می‌توان نتیجه گرفت که تزریق داکسوروبیسین باعث آسیب غشاء میتوکندری و در نتیجه ایجاد آپوپتوز از طریق مسیر داخلی در میوکارد موش صحرایی شده است. هرچند که مطالعات بعدی برای یافتن سایر مسیرهایی که داکسوروبیسین در آنها دخالت می‌کند؛ مورد نیاز است.

10. Susin SA, Zamzami N, Kroemer G. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Aug 10;1366(1-2):151-65.
11. Golstein P. Controlling cell death. *Science*. 1997 Feb; 275(5303):1081-2.
12. Yen HC, Oberley TD, Vichitbandha S, Ho YS, St Clair DK. The protective role of manganese superoxide dismutase against adriamycin-induced acute cardiac toxicity in transgenic mice. *J Clin Invest*. 1996 Sep 1;98(5):1253-60.
13. Taniyama Y, Walsh K. Elevated myocardial Akt signaling ameliorates doxorubicin-induced congestive heart failure and promotes heart growth. *J Mol Cell Cardiol*. 2002 Oct;34(10):1241-7.
14. Ryu SM, Kim HJ, Cho KR, Jo WM. Myocardial protective effect of tezosentan, an endothelin receptor antagonist, for ischemia-reperfusion injury in experimental heart failure models. *J Korean Med Sci*. 2009 Oct;24(5):782-8.
15. Chen X, Chen Y, Bi Y, Fu N, Shan C, Wang S, et al. Preventive cardioprotection of erythropoietin against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2007 Oct;21(5):367-74.
16. Green PS, Leeuwenburgh C. Mitochondrial dysfunction is an early indicator of doxorubicin-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Oct;1588(1):94-101.
17. Chen B, Peng X, Pentassuglia L, Lim CC, Sawyer DB. Molecular and cellular mechanisms of anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol*. 2007;7(2):114-21.
18. Nicholson DW, Thornberry NA. Apoptosis. Life and death decisions. *Science*. 2003 Jan;299(5604):214-5.