Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences

Babaei Kouchaki, et al. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2025;47(3): 287-.297.
doi:10.34172/mj.025.33773
https://mj.tbzmed.ac.ir

TUOMS PRESS

Original Article

The effect of pre-treatment with Troxerutin on myocardial fibrosis in rats with doxorubicin-induced cardiotoxicity

Sara Babaei Kouchaki[1], Reza Badalzadeh[2,3], Vahab Babapour[1], Negar Panahi[1], Ahmad Jamei Khosroshahi[4*]

[1]Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran
[2]Molecular Medicine Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[3]Department of Physiology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[4]Pediatric Health Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

ARTICLE INFO

Article History:
Received: 31 Jul 2024
revised: 2 Nov 2024
Accepted: 6 Nov 2024
ePublished: 13 Jul 2025

Keywords:
- Doxorubicin
- Troxerutin
- Myocardial fibrosis
- Cardiotoxicity
- Antioxidant

Abstract

Background. Doxorubicin (DOX) is a highly effective anthracycline drug widely used in cancer treatment. Myocardial fibrosis, a key pathological consequence of DOX-induced cardiotoxicity, impairs cardiac function and increases the risk of heart failure. Troxerutin (TXR), a natural bioflavonoid, has shown promise in mitigating myocardial injury. This study evaluated the protective effects of TXR against DOX-induced myocardial fibrosis and expression of fibrosis markers, TGF-β and Smad3.

Methods. Twenty-four male Wistar rats were randomly divided into four groups: control, TXR, DOX, and DOX+TXR. TXR was administered orally at 150 mg/kg daily for 4 weeks before treatment with DOX. DOX was injected intraperitoneally at 20 mg/kg. One week after the administration of DOX, serum lactate dehydrogenase (LDH) activity was measured to assess myocardial damage, and myocardial fibrosis was evaluated histologically using Masson's trichrome staining. Gene expression of TGF-β and Smad3 was analyzed by real-time PCR.

Results. DOX significantly increased serum LDH activity and myocardial fibrosis compared to controls (P<0.01). Pre-treatment with TXR significantly reduced LDH activity and myocardial fibrosis in the DOX+TXR group compared to the DOX group (P<0.05). Additionally, TXR decreased the expression of TGF-β (and Smad3 (P<0.01) genes, indicating a reduction in fibrotic signaling.

Conclusion. TXR shows significant potential as a preventive treatment for DOX-induced myocardial toxicity. Its ability to reduce myocardial damage and fibrosis while modulating key fibrotic signaling molecules offers a promising approach for improving cardiac outcomes following DOX therapy.

Practical Implications. Troxerutin could be used as an effective preventative treatment for improving cardiovascular health in cancer patients undergoing chemotherapy with DOX.

How to cite this article: Babaei Kouchaki S, Badalzadeh R, Babapour V, Panahi N, Jamei Khosroshahi A. The effect of pre-treatment with Troxerutin on myocardial fibrosis in rats with doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*.2025; 47(3):287-297. doi:10.34172/mj.025.33773. Persian.

*Corresponding author; Email: jamriak@tbzmed.ac.ir
© 2025 The Authors. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution CC BY 4.0 License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Extended Abstract

Background

Doxorubicin (DOX) is a potent anthracycline drug widely used in the treatment of various cancers. However, its clinical use is significantly restricted due to severe cardiotoxicity, which is a severe condition characterized by progressive and often irreversible heart damage, manifesting acutely within days of DOX administration or chronically over time. Myocardial fibrosis, a prominent feature of DOX-induced cardiotoxicity, contributes significantly to progressive cardiac dysfunction. Two key factors in the development of fibrosis are transforming growth factor-beta (TGF-β) and its downstream molecule Smad3, which mediates the TGF-β-induced fibrogenic signaling in myocardial fibrosis. While troxerutin (TXR) has shown to be effective in reducing oxidative stress and regulating mitochondrial biogenesis in DOX-induced cardiotoxicity, its effict on myocardial fibrosis remains unknown. This study aimed to investigate the preventive effects of TXR on DOX-induced myocardial fibrosis, focusing on histological fibrotic changes and the expression of fibrosis-regulating genes in myocardial tissue in rats.

Methods

Twenty-four male Wistar rats weighing 250-300 g were used in this study and kept in the animal facility under controlled conditions with a 12-hour light/dark cycle. They had free access to standard food and water throughout the experiment. The animals were randomly assigned to four groups: (1) the control group without treatment, (2) the TXR group receiving only TXR, (3) the DOX group receiving only DOX, and (4) the DOX+TXR group receiving both TXR and DOX. TXR was administered orally at 150 mg/kg daily for 4 weeks before the administration of DOX. Doxorubicin hydrochloride at a dose of 20 mg/kg was administered intraperitoneally to DOX-receiving groups. Saline was administered to the control group. One week after DOX injection, the animals were deeply anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (60 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). About 2 mL of blood was collected from the portal vein and the heart was immediately removed from the body after thoracotomy. The left ventricle was divided into two parts: one part was used to examine the expression of genes and the other part was used to examine the histological changes of fibrosis. The activity of lactate dehydrogenase (LDH) in serum was measured using the ELISA method to evaluate the extent of myocardial cell damage. Myocardial fibrosis was assessed through Masson's trichrome staining of paraffin-embedded heart sections and analyzed using light microscopy according to the standard protocol. The severity of fibrosis was quantified by measuring the ratio of stained pixels to total pixels in twenty random microscopic fields of left ventricular slices and calculated based on the average intensity of pixels for each heart in each group. RNA was extracted from myocardial tissue, and real-time PCR was used to quantify the expression of TGF-β and Smad3. The relative quantification of the target mRNAs was normalized to the expression level of GAPDH and the changes in gene expression were reported using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ formula.

Results

Administration of DOX resulted in a significant increase in serum LDH activity, which serves as a marker of myocardial damage, compared to the control group ($P<0.01$). This increase in LDH levels was accompanied by pronounced myocardial fibrosis, as evidenced by Masson's trichrome staining of heart tissue sections. In contrast, treatment with TXR in the DOX+TXR group significantly mitigated the adverse effects of DOX. The administration of TXR led to a marked reduction in serum LDH levels in comparison to the control group ($P<0.05$), indicating a decrease in myocardial damage. Histopathological examination further revealed that TXR substantially reduced the extent of fibrosis compared to the DOX group. Treatment of DOX-receiving rats with TXR displayed a notable decrease in fibrotic areas, suggesting a protective effect of TXR against DOX-induced myocardial fibrosis.

Additionally, real-time PCR analysis of myocardial tissue revealed that treatment with TXR significantly decreased the expression levels of key fibrosis-regulating molecules, TGF-β ($P<0.05$) and its downstream signaling molecule Smad3 ($P<0.01$), compared to the DOX group. The reduced expression of TGF-β and Smad3 in the DOX-receiving rats treated with TXR indicates a potential mechanism through which TXR exerts its protective effect by modulating fibrogenic signaling pathways.

Conclusion

TXR shows significant potential as a preventive treatment for myocardial fibrosis induced by DOX in rats. This protective effect was accompanied by decreased histopathological fibrotic changes and the expression levels of TGF-β and Smad3 genes in rats pretreated with TXR, suggesting that TXR counteracts fibrotic alterations and signaling pathways activated by DOX. This natural bioflavonoid has been shown to reduce oxidative stress and inflammation, which are key factors in myocardial fibrotic damage. By reducing oxidative and inflammatory reactions, TXR may help prevent the activation of the fibrosis-promoting TGF-β/Smad3 pathway. The efficacy of TXR in reducing myocardial damage/fibrosis and regulating key fibrotic molecules make it a promising agent for improving cardiac outcomes in patients undergoing DOX therapy. Further studies are needed to clarify mechanisms of action of TXR, its optimal dosing, and its long-term effects and to explore its interactions with other cardioprotective agents used in cancer treatment regimens.

بابائی‌کوچکی و همکاران. مجله *پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز*. مرداد و شهریور ۱۴۰۴؛ ۴۷(۳): ۲۸۷-۲۹۷.
doi:10.34172/mj.025.33773
https://mj.tbzmed.ac.ir

مقاله پژوهشی

تأثیر پیش‌درمانی با تروگزروتین بر فیبروز میوکارد در رت‌های مبتلا به سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین

سارا بابائی کوچکی[۱]، رضا بدل زاده[۲،۳]، وهاب باباپور[۱]، نگار پناهی[۱]، احمد جامعی خسروشاهی[۴*]

[۱]گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
[۲]مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
[۳]گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
[۴]مرکز تحقیقات سلامت کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

اطلاعات مقاله

سابقه مقاله:
دریافت: ۱۴۰۳/۵/۱۰
اصلاح نهایی: ۱۴۰۳/۸/۱۲
پذیرش: ۱۴۰۳/۸/۱۶
انتشار برخط: ۱۴۰۴/۴/۲۲

کلیدواژه ها:
- دوکسوروبیسین
- تروگزروتین
- فیبروز
- میوکارد
- آنتی‌اکسیدان

چکیده

زمینه. دوکسوروبیسین (DOX) یک داروی آنتراسایکلین بسیار مؤثر است که به‌طور گسترده در درمان سرطان‌ها استفاده می‌شود. با این حال، استفاده بالینی از آن به دلیل سمیت قلبی قابل توجه محدود شده است که به آسیب پیش‌رونده و غالباً غیرقابل برگشت قلبی منجر شود. فیبروز میوکارد یکی از پیامدهای کلیدی پاتولوژیک ناشی از DOX است که عملکرد قلب را مختل کرده و خطر نارسایی قلبی را افزایش می‌دهد. تروگزروتین (TXR)، یک بیوفلاونوئید طبیعی می‌باشد که با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی در کاهش آسیب‌های قلبی مؤثر است. این مطالعه با هدف ارزیابی اثرات محافظتی TXR در برابر فیبروز میوکارد ناشی از DOX، با تمرکز بر فیبروز بافتی و نشانگرهای فیبروز TGF-β و Smad3 انجام شد.

روش‌کار. تعداد ۲۴ رت نر ویستار به طور تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند: (۱) کنترل، (۲) TXR، (۳) DOX و (۴) DOX+TXR. داروی TXR با دوز ۱۵۰ mg/kg به مدت چهار هفته به صورت خوراکی قبل از تزریق DOX تجویز شد و ۲۴ ساعت بعد از اتمام تیمار با تروگزروتین، داروی DOX با دوز ۲۰ mg/kg به طور داخل صفاقی تزریق شد. یک هفته پس از تزریق DOX، سطح فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) برای ارزیابی آسیب میوکارد اندازه‌گیری شد و فیبروز میوکارد به روش رنگ‌آمیزی تریکروم ماسون بررسی شد. بیان ژن‌های TGF-β و Smad3 با استفاده از Real-time PCR بررسی شد.

یافته‌ها. تجویز DOX به‌طور معنی‌داری فعالیت LDH و میزان فیبروز میوکارد را افزایش داد ($P<0/01$). پیش‌درمانی با TXR به‌طور معنی‌داری مقادیر LDH و فیبروز میوکارد را در گروه DOX+TXR نسبت به گروه DOX کاهش داد ($P<0/05$). همچنین، TXR سطح بیان افزایش یافته ژن‌های TGF-β ($P<0/05$) و mad3 ($P<0/01$) به دنبال تجویز دوکسوروبیسین را به‌طور معنی‌داری کاهش داد که نشان‌دهنده کاهش سیگنال‌دهی فیبروزی است.

نتیجه‌گیری. ترکیب TXR پتانسیل قابل توجهی به عنوان درمان پیشگیرانه برای فیبروز میوکارد ناشی از DOX نشان می‌دهد. توانایی TXR در کاهش آسیب میوکارد و فیبروز و تنظیم کاهشی مولکول‌های کلیدی سیگنال‌دهی فیبروزی، رویکردی امیدوارکننده برای بهبود عوارض قلبی پس از درمان با DOX ارایه می‌دهد.

پیامدهای عملی. تروگزروتین می‌تواند به عنوان یک درمان پیشگیرانه مؤثر برای بهبود سلامت قلب در بیماران سرطانی تحت درمان شیمی‌درمانی با DOX عمل کند.

مقدمه

دوکسوروبیسین (DOX) یک داروی آنتراسایکلین بسیار مؤثر است که به طور گسترده‌ای در درمان انواع مختلف سرطان‌ها، از جمله بدخیمی‌های توپر و هماتولوژیک استفاده می‌شود. با وجود کارایی خوب DOX به عنوان یک عامل شیمی‌درمانی، استفاده بالینی از آن به دلیل عوارض جانبی قلبی زیاد به‌طور قابل توجهی محدود شده است.[۱] کاردیومیوپاتی ناشی از DOX یک وضعیت شدیدی است که با آسیب قلبی پیش‌رونده و اغلب غیرقابل برگشت مشخص می‌شود و می‌تواند به صورت حاد طی چند روز پس از تجویز DOX ظاهر شود یا به مرور زمان به صورت مزمن

* نویسنده مسؤول؛ ایمیل: jamriak@tbzmed.ac.ir

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کریتیو کامنز CC BY 4.0 (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

توسعه یابد. این سمیت قلبی یک چالش عمده در حوزه انکولوژی است، زیرا کیفیت زندگی و پیش‌آگهی طولانی‌مدت بیماران سرطانی را به طور نامطلوب تحت تأثیر قرار می‌دهد.[۲،۳]

مکانیسم‌های سلولی و مولکولی مختلفی در پدیده سمیت قلبی ناشی از DOX مطرح است. فیبروز میوکارد یک نشانه بارز سمیت قلبی ناشی از DOX است که به طور قابل توجهی به کاهش عملکرد قلبی پیش‌رونده در بیماران تحت درمان با DOX منجر می‌شود.[۴] فیبروز شامل رسوب بیش از حد اجزای ماتریکس خارج سلولی است که ساختار و عملکرد طبیعی میوکارد را مختل می‌کند. دو عامل مهم در توسعه فیبروز، فاکتور رشد تبدیل‌کننده بتا (TGF-β) و مولکول پایین‌دست آن همچون Smad3 هستند. مولکول Smad3 یک واسطه حیاتی در سیگنال‌دهی فیبروزی ناشی از TGF-β در فیبروز میوکارد است.[۵] بازآرایی پاتولوژیک حاصل از فعالیت این مسیر سیگنال‌دهی، بافت قلبی را سخت کرده، شل شدن دیاستولیک را مختل نموده و در نهایت به اختلال عملکرد سیستولی و نارسایی قلبی منجر می‌شود.[۶] توسعه استراتژی‌های پیشگیری و درمانی برای کاهش سمیت قلبی ناشی ازDOX برای بهبود نتایج بیماران حیاتی است. با اصلاح تغییرات سیگنال‌دهی فیبروز میوکارد، می‌توان عملکرد میوکارد را حفظ کرده و پیش‌آگهی کلی بیماران سرطانی را بهبود بخشید. با این حال، بیشتر استراتژی‌های آزمایش شده به دلیل عوارض جانبی و مزایای ناکافی برای بافت قلب، موفقیت محدودی داشته‌اند که نیاز به درمان‌های جدید برای مقابله با این چالش بزرگ سلامتی را برجسته می‌کند.

تروگزروتین (TXR) یک بیوفلاونوئید طبیعی است که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و محافظتی قلبی-عروقی می‌باشد. این ماده در درمان بیماری‌های قلبی-عروقی مانند نارسایی وریدی مزمن، واریس و ادم میان بافتی استفاده شده و نشان داده است که اثرات محافظت‌کننده قلبی در برابر آسیب ایسکمی-ریرفیوژن میوکارد را دارد.[۷،۸] اثرات TXR به عنوان یک عامل امیدوارکننده برای کاهش استرس اکسیداتیو میوکارد و بیان ژن‌های تنظیم‌کننده بیوژنز میتوکندری در سمیت قلبی ناشی از DOX گزارش شده است.[۸] استرس اکسیداتیو نقش محوری در توسعه فیبروز میوکارد، به ویژه در زمینه سمیت قلبی ناشی از DOX، ایفا می‌کند.[۹] قابلیت TXR برای کاهش فیبروز میوکارد، این ترکیب را به یک کاندید برای محافظت قلبی در این زمینه تبدیل کرده است.[۱۰] با این حال، تحقیقات بیشتری برای روشن کردن مکانیسم‌های عمل و کارایی درمانی آن مورد نیاز است. درک مکانیسم‌های عمل TXR در سمیت قلبی ناشی از DOX می‌تواند به شناسایی اهداف درمانی نویدبخش برای جلوگیری از آسیب‌های قلبی مرتبط کمک کند. لذا، با توجه به اهمیت سمیت قلبی ناشی از DOX و پتانسیل پیشگیرانه TXR برای محافظت از بافت قلبی، این مطالعه با هدف بررسی اثر پیشگیرانه TXR بر سمیت قلبی ناشی از DOX، با تمرکز بر فیبروز بافتی و بیان ژن‌های تنظیم‌کننده فیبروز میوکارد در میوکارد رت انجام شد.

روش‌کار

حیوانات و مواد

در این مطالعه، ۲۴ رت نر ویستار با وزن بین ۲۵۰ تا ۳۰۰ گرم از حیوانخانه مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تهیه و در محل نگهداری حیوانات همان مرکز تحت شرایط کنترل شده با چرخه ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ثابت اتاق به میزان ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. آن‌ها به غذای استاندارد و آب به‌طور آزاد دسترسی داشتند. برای عادت کردن رت‌ها به محیط جدید، آن‌ها به مدت یک هفته در قفس‌های چهارتایی نگهداری شدند و سپس مداخلات آغاز شد.

داروهای DOX و TXR از شرکت سیگما (آلمان) و داروهای بیهوشی کتامین و زایلازین، و سایر مواد آزمایشگاهی از مراکز مربوطه با بالاترین کیفیت تهیه شدند. تمامی مراحل این مطالعه تحت نظارت کمیته اخلاق تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران و دانشگاه علوم پزشکی تبریز با کد اخلاق به شماره IR.TBZMED.AEC.1401.018 انجام شد.

طراحی مطالعه

تعداد ۲۴ رت ویستار به‌طور تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند که هر گروه شامل ۶ رت بود: (۱) گروه کنترل بدون تیمار؛ (۲) گروه دریافت‌کننده تروگزروتین (TXR)؛ (۳) گروه دریافت‌کننده دوکسوروبیسین (DOX) و (۴) گروه دریافت‌کننده تروگزروتین و دوکسوروبیسین (DOX+TXR). در گروه دوم، TXR با دوز ۱۵۰ mg/kg به‌صورت خوراکی روزانه از طریق لوله گاواژ به مدت چهار هفته قبل از چالش DOX تجویز شد.[۱۱] بیست و چهار ساعت پس از آخرین تیمار تروگزروتین، دکسوروبیسین هیدروکلراید به میزان ۲۰mg/kg به‌طور داخل صفاقی به گروه‌های دریافت‌کننده DOX تزریق شد؛ این دوز DOX به‌طور معمول در مطالعات قبلی برای ایجاد آسیب قلبی استفاده شده است.[۱۱] حجم معادل نرمال سالین به گروه کنترل تزریق شد. یک هفته پس از تزریق DOX، تمامی رت‌ها کشته شدند و نمونه‌های خون و بافتی به‌طور فوری تحت بیهوشی عمومی جمع‌آوری شد.

نمونه‌برداری از خون و بافت

پس از اتمام دوره چالش DOX، حیوانات با تزریق داخل صفاقی کتامین (۶۰mg/kg) و زایلازین (۱۰mg/kg) تحت بیهوشی عمیق قرار گرفتند.[۱۱] سپس، بدنبال برش پوست، کنار زدن عضلات شکمی و باز کردن شکم، ابتدا حدود ۲ میلی‌لیتر خون از ورید پورتال جمع‌آوری شد و بلافاصله با کنار زدن دیافراگم، قلب به‌طور فوری از بدن جدا شد. بطن چپ به دو قسمت تقسیم شد: یک قسمت برای بررسی بیان ژن‌ها و قسمت دیگر برای بررسی تغییرات بافت‌شناسی فیبروز استفاده شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز

میزان فعالیت لاکتات دهیدروژناز (LDH) برای ارزیابی میزان آسیب سلولی میوکارد اندازه‌گیری شد. فعالیت این آنزیم در نمونه‌های خون با استفاده از روش ELISA و طبق دستورالعمل کیت آزمایشگاهی تجاری (Roche Diagnostics، آلمان) تعیین شد.

ارزیابی هیستوپاتولوژیک فیبروز میوکارد

نمونه‌های بطن چپ قلب‌های حیوانات در گروه‌های مختلف مورد آزمایش، در پارافین غوطه‌ور شده و سپس به برش‌هایی با ضخامت حدود ۵ میکرومتر تقسیم شده و بر روی لام برای رنگ‌آمیزی تریکروم ماسون طبق پروتکل استاندارد قرار گرفتند. تغییرات فیبروزی با استفاده از میکروسکوپ نوری (Olympus، ژاپن) ارزیابی شد. تصاویر میکروگرافی هر مقطع با استفاده از نرم‌افزار Image-Pro Insight (Media Cybernetics، نسخه ۹، آمریکا) تحلیل شد. شدت فیبروز با اندازه‌گیری نسبت پیکسل‌های رنگ‌آمیزی شده به کل پیکسل‌ها در بیست میدان میکروسکوپی تصادفی از برش‌های بطن چپ اندازه‌گیری شد. شدت فیبروز بر اساس میانگین شدت پیکسل‌ها از سه بخش برای هر قلب در هر گروه محاسبه شد.[۱۲]

استخراج RNA، سنتز cDNA و انجام Real-time PCR

استخراج RNA از حدود ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه تازه بطن چپ که در محلول RNase Later حفظ شده بود، با استفاده از روش Trizol و مطابق با دستورالعمل‌های تولیدکننده (Roche، آلمان) انجام شد. میزان و خلوص RNA با استفاده از اسپکتروفتومتر NanoDrop (NanoDrop ND-2000C, Thermo Fisher Scientific، آمریکا) در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر ارزیابی شد. سپس، DNA مکمل (cDNA) از RNA استخراج‌شده با استفاده از کیت cDNA Exiqon سنتز شد. به‌طور خلاصه، ۱ میکرولیتر RNA (۳۰ میکروگرم) با ۱ میکرولیتر پرایمر رندوم-هگزامر و ۶ میکرولیتر آب RNase-free مخلوط شد، سپس در ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انکوبه و بعداً بر روی یخ سرد شد. بدنبال آن، مخلوطی از ۴ میکرولیتر بافر واکنش، ۱ میکرولیتر مهارکننده RNase، ۲ میکرولیتر مخلوط dNTP و ۱ میکرولیتر آنزیم معکوس ترانسکریپتاز به هر نمونه اضافه شد. مخلوط حاصل بلافاصله در ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس در ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه، و در نهایت در ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد. نسخه‌برداری معکوس با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر در هر لوله انجام شد. سطح بیان ژن‌های TGF-β و Smad3 و ژن کنترل GAPDH با استفاده از دستگاه Light Cycler-96 (Roche، آلمان) اندازه‌گیری شد. پرایمرهای اختصاصی با استفاده از توالی ژن‌های هدف در سایت NCBI با ابزار primer-blast طراحی و در جدول ۱ آورده شده اند. کمّی‌سازی نسبی mRNAهای هدف نسبت به سطح بیان GAPDH نرمال گشته و میزان تغییرات با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ گزارش شد.[۱۳] داده‌های کمی به صورت میانگین±خطای استاندارد میانگین ارایه شد. تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 6 (GraphPad Software، کالیفرنیا، آمریکا) انجام شد. آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون Tukey برای مقایسه تفاوت بین گروه‌ها استفاده شد. سطح معنی‌داری به صورت $P<0/05$ در نظر گرفته شد

فعالیت آنزیم LDH سرمی

میزان فعالیت آنزیم LDH برای ارزیابی آسیب سلولی میوکارد اندازه‌گیری شد. گروه DOX به‌طور معنی‌داری دارای سطح فعالیت LDH بالاتر نسبت به گروه کنترل بود ($P<0/01$) که نشان‌دهنده آسیب شدید میوکارد ناشی از درمان با دوکسوروبیسین است. داروی TXR تأثیر زیادی بر روی میزان LDH در رت‌های بدون دریافت DOX نداشت، ولی میزان این فعالیت آنزیم در گروه DOX+TXR به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه DOX بود ($P<0/05$) که بیانگر کاهش آسیب بافتی میوکارد ناشی از DOX بدنبال تجویز تروگزروتین می‌باشد (شکل ۱).

یافته‌ها

فعالیت آنزیم LDH سرمی

میزان فعالیت آنزیم LDH برای ارزیابی آسیب سلولی میوکارد اندازه‌گیری شد. گروه DOX به‌طور معنی‌داری دارای سطح فعالیتLDH بالاتر نسبت به گروه کنترل بود ($P<0/01$) که نشان‌دهنده آسیب شدید میوکارد ناشی از درمان با دوکسوروبیسین است.

داروی TXR تأثیر زیادی بر روی میزان LDH در رت‌های بدون دریافت DOX نداشت، ولی میزان این فعالیت آنزیم در گروه DOX+TXR به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه DOX بود ($P<۰/۰۵$) که بیانگر کاهش آسیب بافتی میوکارد ناشی از DOX بدنبال تجویز تروگزروتین می‌باشد (شکل ۱).

سطح فیبروز بافت میوکارد و شدت آن

بررسی‌های هیستوپاتولوژیک بافتی نشان داد که تغییرات فیبروزی در رت‌های کنترل دریافت کننده TXR در مقایسه با گروه کنترل تفاوت مشخصی نداشت اما در گروه DOX تا حدودی فیبروز وسیع‌تری مشاهده شد که با افزایش نواحی رنگ‌آمیزی شده با رنگ آبی در رنگ‌آمیزی تریکروم ماسون نشان داده شد و نشان‌گر آسیب میوکارد است. پیش‌درمانی باTXR به طور قابل توجهی تغییرات فیبروزی را در مقایسه با گروه DOX کاهش داد (شکل ۲A). شدت فیبروز نیز با تجزیه و تحلیل نواحی فیبروزی در مقاطع رنگ‌آمیزی شده بطنی بررسی شد. شدت فیبروز در گروه TXR مشابه گروه کنترل بود و تجویز این ماده به رت‌های سالم تأثیر معنی‌داری بر تغییرات فیبروزی نداشت. در عوض، تجویز DOX شدت فیبروز را در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش داده ($P<۰/۰۱$) و پیش‌درمانی با TXR شدت فیبروز را در رت‌های دریافت کننده DOX به‌طور معنی‌داری کاهش داد ($P<۰/۰۵$) (شکل 2B).

سطح بیان ژن‌های TGF-β و Smad3 در میوکارد

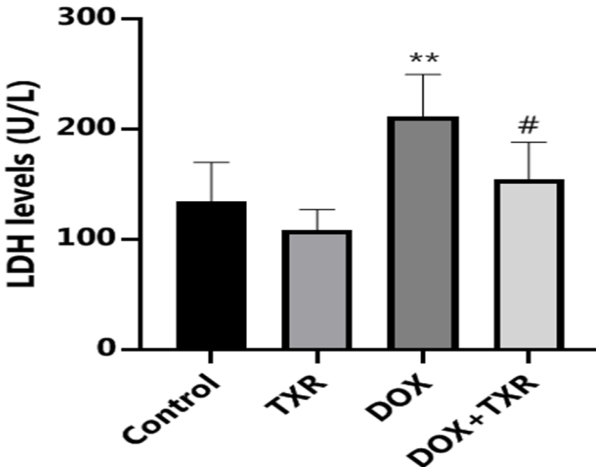
سطوح بیان ژن‌های TGF-β و Smad3 در بافت میوکارد با استفاده از real-time PCR ارزیابی شد. پس از ۴ هفته درمان با TXR، سطح بیان ژن‌های TGF-β و Smad3 در رت‌های کنترل تفاوت آماری معنی‌داری با گروه کنترل بدون تیمار نشان نداد (شکل ۳). با این حال، تجویز DOX به‌طور معنی‌داری سطح بیان هر دو ژن را در مقایسه با گروه کنترل افزایش داد ($P<۰/۰۱$ برای TGF-β و $P<۰/۰۰۱$ برای Smad3) که نشان‌دهنده افزایش فعالیت مسیر فیبروزی و پاسخ‌های مرتبط ناشی از دوکسوروبیسین است. از سوی دیگر، پیش‌درمانی رت‌های دریافت‌کننده DOX با TXR به‌طور معنی‌داری سطح بیان ژن‌های TGF-β ($P<۰/۰۵$) و Smad3 ($P<۰/۰۱$) را در مقایسه با گروه DOX کاهش داد که نشان می‌دهد تروگزروتین اثر محافظتی در برابر فیبروز میوکارد دارد. درنهایت، نتایج نشان می‌دهد در حالی که دوکسوروبیسین به‌طور قابل توجهی باعث آسیب و فیبروز میوکارد می‌شود، تروگزروتین پتانسیل کاهش این اثرات را به خوبی نشان می‌دهد. آمار توصیفی متغیرهای مورد سنجش این مطالعه در گروه‌های مختلف در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۱. توالی پرایمرهای ژن‌های هدف[۱۲]

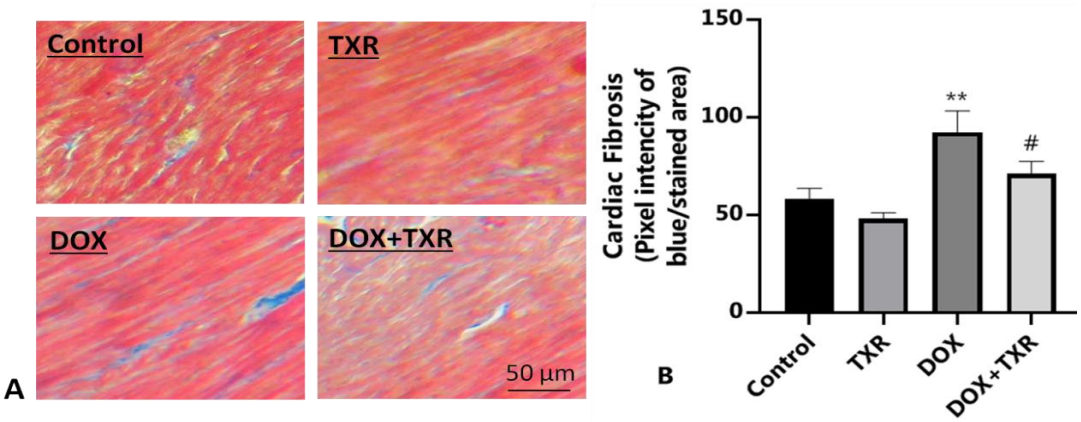
ژن هدف	پرایمر فوروارد	پرایمر معکوس	کد ژن در NCBI	دمای اتصال پرایمر
TGF-β	CCTGCACAGCTCCAGGCACC	TGCTCCACCTTGGGCTTGCG	ID: 29591	۵۹^{0}C
Smad3	CATCGAGCCCCAGAGCAATA	GTGGTTCATCTGGTGGTCACT	ID: 25631	۶۰^{0}C
GAPDH	CCCATCACCATCTTCCAGGAG	GAAGGGGCGGAGATGATGAC	ID: 24383	۶۰^{0}C

جدول ۲. آمار توصیفی (میانگین ± خطای استاندارد میانگین) متغیرهای مورد سنجش در گروه‌های مختلف (TXR: تروگزروتین، DOX: دوکسوروبیسین)

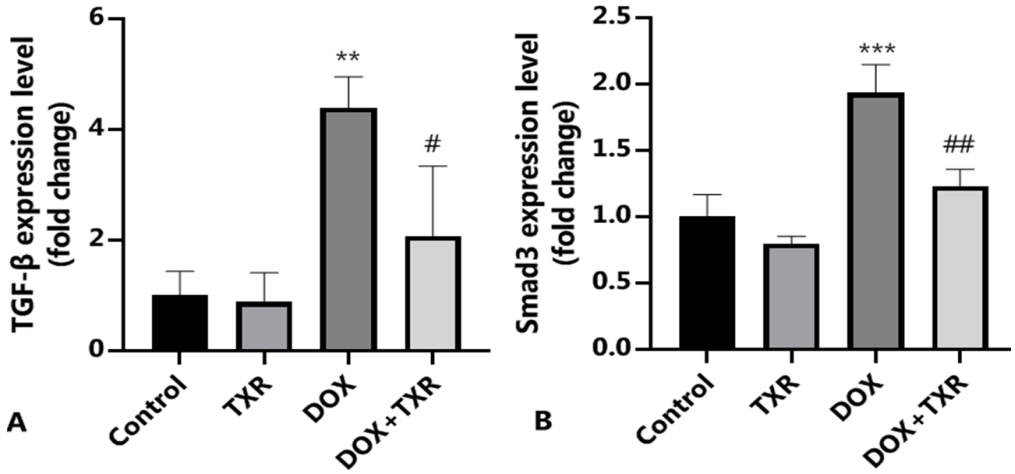
گروه‌ها / متغیرها	LDH	فیبروز بافتی	TGF-β	Smad3
Control	۱۳۴/۵ ± ۱۴/۴۵	۵۸/۲ ± ۳/۲	۱/۰۰ ± ۰/۲۵	۱/۰۰ ± ۰/۰۹
TXR	۱۰۸/۸ ± ۷/۴۸	۴۸/۲ ± ۱/۸	۰/۸۸ ± ۰/۳۱	۰/۷۹ ± ۰/۰۳
DOX	۲۱۱/۵ ± ۱۵/۵۲	۹۲/۳ ± ۶/۴	۴/۳۹ ± ۰/۳۲	۱/۹۴ ± ۰/۱۲
TXR+DOX	۱۵۴/۷ ± ۱۳/۶۸	۷۱/۲ ± ۳/۶	۲/۰۷ ± ۰/۷۳	۱/۲۳ ± ۰/۰۷



شکل ۱. میزان تغییرات آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) در سرم رت‌های گروه‌های مورد مطالعه. **: P>۰/۰۱ در مقایسه با گروه کنترل؛ #: P>۰/۰۵ در مقایسه با گروه DOX. TXR: تروگزروتین، DOX: دوکسوروبیسین



شکل ۲. تصاویر فیبروز بافتی (A) و میزان شدت تغییرات فیبروز بافتی (B) در قلب رت‌های گروه‌های مورد مطالعه. **: P>۰/۰۱ در مقایسه با گروه کنترل؛ #: P>۰/۰۵ در مقایسه با گروه DOX. TXR: تروگزروتین، DOX: دوکسوروبیسین



شکل ۳. میزان تغییرات بیان ژن‌های TGF-β (A) و Smad3 (B) در قلب رت‌های گروه‌های مورد مطالعه. **: P>۰/۰۱ و ***: P>۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه کنترل؛ #: P>۰/۰۵ و ##: P>۰/۰۱ در مقایسه با گروه DOX. TXR: تروگزروتین، DOX: دوکسوروبیسین

بحث

داروی DOX یک عامل شیمی‌درمانی مؤثر است که به‌طور گسترده‌ای در درمان سرطان استفاده می‌شود، اما سمیت قلبی آن همچنان چالش مهم بالینی به شمار می‌رود.[۳،۱] فیبروز میوکارد یکی از پیامدهای پاتولوژیک بحرانی درمان با DOX است که به اختلالات پیشرفته قلبی و افزایش خطر نارسایی قلبی منجر می‌شود.[۴] در این مطالعه، ما به بررسی اثرات محافظتی احتمالی TXR در برابر فیبروز میوکارد ناشی از DOX در مدل رت پرداختیم و بر روی نشانگرهای فیبروز TGF-β و Smad3 تمرکز کردیم. نتایج به دست آمده از این تحقیق اطلاعات مهمی در خصوص عملکرد TXR به عنوان یک عامل پیشگیرانه در کاهش آسیب‌های قلبی ناشی از DOX ارایه داد. یافته‌های ما نشان داد که تجویز DOX به‌طور قابل توجهی سطح فعالیت LDH که شاخصی از آسیب میوکاردی است را افزایش داده و تغییرات فیبروزی در میوکارد به وجود آورد. علاوه بر این، تجویز DOX منجر به افزایش سطح بیان ژن‌های TGF-β و Smad3 در بافت میوکارد شد. این نتایج تأیید می‌کند که DOX می‌تواند آسیب‌های میوکاردی و فیبروز قابل توجهی ایجاد کند، که با مطالعات قبلی که TGF-β و Smad3 را به عنوان واسطه‌های اصلی پیشبرنده فیبروز ناشی از DOX شناسایی کرده‌اند،[۱۴] سازگار است.

پیش‌درمانی با TXR به طور مؤثری اثرات منفی DOX را کاهش داد. تجویز TXR میزان LDH را در گروه DOX+TXR نسبت به گروه DOX بدون تیمار کاهش داد، که نشان‌دهنده کاهش آسیب بافتی میوکارد است. تجزیه و تحلیل بافت‌شناسی نشان داد که TXR به طور قابل توجهی میزان فیبروز را در مقایسه با گروه DOX کاهش داد. این اثر محافظتی بیشتر با کاهش سطح بیان ژن‌های TGF-β و Smad3 در رت‌های پیش‌درمان شده با TXR همراه شد، که نشان می‌دهد TXR با مسیرهای سیگنال‌دهی فیبروزی فعال شده توسط DOX مقابله می‌کند.

اثرات محافظتی قلبی TXR را می‌توان به خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی آن نسبت داد. این ماده که یک بیوفلاونوئید طبیعی است، نشان داده شده که استرس اکسیداتیو و التهاب که عوامل کلیدی در آسیب فیبروتیک میوکارد هستند را کاهش می‌دهد.[۱۶،۱۵] با کاهش استرس اکسیداتیو و التهاب، TXR ممکن است به پیشگیری از فعال‌سازی مسیرهای پیشبرنده فیبروز که توسط TGF-β و Smad3 میانجی‌گری می‌شوند، کمک کند.[۱۷] علاوه بر این، نقش TXR در تنظیم بیوژنز و عملکرد میتوکندریایی نیز می‌تواند به اثرات محافظتی آن از طریق تقویت مقاومت سلولی در برابر آسیب‌های ناشی از DOX کمک کند.[۱۸]

همچنین، کاهش مشاهده‌شده در فیبروز میوکارد و سطح بیان ژن‌های TGF-β و Smad3 در رت‌های دریافت کننده DOX و درمان شده با TXR نشان می‌دهد که TXR احتمالاً با فرآیند تغییر ساختار فیبروزی ناشی از DOX تداخل می‌کند. این با نقش شناخته‌شده TGF-βو Smad3 در توسعه فیبروز میوکارد سازگار است، جایی که فعال‌سازی TGF-β منجر به تولید بیش از حد اجزای ماتریکس خارج سلولی و متعاقب آن فیبروز بافتی می‌شود.[۲۰،۱۹] توانایی TXR در تنظیم کاهشی این مسیرها پتانسیل آن را به عنوان یک عامل درمانی در پیشگیری یا کاهش آسیب‌های قلبی ناشی از DOX برجسته می‌کند. مسیر سیگنالینگ TGF-β و پروتئین Smad3 به‌طور نزدیک و پیچیده‌ای با یکدیگر تعامل دارند.[۱۷] در بافت قلب تحت شرایط استرسی نظیر چالش DOX، TGF-β با فعال‌سازی Smad3، سیگنال‌هایی را برای تحریک تولید پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی و توسعه فیبروز ارسال می‌کند.[۲۱] این تعامل باعث می‌شود که Smad3 به‌عنوان یک عامل کلیدی در تنظیم و تشدید فرآیند فیبروز عمل کند. در نتیجه، کاهش فعالیت بیش‌ازحد مسیر پیام‌رسانی TGF-β و Smad3 توسط پیش درمانی با TXR می‌تواند به مهار توسعه و تشدید فیبروز بافتی ناشی از DOX را منجر شود. به همین ترتیب، در مطالعات درمانی، هدف قرار دادن این مسیرها برای کاهش فیبروز و پیشگیری از آسیب‌های بافتی می‌تواند مورد توجه قرار گیرد.

محدودیت‌های مطالعه حاضر شامل چندین جنبه است که باید مورد توجه قرار گیرد. اولاً، مدت زمان مطالعه کم بود و تأثیرات طولانی‌مدت داروها ممکن است به‌طور کامل بررسی نشده باشد. ثانیاً، دوز ثابت TXR و نحوه تجویز آن ممکن است بر نتایج تأثیرگذار باشد و بررسی دوزهای مختلف یا روش‌های تجویز دیگر می‌تواند اطلاعات بیشتری به دست دهد. همچنین، TXR مکانیسم‌های عمل متعددی در بافت‌های مختلف دارد[۲۲،۱۵،۷] و مطالعه حاضر به بررسی مکانیسم‌های دقیق‌تر اثر TXR در تعاملات دارویی احتمالی نپرداخته و مدل‌سازی آسیب قلبی ناشی از DOX در حیوانات مبتلا به سرطان نیز ممکن است بر نتایج تأثیر داشته باشد. این محدودیت‌ها باید در نظر گرفته شوند تا نتایج به‌دست‌آمده به‌طور دقیق‌تر ارزیابی و زمینه‌ساز تحقیقات بیشتر در این زمینه گردد. مطالعه ما با یافته‌های اخیر که بر نیاز به استراتژی‌های محافظتی قلبی جدید در انکولوژی تأکید می‌کند،[۲۳] هم‌راستا است. هرچند TXR نویدبخش به نظر می‌رسد، اما تحقیقات بیشتری برای روشن‌سازی کامل مکانیسم‌های عمل، دوز بهینه و اثرات طولانی‌مدت آن مورد نیاز است. مطالعات آینده باید تعاملات TXR با سایر مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با فیبروز قلبی

و امکان استفاده ترکیبی آن با دیگر عوامل محافظتی قلبی را در رژیم‌های درمانی سرطان بررسی کنند.

نتیجه‌گیری

در پایان، TXR پتانسیل قابل توجهی را به عنوان یک درمان پیشگیرانه برای فیبروز میوکارد ناشی از DOX نشان داد. ترکیب TXR با کاهش آسیب میوکارد، مهار فیبروز و تنظیم کاهشی مولکول‌های کلیدی سیگنال دهنده فیبروزی می‌تواند رویکردی امیدوارکننده برای بهبود نتایج قلبی بدنبال درمان با DOX ارایه دهد.

قدردانی

بدینوسیله از مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز بابت ارایه تسهیلات نگهداری حیوانات تشکر و قدردانی می‌شود.

مشارکت پدیدآوران

سارا بابائی کوچکی: جمع‌آوری داده، تحلیل و بررسی داده، طراحی اثر، تهیه پیش‌نویس؛ نگار پناهی: ایده‌پردازی، تحلیل و بررسی داده، طراحی اثر، نقد و بررسی پیش‌نویس؛ رضا بدل‌زاده، وهاب باباپور، احمد جامعی خسروشاهی: ایده‌پردازی، طراحی مطالعه، تحلیل و بررسی داده، طراحی اثر، تهیه و نقد و بررسی پیش‌نویس.

منابع مالی

مطالعه حاضر توسط واحد دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران و دانشگاه علوم پزشکی تبریز به صورت نسبی حمایت مالی شده است.

دسترسی پذیری داده‌ها

داده‌های به‌دست آمده در مطالعه حاضر در صورت درخواست از پدیدآور رابط ارایه می‌گردد.

ملاحظات اخلاقی

مقاله فوق حاصل طرح تحقیقاتی مصوب کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران و دانشگاه علوم پزشکی تبریز با کد اخلاق IR.TBZMED.AEC.1401.018 می‌باشد.

تعارض منافع

مؤلفان اظهار می‌کنند که منافع متقابلی از تألیف یا انتشار این مقاله ندارند.

References

1. Lee J, Choi MK, Song IS. Recent advances in doxorubicin formulation to enhance pharmacokinetics and tumor targeting. Pharmaceuticals. 2023;16(6):802. doi: 10.3390/ph16060802
2. Mancilla TR, Iskra B, Aune GJ. Doxorubicin-induced cardiomyopathy in children. Comprehensive Physiology. 2019;9(3):905. doi: 10.1002/cphy.c180017
3. Chatterjee K, Zhang J, Honbo N, Karliner JS. Doxorubicin cardiomyopathy. Cardiology. 2010;115(2):155-62. doi: 10.1159/000265166
4. Levick SP, Soto-Pantoja DR, Bi J, Hundley WG, Widiapradja A, Manteufel EJ, et al. Doxorubicin-induced myocardial fibrosis involves the neurokinin-1 receptor and direct effects on cardiac fibroblasts. Heart, Lung and Circulation. 2019;28(10):1598-605. doi: 10.1016/j.hlc.2018.08.003
5. Maruyama K, Imanaka-Yoshida K. The pathogenesis of cardiac fibrosis: a review of recent progress. International journal of molecular sciences. 2022;23(5):2617. doi: 10.3390/ijms23052617
6. Burke RM, Dirkx Jr RA, Quijada P, Lighthouse JK, Mohan A, O'Brien M, Wojciechowski W, Woeller CF, Phipps RP, Alexis JD, Ashton JM. Prevention of fibrosis and pathological cardiac remodeling by salinomycin. Circulation research. 2021;128(11):1663-78. doi: 10.1161/circresaha.120.317791
7. Zamanian M, Bazmandegan G, Sureda A, Sobarzo-Sanchez E, Yousefi-Manesh H, Shirooie S. The protective roles and molecular mechanisms of troxerutin (vitamin P4) for the treatment of chronic diseases: A mechanistic review. Current neuropharmacology. 2021;19(1):97-110. doi: 10.2174/1570159x18666200510020744
8. Khosroshahi AJ, Mokhtari B, Badalzadeh R. Combination of nicotinamide mononucleotide and troxerutin induces full protection against doxorubicin-induced cardiotoxicity by modulating mitochondrial biogenesis and inflammatory response. Molecular Biology Reports. 2022;49(9):8209-18. doi: 10.1007/s11033-022-07390-5
9. Cappetta D, De Angelis A, Sapio L, Prezioso L, Illiano M, Quaini F, et al. Oxidative stress and cellular response to doxorubicin: a common factor in the complex milieu of anthracycline cardiotoxicity. Oxidative medicine and cellular longevity. 2017;2017(1):1521020. doi: 10.1155/2017/1521020
10. Zhang N, Wei WY, Li LL, Hu C, Tang QZ. Therapeutic potential of polyphenols in cardiac

fibrosis. Frontiers in pharmacology. 2018;9:122. doi: 10.3389/fphar.2018.00122
11. Babaei-Kouchaki S, Babapour V, Panahi N, Badalzadeh R. Effect of troxerutin on oxidative stress and expression of genes regulating mitochondrial biogenesis in doxorubicin-induced myocardial injury in rats. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology. 2020;393:1187-95. doi: 10.1007/s00210-020-01818-0
12. Gholami S, Mokhtari B, Javadi A, Høilund-Carlsen PF, Badalzadeh R, Alihemmati A. Ischemic-Postconditioning Improves Myocardial Injury and Fibrosis Following Ischemia/Reperfusion Injury in Diabetic Rats Pretreated with Alpha-Lipoic Acid. ImmunoAnalysis. 2023;3(1):10. doi: 10.34172/ia.2023.10
13. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. methods. 2001;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262
14. Patricelli C, Lehmann P, Oxford JT, Pu X. Doxorubicin-induced modulation of TGF-β signaling cascade in mouse fibroblasts: insights into cardiotoxicity mechanisms. Scientific Reports. 2023;13(1):18944. doi: 10.1038/s41598-023-46216-7
15. Ahmadi Z, Mohammadinejad R, Roomiani S, Afshar EG, Ashrafizadeh M. Biological and therapeutic effects of troxerutin: molecular signaling pathways come into view. Journal of pharmacopuncture. 2021;24(1):1-13. doi: 10.3831/kpi.2021.24.1.1
16. Yavari R, Badalzadeh R, Alipour MR, Tabatabaei SM. Modulation of hippocampal gene expression of microRNA-146a/microRNA-155-nuclear factor-kappa B inflammatory signaling by troxerutin in healthy and diabetic rats. Indian Journal of Pharmacology. 2016;48(6):675-80. doi: 10.4103/0253-7613.194847
17. Walton KL, Johnson KE, Harrison CA. Targeting TGF-β mediated SMAD signaling for the prevention of fibrosis. Frontiers in pharmacology. 2017;8:461. doi: 10.3389/fphar.2017.00461
18. Mokhtari B, Abdi A, Athari SZ, Nozad-Charoudeh H, Alihemmati A, Badalzadeh R. Effect of troxerutin on the expression of genes regulating mitochondrial biogenesis and microRNA-140 in doxorubicin-induced testicular toxicity. Journal of Research in Medical Sciences. 2023;28(1):35. doi: 10.4103/jrms.jrms_120_22
19. Ren LL, Miao H, Wang YN, Liu F, Li P, Zhao YY. TGF-β as a master regulator of aging-associated tissue fibrosis. Aging and Disease. 2023;14(5):1633. doi: 10.14336/ad.2023.0222
20. Deng Z, Fan T, Xiao C, Tian H, Zheng Y, Li C, et al. TGF-β signaling in health, disease, and therapeutics. Signal transduction and targeted therapy. 2024;9(1):61. doi: 10.1038/s41392-024-01764-w
21. Saadat S, Noureddini M, Mahjoubin-Tehran M, Nazemi S, Shojaie L, Aschner M, et al. Pivotal role of TGF-β/Smad signaling in cardiac fibrosis: non-coding RNAs as effectual players. Frontiers in cardiovascular medicine. 2021;7:588347. doi: 10.3389/fcvm.2020.588347
22. Malinska H, Hüttl M, Oliyarnyk O, Markova I, Poruba M, Racova Z, et al. Beneficial effects of troxerutin on metabolic disorders in non-obese model of metabolic syndrome. PLoS One. 2019;14(8):e0220377. doi: 10.1371/journal.pone.0220377
23. Kourek C, Touloupaki M, Rempakos A, Loritis K, Tsougkos E, Paraskevaidis I, et al. Cardioprotective strategies from cardiotoxicity in cancer patients: a comprehensive review. Journal of Cardiovascular Development and Disease. 2022;9(8):259. doi: 10.3390/jcdd9080259