

Protective Effect of High-Intensity Interval Training on Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity by Reducing MiR-499 Expression in Male Rats

Khadijeh Ebrahimi ¹✉ , Siroos Choobineh ², Rahman Soori ³, Reza Badalzadeh ⁴

1. Corresponding Author: Department of Physical Education and Sport Sciences, Marand Branch, Islamic Azad University, Marand, Iran E-mail: kh_ebrahimi@marandiau.ac.ir

2. Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences and Health, University of Tehran, Tehran, Iran. E-mail: choobineh@ut.ac.ir

3. Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences and Health, University of Tehran, Tehran, Iran. E-mail: soori.@ut.ac.ir

4. Molecular Medicine Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. E-mail: badalzadehr@tbzmed.ac.ir

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received:

1 August 2018

Received in revised form:

17 November 2018

Accepted:

22 November 2018

Published online:

22 September 2022

Keywords:

Cardiotoxicity,

Doxorubicin,

interval training,

MiR-499.

ABSTRACT

Introduction: Doxorubicin (DOX) is an effective chemotherapy treatment for various cancers, but its use has been restricted due to cardiotoxicity effects. Studies about the protective effect of High-Intensity Interval Training (HIIT) against DOX-induced cardiotoxicity and its mechanisms are rare. This study aimed to investigate the protective effect of HIIT against the DOX-induced cardiotoxicity on the level of miR-499 expression which is widely expressed under the physiological conditions in the cardiomyocytes.

Methods: Twenty-four male Wistar rats were randomly assigned into four groups (n=6/group) including DOX (20 mg/kg body weight), HIIT (eight weeks, and seven 4-minutes sets of intervals at 80%–90% of VO₂max interspersed with 3 minutes periods at 65%–75% of VO₂max), HIIT+DOX and Control groups. The mRNA expression level was determined using the RT-PCR method. One-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc test was used for statistical analysis of data ($\alpha < 0.05$).

Results: The results showed that DOX-induction significantly increased the MIR-499 expression in the left ventricular tissue of the rats' heart ($P < 0.05$). Also, the expression level of MIR-499 was increased after exercise, but this difference was not statistically significant. Exercise before the DOX-induction also led to a significant reduction of MIR-499 expression in the HIIT+ DOX group compared with the DOX group ($P < 0.05$).

Conclusion: Therefore, performing HIIT before DOX induction can reduce the changes in MIR-499 expression caused by DOX. Therefore, HIIT could be a proper strategy for protecting the heart against DOX-induced cardiotoxicity by reducing MIR-499 expression.

Cite this article: Saberi, Y.; Tolouei Azar, J.; Razi, M.; Tofighi, A. (2022). Protective Effect of High-Intensity Interval Training on Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity by Reducing MiR-499 Expression in Male Rats. *Journal of Sport Biosciences*, 14 (2), 137-146. DOI: <http://doi.org/10.22059/JSB.2021.263165.1303>.



Extended Abstract

Introduction

Doxorubicin (DOX) is an effective chemotherapy treatment for various cancers, but its use has been restricted due to cardiotoxicity effects. In recent years, extensive attention has been paid to the role of physical training, especially common endurance training, as a suitable non-pharmacological strategy for reducing the cardiotoxicity caused by DOX. Despite the greater cardiovascular adaptations of High-Intensity Interval Training (HIIT) compared with conventional endurance training, Studies on the protective effect of HIIT against DOX-induced cardiotoxicity and its molecular mechanisms are rare. This study aimed to investigate the protective effect of HIIT against the DOX-induced cardiotoxicity on the expression level of MIR-499 which is widely expressed under the physiological conditions in the cardiomyocytes.

Methods

One week after buying twenty-four male Wistar rats, all animals were initially familiarized with the rodent's treadmill (15 minutes, 10 m/min, three sessions/week). Then, the rats were randomly divided into 4 groups (n=6/groups) including: DOX (20 mg/kg of body weight, intraperitoneally), HIIT, HIIT + DOX and Control groups. The mRNA levels were determined using the RT-PCR method. HIIT training was performed for 60 minutes during 8 weeks, which included three stages: 1) 10 minutes of warm-up with the intensity of 50-55% of VO₂max; 2) seven sets of 4-minute HIIT with the intensity of 80-90% of VO₂max interspersed with 3 minutes periods with the intensity of 65%–75% of VO₂max; 3) one minutes of recovery with the intensity of 50-55% of VO₂max. Also, 72 hours after DOX injection, the animals were anesthetized and then killed, and left ventricle tissue samples were quickly taken. The mRNA levels were determined using the RT-PCR method. Statistical analysis of data was done using the one-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc test for multiple comparisons ($\alpha < 0.05$).

Results

The results showed that DOX treatment significantly increased the MIR-499 expression in the left ventricular tissue of rats' hearts ($P < 0.05$). Also, the expression of MIR-499 was increased after training, but this difference was not statistically significant. Training before the DOX-induction also significantly reduced the expression of MIR-499 in the HIIT+DOX group compared with the DOX group ($P < 0.05$). Therefore, HIIT could be a proper strategy for protecting the heart against DOX-induced cardiotoxicity by reducing MIR-499 expression.

Conclusion

The results of this study showed that the expression level of MIR-499 in cardiac cells increased after DOX treatment. Therefore, probably MIR-499 can be a suitable clinical marker in the early diagnosis of DOX-induced heart damage. Nevertheless, HIIT before DOX injection can prevent the pathological increase of MIR-499 expression in the heart and thereby could reduce cardiotoxicity. Therefore, HIIT can be a suitable preventive strategy for protecting the heart against DOX-induced cardiotoxicity by reducing the expression of MIR-499.

Ethical Considerations: This paper is derived from a Ph.D. Thesis. The present study was conducted following ethical principles.

Funding: The research was done without using financial resources.

Authors' contribution: The authors have contributed equally. The paper was written by Khadijeh Ebrahimi under the supervision and advice of Dr. Choobineh as a supervisor and Dr. Soori and Dr. Badalzadeh as advisors.

Conflict of interest: The authors have no conflicts of interest

Acknowledgments: I would like to express my deep gratitude to my distinguished research supervisors and advisors, for their patient guidance, enthusiastic encouragement, and useful critiques of this research work.

تأثیر محافظتی تمرین تناوبی شدید بر سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین به واسطه کاهش بیان mir-499 در رت‌های نر

خدیدجه ابراهیمی^۱، سیروس چوبینه^۲، رحمان سوری^۳، رضا بدل‌زاده^۴

۱. نویسنده مسئول: گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد مرند، دانشگاه آزاد اسلامی، مرند، ایران رایانامه: kh_ebrahimi@marandiau.ac.ir
۲. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزش و تندرستی، دانشگاه تهران، تهران، ایران. رایانامه: choobineh@ut.ac.ir
۳. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزش و تندرستی، دانشگاه تهران، تهران، ایران. رایانامه: soori@ut.ac.ir
۴. مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران رایانامه: badalzadehr@tbzmed.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله پژوهشی	مقدمه: دوکسوروبیسین داروی مؤثری در درمان انواع سرطان است، ولی کاربرد آن به دلیل سمیت قلبی محدود شده است. درباره تأثیر محافظتی تمرین تناوبی شدید در مقابل سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین و مکانیسم‌های آن تحقیقات نادری وجود دارد. هدف این تحقیق بررسی تأثیر تمرین تناوبی شدید پیش از القای دوکسوروبیسین بر میزان بیان miR-499، که به‌طور گسترده‌ای در شرایط فیزیولوژیکی در قلب بیان می‌شود، در سلول‌های قلبی است.
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۵/۱۰	روش پژوهش: ۲۴ سر رت نر ویستار به‌طور تصادفی به چهار گروه (n=۶) تقسیم شدند: ۱- کنترل-سالین (Control)؛ درمان با دوکسوروبیسین (۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن) (DOX)؛ ۲- تمرینات تناوبی شدید (HIIT) (هشت هفته، ۷ ست ۴ دقیقه‌ای ۸۰-۹۰ درصد VO ₂ max مجزاشده با دوره‌های سه‌دقیقه‌ای ۶۵-۷۵ درصد VO ₂ max) و درمان با دوکسوروبیسین پس از اتمام آخرین جلسه تمرینات تناوبی شدید (HIIT+DOX). بررسی میزان بیان miR-499 با روش RT-PCR انجام گرفت. از تجزیه و تحلیل واریانس یکطرفه و سپس آزمون تعقیبی توکی برای بررسی آماری داده‌ها استفاده شد ($\alpha < 0.05$).
تاریخ بازنگری: ۱۳۹۷/۰۸/۲۶	یافته‌ها: نتایج نشان داد القای دوکسوروبیسین بیان miR-499 را به‌طور معناداری در بافت بطن چپ قلب افزایش می‌دهد ($P < 0.05$). همچنین میزان بیان miR-499 پس از تمرین افزایش یافت، ولی این تفاوت از نظر آماری معنادار نبود. تمرین پیش از القای دوکسوروبیسین نیز موجب کاهش معنادار میزان بیان miR-499 در گروه HIIT+DOX نسبت به گروه DOX شد ($P < 0.05$). بنابراین انجام تمرین تناوبی شدید پیش از القای دوکسوروبیسین می‌تواند تغییرات بیان miR-499 ناشی از دوکسوروبیسین را کاهش دهد.
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۹/۰۱	نتیجه‌گیری: نتیجه اینکه تمرین تناوبی شدید می‌تواند روش مناسبی در محافظت قلب در برابر سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین از طریق کاهش میزان بیان miR-499 باشد.
تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۰۶/۳۱	
کلیدواژه‌ها: تمرین تناوبی، دوکسوروبیسین، سمیت قلبی، MiR-499.	

استناد: ابراهیمی، خدیجه؛ چوبینه، سیروس؛ سوری، رحمان؛ و بدل‌زاده، رضا. (۱۴۰۱). تأثیر محافظتی تمرین تناوبی شدید بر سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین به واسطه کاهش بیان miR-499 در رت‌های نر. *نشریه علوم زیستی ورزشی*، ۱۴(۲)، ۱۳۷-۱۴۶.

DOI: <http://doi.10.22059/JSB.2021.263165.1303>



مقدمه

دوکسوروبیسین به عنوان یک داروی شیمی-درمانی مؤثر برای درمان انواع سرطان از سال ۱۹۶۹ به طور گسترده‌ای به کار می‌رود (۱، ۲). با وجود این، کاربرد آن در درمان سرطان به دلیل سمیت قلبی (آسیب قلبی تجمعی برگشت‌ناپذیر وابسته به دوز دارو) طی درمان یا حتی بعدها که اغلب با اختلال عملکرد بطن چپ و نارسایی قلبی همراه است، محدود شده است (۳، ۴). سازوکارهای مولکولی سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین به طور کامل درک نشده است، با وجود این، افزایش تولید گونه‌های اکسیداتیو واکنش‌پذیر^۱ و متعاقب آن اختلال عملکرد میتوکندری از سازوکارهای احتمالی پذیرفته‌شده عمومی‌اند (۳).

ریزآران‌ای‌ها^۲ مولکول‌های کوچک آران‌ای^۳ غیرکدکننده با طول ۲۱-۲۳ نوکلئوتید هستند که اغلب از طریق اتصال به ناحیه 3'-UTR^۴ در آران‌ای پیک هدف^۵ و سپس تخریب و سرکوب ترجمه آنها، بیان ژن را کاهش می‌دهند (۵). آنها تقریباً عملکرد اساسی انواع سلول‌های مرتبط با سیستم قلبی-عروقی (مانند سلول‌های اندوتلیال، عضلات قلبی، عضلات صاف، سلول‌های التهابی و فیبروبلاست‌ها) را کنترل می‌کنند (۶). در شرایط پاتولوژیکی، کاهش یا افزایش یک ریزآران‌ای مشخص می‌تواند بیماری‌زا باشد که می‌توان با بازگرداندن سطح طبیعی بیان ریزآران‌ای این وضعیت را تصحیح کرد (۷). بنابراین به دلیل نقش آنها در پاتوفیزیولوژی بسیاری از بیماری‌های قلبی-عروقی، برای استفاده در تشخیص، پیش‌آگهی و درمان مطالعه و بررسی شده‌اند (۶). همچنین احتمالاً ریزآران‌ای‌ها به سبب دارا بودن پایداری بالا در هر شرایطی، حضور در مایعات مختلف بدن و خاصیت بیان‌پذیری در همه بافت‌ها، نشانگرهای بالینی مناسبی در تشخیص زودهنگام آسیب قلبی ناشی از دوکسوروبیسین هستند (۸).

miR-499 یکی از ریزآران‌ای‌های اختصاصی عضله، تنظیم‌کننده اصلی تکثیر، بقا و تمایز پیش‌سازهای قلب است (۷) که به طور گسترده‌ای در شرایط فیزیولوژیکی در قلب بیان می‌شود (۹). لیو و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که miR-499 به طور مستقیم ژن کدگذاری‌کننده پروتئین ۱ متصل به فولیکولین (Fnl1^۷)، را که به طور منفی AMPK را تنظیم می‌کند، هدف قرار می‌دهد (۱۰). از سوی دیگر، miR-499 موجب مهار آپوپتوز سلول‌های قلبی می‌شود، زیرا miR-499 پروتئین DRP1^۸ و شکافت میتوکندری را غیرفعال می‌کند (۱۱). گزارش شده است که سطح بیان miR-499 در پلاسما بیماران مبتلا به انفارکتوس قلبی حاد سریع‌تر از سایر نشانگرها مانند SMB، cTnI، cTnT، CK-MB، CK و LDH افزایش می‌یابد (۱۲). همچنین متعاقب هایپرتروفی پاتولوژیک قلب، میزان بیان miR-499 در سلول‌های قلبی افزایش می‌یابد (۱۳). جالب توجه اینکه فشار اکسیداتیو سبب افزایش بیان miR-499 در سلول‌های قلبی (به عنوان بخشی از واکنش ناشی از استرس) می‌شود (۱۴). در تحقیق لیگر و همکاران (۲۰۱۷) بیان شده است که miR-499 پلاسما به طور چشمگیری پس از مصرف آنتراسیکلین‌ها از جمله دوکسوروبیسین افزایش می‌یابد، که پاسخ این مایومیر با مقدار دارو و نشانگرهای آسیب قلبی ارتباط مثبتی دارد (۱۵). بنابراین ارزیابی بیشتر miR-499 می‌تواند بینشی را در مورد سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین و شاخص‌های زیستی به وجود آورد تا مداخلات زودهنگام برای کاهش سمیت قلبی را تسهیل کند (۱۵).

طی سال‌های اخیر، توجه گسترده‌ای به نقش فعالیت ورزشی به‌ویژه استقامتی رایج به عنوان راهبرد غیردارویی مناسب در کاهش سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین معطوف شده است (۱، ۱۶). شایان ذکر است که تمرینات استقامتی بیان miR-499 را در بافت بطن چپ رت‌ها افزایش می‌دهد که افزایش بیان این مایومیر می‌تواند با هایپرتروفی قلبی ناشی از فعالیت ورزشی مرتبط

¹ . Reactive oxygen species (ROS)

² . MicroRNAs (miRNAs)

³ . RNA

⁴ . 3'-untranslated region of mRNA

⁵ . Target mRNA

⁶ . Tissue specificity

⁷ . Folliculin interacting protein 1

⁸ . Dynamin related protein 1

باشد (۱۷). از سوی دیگر، بیان شده است که تمرین تناوبی شدید (HIIT^۱) نسبت به تمرینات ورزشی رایج استقامتی موجب توسعه بیشتر VO_2max و عملکرد قلبی می‌شود (۱۸). برخلاف تمرینات ورزشی رایج استقامتی، تمرینات تناوبی شدید به بیماران نارسایی قلب اجازه می‌دهد تا تمرین با شدت بیشتر، اما دوره کاری کمتر را به‌طور کامل اجرا کنند (۱۶). در تحقیقی گزارش شده است که تمرینات تناوبی شدید قبل و طی استفاده از دوکسوروبیسین سطوح آنتی‌اکسیدانتی را حفظ می‌کند و از طریق افزایش مقادیر آنتی‌اکسیدانتی در سلول‌های قلبی از عوارض جانبی قلبی دوکسوروبیسین می‌کاهد (۱۹). با وجود سازگاری‌های قلبی-عروقی بیشتر تمرینات تناوبی شدید نسبت به فعالیت ورزشی استقامتی رایج، تحقیقات کمی به نقش این نوع فعالیت ورزشی در زمینه جلوگیری از سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین و مکانیسم‌های مولکولی آن پرداخته‌اند. بنابراین هدف این تحقیق بررسی تأثیر پیشگیرانه تمرینات تناوبی شدید در برابر سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین از طریق اندازه‌گیری میزان بیان miR-499 در سلول‌های قلبی است. ما فرض کردیم تمرینات تناوبی شدید می‌تواند از تغییرات miR-499 ناشی از دوکسوروبیسین جلوگیری کند و از این طریق سمیت قلبی را کاهش دهد.

روش تحقیق

حیوانات

۲۴ سر رت نر نژاد ویستار سه‌هفته‌ای نابالغ از مرکز تحقیقات حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی تبریز خریداری و به‌منظور سازگاری با محیط جدید، در دمای محیط کنترل شده $21 \pm 2^\circ C$ در چرخه ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، با دسترسی آزاد به غذا و آب به مدت یک هفته نگهداری شدند. حیوانات به‌منظور آشنایی با فعالیت ورزشی در نوار گردان به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه طی سه جلسه در هفته تمرین کردند. سپس به‌طور تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند (هر گروه = ۶): کنترل-سالین (Control)؛ درمان با دوکسوروبیسین (DOX)؛ هشت هفته تمرینات تناوبی شدید (HIIT) و درمان با دوکسوروبیسین پس از اتمام آخرین جلسه فعالیت ورزشی (HIIT+DOX). تمامی روش‌های حیوانی در کمیته اخلاق تحقیقاتی مؤسسه تحقیقات علوم ورزشی و بررسی و براساس انطباق با استانداردهای اخلاقی در وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، با کد IR.SSRI.REC.1397.311 تأیید شده است.

برنامه تمرینات تناوبی شدید

برنامه تمرینات تناوبی شدید براساس تحقیقات قبلی روی نوار گردان تنظیم شده است (۲۷، ۲۸)، بدین‌صورت که حیوانات روی نوار گردان به مدت پنج روز در هفته به مدت ۶۰ دقیقه و به مدت هشت هفته تمرین کردند که شامل سه مرحله بود (جدول ۱).

جدول ۱. برنامه تمرینات تناوبی شدید

گرم کردن	۱۰ دقیقه گرم کردن با شدت ۵۰-۵۵ درصد VO_2max
بدنه اصلی	۷ ست پی‌درپی ۴ دقیقه با ۸۰-۹۰ درصد VO_2max که با دوره‌های ۳ دقیقه‌ای با شدت ۶۵-۷۵ درصد VO_2max از هم جدا شده‌اند
ریکاوری	۱ دقیقه سرد کردن با شدت ۵۰-۵۵ درصد VO_2max

¹. High-intensity interval training

با توجه به دسترسی نداشتن به ابزار مستقیم تخمین VO_2max و با توجه به پژوهش اخیر (هویدال و همکاران، ۲۰۰۷) مینی بر وجود ارتباط قوی بین سرعت حرکت دویدن روی نوار گردان و VO_2max (۲۰)، به طور غیرمستقیم شدت فعالیت ورزشی حیوانات براساس سرعت حرکت در ابتدای هر دو هفته به شرح زیر برآورد شد: بدین صورت که پس از ۱۰ دقیقه گرم کردن با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه، سرعت نوار گردان هر دو دقیقه یک بار به میزان $0.3/0$ متر بر ثانیه ($1/8$ تا 2 متر/دقیقه) افزایش می‌یافت تا حیوانات دیگر قادر به دویدن نباشند. معیار ارزیابی VO_2max ناتوانی حیوانات در ادامه دادن دویدن با افزایش سرعت نوار گردان بود. سرعت مشاهده شده در این مرحله به عنوان سرعت معادل VO_2max ثبت شد (۲۰).

تزریق دوکسورویسین و بافت برداری

بلافاصله پس از آخرین جلسه تمرینات تناوبی شدید، حیوانات دوز تجمعی هیدروکلوراید دوکسورویسین (۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن، داخل صفاقی) دریافت کردند. ۷۲ ساعت پس از تزریق دوکسورویسین و ناشتایی شبانه حیوانات با ترکیبی از کتامین و زایلاسین (به ترتیب ۹۰ و ۱۰ کیلوگرم/میلی‌گرم) بی‌هوش و سپس کشته شدند و قلب به سرعت برداشته شد. بلافاصله پس از برداشت قلب، نمونه کوچکی از بافت بطن چپ حیوانات به سرعت به محلول مهارکننده RNase (Qiagen, Cat No. 76104) منتقل و تا زمان استخراج RNA در دمای -80 درجه سانتی‌گراد ذخیره شد (۲۱). گروه‌های بدون القای دوکسورویسین نیز مقدار مشابهی از سالیان را دریافت کردند.

جداسازی RNA

برای استخراج کل RNA از بافت‌ها، از محلول ترایزول Reagent isolation Tripe (محصول شرکت روش Roche) براساس دستورالعمل شرکت تولیدکننده استفاده شد. عملکرد و خلوص RNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری نانودراپ در $260/280$ نانومتر (ND-2000C, Thermo Fisher Scientific, USA) تعیین شد. علاوه بر این، به منظور کیفیت‌سنجی، نمونه‌ها با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد. پس از آن، نمونه‌های RNA تا زمان انجام سنتز cDNA در دمای -80 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۲۱).

سنتز cDNA و Real time PCR

در این تحقیق، به منظور اندازه‌گیری کمی سطح بیان miR-499 Real time PCR دو مرحله‌ای استفاده شد. در مرحله اول، کیت سنتز cDNA یونیورسال (Exiqon Cat No. 40023301) استفاده شد. پس از آن، Real time PCR کمی توسط مسترمیکس سایبرگرین اکسلنت (Exiqon, Cat No. 400203421) و ست پرایمر ویژه miR-499 (Exiqon, Cat No. 400204481) انجام گرفت (۲۱). برای نرمال‌سازی سطح بیان ژن هدف، سطح بیان U6 به عنوان ژن مرجع استفاده شد. سپس میانگین مقادیر Ct کپی‌شده^۱ محاسبه و سطح بیان نسبی ژن هدف با استفاده از روش Ct نسبی تعیین شد (۲۲).

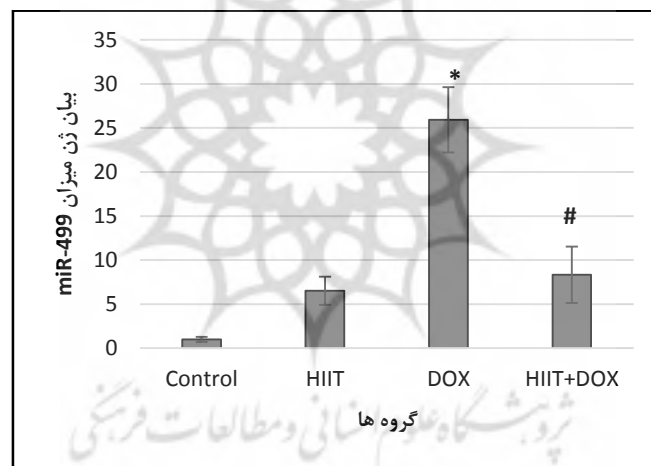
¹. Duplicated Ct

تحلیل آماری

همه داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده‌اند. تجزیه و تحلیل آماری با نرم افزار IBM SPSS نسخه ۲۳ انجام گرفت. از آزمون شاپیروویلیک برای بررسی طبیعی بودن داده‌ها استفاده شد. همچنین از تجزیه و تحلیل واریانس یکطرفه برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد، سپس برای تعیین هرگونه تفاوت بین گروه‌ها، آزمون تعقیبی توکی استفاده شد ($\alpha < 0.05$).

نتایج

القای دوکسوروبیسین به رت‌ها به افزایش معنادار بیان miR-499 در گروه DOX در مقایسه با گروه Control منجر شد ($P < 0.05$). با وجود افزایش میزان بیان miR-499 پس از تمرینات تناوبی شدید در مقایسه با گروه کنترل این تفاوت از نظر آماری معنادار نبود. همچنین میزان بیان miR-499 در گروه HIIT+DOX کمتر از گروه DOX بود ($P < 0.05$). بنابراین انجام تمرینات تناوبی شدید پیش از تزریق دوکسوروبیسین می‌تواند تغییرات بیان miR-499 ناشی از دوکسوروبیسین را کاهش دهد (شکل ۱).



شکل ۱. میزان بیان miR-499 در قلب موش‌های صحرایی در گروه‌های مختلف ($\alpha < 0.05$). *: نسبت به گروه Control. #: نسبت به گروه DOX.

بحث

در این تحقیق دریافتیم که دوکسوروبیسین به افزایش بیان miR-499 در سلول‌های قلبی رت‌ها پس از ۷۲ ساعت منجر می‌شود. با وجود این، انجام تمرینات تناوبی شدید پیش از تزریق دوکسوروبیسین می‌تواند از افزایش بیان miR-499 ناشی از تزریق دوکسوروبیسین بکاهد. شایان ذکر است که تمرینات تناوبی شدید به‌تنهایی بیان miR-499 را در بطن چپ حیوانات افزایش داد، ولی این تغییرات از نظر آماری معنادار نبود.

در شرایط پاتولوژیکی، کاهش یا افزایش یک ریزآران‌ای مشخص می‌تواند بیماری‌زا باشد، که می‌توان با بازگرداندن سطح بیان طبیعی ریزآران‌ای این وضعیت را تصحیح کرد (۷). miR-499، تنظیم‌کننده اصلی تکثیر، بقا و تمایز پیش‌سازهای قلب است (۷). به همین دلیل، miR-499 هدف درمانی جذابی را در بیماری‌های قلبی-عروقی ارائه می‌کند. تحقیقات مختلفی به بررسی نقش miR-499 در بیماران قلبی پرداخته است. برای مثال استولو و همکاران (۲۰۱۸) به مطالعه نقش تشخیصی miR-499 پلاسما،

به دلیل نقش مهمش در بهبودی سلول‌های قلبی، در بیماران انفارکتوس قلبی حاد AMI^۱ در سن ۳۰-۶۰ سال پرداخته‌اند (۲۳). مطالعه آنها سطح شایان توجهی از miR-499 در سرم بیماران AMI در مقایسه با افراد سالم را نشان داد. آنها نشان دادند که miR-499 در مقایسه با دیگر نشانگرهای رایج حساسیت بیشتری دارد و می‌تواند به‌عنوان نشانگر تشخیصی زودرس AMI بهتر عمل کند. سطح miR-499 با CK-MB ارتباط مثبتی داشت. به‌طور مشابهی، دالساندرا و همکاران (۲۰۱۰) به بررسی ارتباط بین سطوح miR-499-5b پلاسمای انسانی و موش به‌عنوان نشانگرهای زیستی AMI پرداختند (۲۴). آنها نشان دادند که AMI به افزایش سطوح پلاسمایی miR-499-5p در انسان و حیوان منجر می‌شود. به‌طوری‌که miR-499-5b می‌تواند نشانگر زیستی جدیدی از آسیب قلبی باشد. یائو و همکاران (۲۰۱۴) نیز به بررسی توانایی miR-499 پلاسمای پیش‌بینی اولیه انفارکتوس میوکارد در بیماران با عمل جراحی پیوند عروق کرونر (CABG)^۲ پرداختند (۲۵). تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که miR-499 دارای حساسیت و ویژگی بالاتری نسبت به cTnI^۳ است. همچنین نتایج آنها نشان می‌دهد که miR-499 پلاسمای نشانگر زیستی سریع جدیدی برای شناسایی انفارکتوس میوکارد طی عمل جراحی قلب است (۲۵). شایان ذکر است که کارستان و همکاران (۲۰۱۰) نیز به نتایج مشابهی دست یافتند (۳۶). آنها ارتباط سطوح پلاسمایی ریزآران‌ای‌های انتخابی مرتبط با قلب (miR-499، 208b) با آسیب میوکاردی را بررسی کردند (۲۶). miR-499 و 208b- در پلاسمای بیماران AMI در مقایسه با گروه کنترل به‌طور چشمگیری افزایش یافت (به ترتیب ۱۶۰۰ و ۱۰۰ برابر). هر دو مایومیر با cTnT پلاسمای همبستگی داشتند که نشان‌دهنده انتشار miR-208b و miR-499 از سلول‌های قلبی آسیب‌دیده به گردش خون است. با توجه به این تحقیقات، بیان miR-499 در پلاسمای به‌واسطه افزایش بیان آن در بافت قلب متعاقب آسیب قلبی افزایش یافته است که با نتایج تحقیق ما مبنی بر افزایش بیان miR-499 در بافت بطن چپ قلب متعاقب سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین همخوانی دارد. موافق با نتایج قلبی، بیان شده است که متعاقب بیماری عضله قلبی، میزان بیان miR-499 در سلول‌های قلبی انسان و موش افزایش می‌یابد (۱۳).

هولمگرن و همکاران (۲۰۱۶) تأثیرات اولیه و تأخیری دوکسوروبیسین را بر بیان ریزآران‌ای‌های مختلف در سلول‌های قلبی مشتق از سلول‌های قلبی بنیادی پلورپوتنت^۴ انسانی بررسی کردند (۸). آنها گزارش کردند که بیان miR-187، miR-34، miR-199، miR-214 و miR-424 پس از درمان با دوکسوروبیسین افزایش می‌یابد. طبق نتایج تحقیق هولمگرن و همکاران (۲۰۱۶)، این ریزآران‌ای‌ها نشانگرهای بالقوه مناسبی در تشخیص زودهنگام سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین هستند (۸). نتایج تحقیق حاضر نیز بیانگر افزایش میزان بیان miR-499 در سلول‌های قلبی رت‌هاست. بنابراین miR-499 نیز می‌تواند نشانگر بالقوه در تشخیص زودهنگام سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین باشد. لگر و همکاران (۲۰۱۷) نیز به بررسی ریزآران‌ای‌ها به‌عنوان نشانگرهای بالقوه سمیت قلبی ناشی از القای دوکسوروبیسین در کودکان و نوجوانان سرطانی پرداختند (۱۵). به‌طور مشابه با نتایج تحقیق حاضر، نتایج آنها نشان داد که میزان بیان miR-499 و miR-29b پلاسمای به‌طور قابل توجهی پس از مصرف دوکسوروبیسین افزایش می‌یابد، که پاسخ این مایومیرها با مقدار دوکسوروبیسین و cTnT ارتباط مثبتی دارد. میزان cTnT در گروه درمان‌شده با دوکسوروبیسین بالاتر از افراد درمان‌نشده با دوکسوروبیسین بود. اوکاموتا و همکاران (۲۰۱۶) بیان کردند که miR-499 موجب مهار مسیر کلسینرون و مسیر سیگنالی Wnt و متعاقب آن فعال شدن مسیر آنژیوژنز می‌شود، بنابراین آنها به بررسی تأثیر ترکیب درمانی دوکسوروبیسین با miR-499 در درمان سرطان پرداختند (۲۷). آنها دریافتند که ترکیب درمانی دوکسوروبیسین با miR-499 موجب افزایش سرکوب تومور و تجمع بیشتر دوکسوروبیسین در بافت تومور از طریق مهار آنژیوژنز می‌شود (۲۷)، که نتایج آنها در تناقض با نتایج تحقیقات قلبی مبنی بر افزایش پاتولوژیک بیان miR-499 در نتیجه درمان با دوکسوروبیسین است.

¹. Acute myocardial infarction

². Coronary artery bypass graft (CABG)

³. Cardiac troponin I (cTnI)

⁴. Pluripotent stem cells

شواهد فزاینده‌ای وجود دارد که تمرینات ورزشی استقامتی رایج پیش از درمان با دوکسوروبیسین موجب محافظت قلب در برابر سمیت قلبی از طریق افزایش فعالیت مسیر سیگنالی AMPK^۱ (۲۸)، افزایش همجوشی میتوکندری، کاهش شکافت میتوکندری (۲۹)، کاهش میزان ROS، افزایش محتوای آنتی‌اکسیدانتی (۳۰) می‌شود. تمرینات تناوبی شدید نیز می‌تواند موجب افزایش عملکرد قلبی در بیماران قلبی شود (۳۱، ۳۲) و حتی نسبت به تمرینات رایج استقامتی می‌تواند موجب توسعه بیشتر عملکرد قلبی شود (۱۸). گزارش شده است که تمرینات تناوبی شدید می‌تواند از قلب در برابر آسیب ایسکمی ریپرفیوژن (IR^۲) به واسطه کاهش فعالیت پلاسمایی LDH و CK-MB^۳ و نیز اندازه انفارکتوس قلبی محافظت کند (۳۱). شایان توجه است که تمرینات تناوبی شدید سبب سازگاری‌های قلبی-عروقی مشابه یا حتی برتر در مقایسه با انواع دیگر فعالیت ورزشی مانند قدرتی و استقامتی هم در افراد سالم و هم بیماران قلبی عروقی می‌شود (۱۸، ۳۳-۳۶)، با وجود این، نقش محافظتی تمرینات تناوبی شدید پیش از درمان با دوکسوروبیسین کمتر بررسی شده است. براساس اطلاعات ما، تنها یک مطالعه توسط جارت و همکاران (۲۰۱۶) در این زمینه انجام گرفته است که نشان می‌دهد تمرینات تناوبی شدید قبل و در طی تزریق دوکسوروبیسین به رت‌ها سطوح آنتی‌اکسیدانتی را حفظ کرده و از طریق افزایش مقادیر SOD1^۴ و SOD2 و کاتالاز (CAT^۵) در سلول‌های قلبی از عوارض جانبی دوکسوروبیسین می‌کاهد (۱۹). نتایج تحقیق حاضر نیز بیانگر نقش محافظتی قلبی تمرینات تناوبی شدید در برابر سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین از طریق کاهش تغییرات miR-499 است.

اخیراً در تحقیق فتحی و همکاران (۲۰۱۶) بیان شد که چهارده هفته تمرینات ورزشی استقامتی می‌تواند بیان miR-499 را در بطن چپ نمونه‌های سالم افزایش دهد که با هایپرتروفی فیزیولوژیک قلبی مرتبط است (۱۷). شایان توجه اینکه در شرایط فیزیولوژیک، miR-499 می‌تواند موجب مهار آپوپتوز و شکافت میتوکندری (۱۱) و فعال شدن آنژیوزن سلول‌های قلبی شود (۲۷). نتیجه تحقیق حاضر نیز نشان داد که تمرینات تناوبی شدید به‌تنهایی بیان miR-499 را در بطن چپ حیوانات افزایش می‌دهد، ولی این تغییرات از نظر آماری معنادار نبود. متعاقب هایپرتروفی پاتولوژیک قلبی نیز میزان بیان miR-499 افزایش و فعالیت ریزاران‌ای‌های هدف یعنی Akt و CaMKII کاهش می‌یابد (۱۳). بنابراین احتمالاً در شرایط پاتولوژیک افزایش بیان miR-499 نمی‌تواند به نفع عضله قلبی باشد. با توجه به نتایج این تحقیق و تحقیقات قبلی می‌توان گفت اگرچه فعالیت ورزشی در شرایط فیزیولوژیک می‌تواند بیان miR-499 را افزایش دهد، در شرایط پاتولوژیک می‌تواند از افزایش بیان miR-499 ناشی از ایجاد سمیت قلبی توسط القای دوکسوروبیسین جلوگیری کند.

جیانگ و همکاران (۲۰۱۴) نیز بیان کردند که تمرینات تناوبی شدید پس از ایجاد AMI می‌تواند به‌واسطه مهار شکافت (DRP1)، افزایش همجوشی میتوکندری (mfn2 و OPA1)، غیرفعال کردن مسیر سیگنالی ERK1/2-JNK-P53 و افزایش بیان PGC-1 α عملکرد قلبی را بهبود بخشد (۳۲). آنها بیان کردند که تمرینات تناوبی شدید پس از AMI می‌تواند از طریق افزایش میزان محتوای آنتی‌اکسیدانتی، بیوزن میتوکندری، Nrf2^۶، فسفوریلاسیون AMPK، فعال کردن SIRT3^۷ و مسیر سیگنالی PI3-K/Akt^۸ از اختلال عملکرد قلبی جلوگیری کند (۳۲). از سوی دیگر، بیان شده است که متعاقب درمان با دوکسوروبیسین میزان

1. AMP-activated protein kinase (AMPK)

2. Ischemia reperfusion (IR)

3. Plasma lactate dehydrogenase (LDH), Creatine kinase (CK)

4. Superoxide dismutase

5. Catalase (CAT)

6. Nuclear factor-erythroid 2-related factor (Nrf2)

7. Anti-oxidative gene sirtuin 3 (SIRT3)

8. Phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K)-protein kinase B (Akt) signaling

ROS افزایش و میزان آنتی‌اکسیدانت‌ها و تولید ATP کاهش می‌یابد (۳۷، ۳۸). جالب توجه اینکه فشار اکسیداتیو سبب افزایش بیان miR-499 در سلول‌های قلبی (به‌عنوان بخشی از واکنش ناشی از استرس) می‌شود (۱۴). همچنین نشان داده شده است که miR-499 تنظیم‌کننده منفی AMPK و PGC-1 α است (۱۰)، بنابراین احتمالاً مسیر سیگنالی AMPK و پروتئین‌های مسئول پویایی و بیوژنز میتوکندری از مکانیسم‌های مولکولی تمرینات تناوبی شدید در کاهش میزان بیان miR-499 پس از تزریق دوکسوروبیسین در تحقیق حاضر می‌تواند باشد که نیازمند بررسی بیشتر است.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد میزان بیان miR-499 در سلول‌های قلبی متعاقب درمان با دوکسوروبیسین افزایش می‌یابد. پس، miR-499 می‌تواند نشانگر بالینی مناسبی در تشخیص زود هنگام آسیب قلبی ناشی از دوکسوروبیسین باشد. با وجود این، تمرینات تناوبی شدید پیش از تزریق دوکسوروبیسین می‌تواند از افزایش پاتولوژیک بیان miR-499 در قلب جلوگیری کند و بدین‌وسیله از سمیت قلبی بکاهد. بنابراین تمرینات تناوبی شدید می‌تواند راهبرد پیشگیرانه مناسبی در محافظت قلب در برابر سمیت قلبی ناشی از القای دوکسوروبیسین باشد.

تقدیر و تشکر

این تحقیق حاصل بخشی از رساله دکتری در پردیس بین‌المللی ارس دانشگاه تهران است. نویسندگان به پاس زحمات و لطف همکاران محترم دانشگاه علوم پزشکی تبریز جهت کمک در انجام سنجش‌های این پژوهش نهایت تشکر و قدردانی را ابراز می‌دارند.

References

1. Dolinsky VW, Rogan KJ, Sung MM, Zordoky BN, Haykowsky MJ, Young ME, et al. Both aerobic exercise and resveratrol supplementation attenuate doxorubicin-induced cardiac injury in mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2013;305(2):E243-E53.
2. Bartlett JJ, Trivedi PC, Yeung P, Kienesberger PC, Pulnilkunnil T. Doxorubicin impairs cardiomyocyte viability by suppressing transcription factor EB expression and disrupting autophagy. *Biochemical Journal*. 2016;473(21):3769-89.
3. Chen JJ, Wu P-T, Middlekauff HR, Nguyen K-L. Aerobic exercise in anthracycline-induced cardiotoxicity: a systematic review of current evidence and future directions. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2017;312(2):H213-H22.
4. Koleini N, Kardami E. Autophagy and mitophagy in the context of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Oncotarget*. 2017;8(28):46663.
5. MacFarlane L-A, R Murphy P. MicroRNA: biogenesis, function and role in cancer. *Current genomics*. 2010;11(7):537-61.
6. Condorelli G, Latronico MV, Cavarretta E. microRNAs in cardiovascular diseases: current knowledge and the road ahead. *Journal of the American College of Cardiology*. 2014;63(21):2177-87.
7. Magenta A, Rossini A, Fasanaro P, Pompilio G, Capogrossi MC. MicroRNAs in Cardiac Regeneration. *MicroRNA in Regenerative Medicine: Elsevier*; 2015. p. 917-42.

8. Holmgren G, Synnergren J, Andersson CX, Lindahl A, Sartipy P. MicroRNAs as potential biomarkers for doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicology in Vitro*. 2016;34:26-34.
9. Schroen B, Heymans S. MicroRNAs and beyond: the heart reveals its treasures. *Hypertension*. 2009;54(6):1189-94.
10. Liu J, Liang X, Zhou D, Lai L, Xiao L, Liu L, et al. Coupling of mitochondrial function and skeletal muscle fiber type by a miR-499/Fnrip1/AMPK circuit. *EMBO molecular medicine*. 2016;8(10):1212-28.
11. Wang J-X, Jiao J-Q, Li Q, Long B, Wang K, Liu J-P, et al. miR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1. *Nature medicine*. 2011;17(1):71.
12. Olivieri F, Antonicelli R, Spazzafumo L, Santini G, Rippo MR, Galeazzi R, et al. Admission levels of circulating miR-499-5p and risk of death in elderly patients after acute non-ST elevation myocardial infarction. *International journal of cardiology*. 2014;172(2):e276-e8.
13. Matkovich SJ, Hu Y, Eschenbacher WH, Dorn LE, Dorn GW. Direct and Indirect Involvement of MicroRNA-499 in Clinical and Experimental Cardiomyopathy Novelty and Significance. *Circulation research*. 2012;111(5):521-31.
14. Wang J, Jia Z, Zhang C, Sun M, Wang W, Chen P, et al. miR-499 protects cardiomyocytes from H₂O₂-induced apoptosis via its effects on Pcd4 and Pacs2. *RNA biology*. 2014;11(4):339-50.
15. Leger KJ, Leonard D, Nielson D, de Lemos JA, Mammen PP, Winick NJ. Circulating microRNAs: potential markers of cardiotoxicity in children and young adults treated with anthracycline chemotherapy. *Journal of the American Heart Association*. 2017;6(4):e004653.
16. Kavazis AN, Smuder AJ, Powers SK. Effects of short-term endurance exercise training on acute doxorubicin-induced FoxO transcription in cardiac and skeletal muscle. *Journal of applied physiology*. 2014;117(3):223-30.
17. Fathi M, Abroun S. The effect of 14 weeks of endurance training on miR-499 expression of left ventricle in wistar male rat. *Journal of Sport Biosciences*. 2016;7(28):59-72. (In Persian).
18. Villelabeitia-Jaureguizar K, Vicente-Campos D, Senen AB, Jiménez VH, Garrido-Lestache MEB, Chicharro JL. Effects of high-intensity interval versus continuous exercise training on post-exercise heart rate recovery in coronary heart-disease patients. *International journal of cardiology*. 2017;244:17-23.
19. Jarrett CL, D'Lugos AC, Mahmood TN, Gonzales RJ, Hale TM, Carroll CC, et al. Effect of high intensity exercise preconditioning and training on antioxidant enzymes in cardiomyocytes during doxorubicin treatment. *The FASEB Journal*. 2016;30(1 Supplement):lb601-lb.
20. Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen Ø. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation*. 2007;14(6):753-60.
21. Asadi M, Shanebandi D, Mohammadpour H, Hashemzadeh S, Sepehri B. Expression Level of miR-34a in Tumor Tissue from Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Journal of gastrointestinal cancer*. 2018:1-4.
22. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*. 2001;29(9):e45-e.
23. Velu K, Ramesh R, Medha R, Sweta K, Hanifa M. Role of serum MicroRNA-499 as a diagnostic marker in acute myocardial infarction (AMI). *Cor et Vasa*. 2018.
24. D'alessandra Y, Devanna P, Limana F, Straino S, Di Carlo A, Brambilla PG, et al. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *European heart journal*. 2010;31(22):2765-73.
25. Yang Y, Zhang H, Li X, Yang T, Jiang Q. Effects of PPAR α /PGC-1 α on the myocardial energy metabolism during heart failure in the doxorubicin induced dilated cardiomyopathy in mice. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2014;7(9):2435.

26. Corsten MF, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, et al. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circulation: Genomic and Precision Medicine*. 2010;CIRCGENETICS. 110.957415.
27. Okamoto A, Asai T, Ryu S, Ando H, Maeda N, Dewa T, et al. Enhanced efficacy of doxorubicin by microRNA-499-mediated improvement of tumor blood flow. *Journal of clinical medicine*. 2016;5(1):10.
28. Kavazis A, Smuder A, Powers S. Endurance exercise protects cardiac muscle against doxorubicin-induced damage via mitochondrial adaptations (706.1). *The FASEB Journal*. 2014;28(1 Supplement):706.1.
29. Marques-Aleixo I, Santos-Alves E, Torrella J, Oliveira P, Magalhães J, Ascensão A. Exercise and Doxorubicin Treatment Modulate Cardiac Mitochondrial Quality Control Signaling. *Cardiovascular toxicology*. 2018;18(1):43-55.
30. Ascensão A, Magalhães J, Soares JM, Ferreira R, Neuparth MJ, Marques F, et al. Moderate endurance training prevents doxorubicin-induced in vivo mitochondrial pathology and reduces the development of cardiac apoptosis. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2005;289(2):H722-H31.
31. Rahimi M, Shekarforoush S, Asgari AR, Khoshbaten A, Rajabi H, Bazgir B, et al. The effect of high intensity interval training on cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in wistar rats. *EXCLI journal*. 2015;14:237.
32. Jiang H-K, Wang Y-H, Sun L, He X, Zhao M, Feng Z-H, et al. Aerobic interval training attenuates mitochondrial dysfunction in rats post-myocardial infarction: roles of mitochondrial network dynamics. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(4):5304-22.
33. Wisløff U, Støylen A, Loennechen JP, Bruvold M, Rognum Ø, Haram PM, et al. Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate continuous training in heart failure patients: a randomized study. *Circulation*. 2007;115(24):3086-94.
34. Fu T-c, Wang C-H, Lin P-S, Hsu C-C, Cherng W-J, Huang S-C, et al. Aerobic interval training improves oxygen uptake efficiency by enhancing cerebral and muscular hemodynamics in patients with heart failure. *International journal of cardiology*. 2013;167(1):41-50.
35. Tjønnå AE, Lee SJ, Rognum Ø, Stølen TO, Bye A, Haram PM, et al. Aerobic interval training versus continuous moderate exercise as a treatment for the metabolic syndrome: a pilot study. *Circulation*. 2008;118(4):346-54.
36. Helgerud J, Høydal K, Wang E, Karlsen T, Berg P, Bjerkaas M, et al. Aerobic high-intensity intervals improve $\dot{V}O_2$ max more than moderate training. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 2007;39(4):665-71.
37. Carvalho FS, Burgeiro A, Garcia R, Moreno AJ, Carvalho RA, Oliveira PJ. Doxorubicin- Induced Cardiotoxicity: From Bioenergetic Failure and Cell Death to Cardiomyopathy. *Medicinal research reviews*. 2014;34(1):106-35.
38. Singal P, Li T, Kumar D, Danelisen I, Iliskovic N. Adriamycin-induced heart failure: mechanisms and modulation. *Molecular and cellular biochemistry*. 2000;207(1-2):77-86.