مجلـــه‌ی علمـــی، پژوهشـــی دانشگاه علـــوم پزشـــکی زنجـــان
دوره‌ی ۲٤, شمـاره‌ی ۱۰٤, مرداد و شهریور ۱۳۹۵, صفحات ۱۰ تا ۱۹

ارزیابی اثرات کرفس بر سمیت ناشی از دوکسوروبیسین در سلول‌های قلبی (H9c2)

دکتر داوود مهدیان[۱]، دکتر آذر حسینی[۲]، دکترحسن رخشنده[۳]

نویسنده‌ی مسوول: مرکز تحقیقات فارماکولوژی گیاهان دارویی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد HoseiniAZ@mums.ac.ir

دریافت: ۹٤/۳/۹ پذیرش: ۹٤/٦/۲۲

چکیده

زمینه و هدف: *دوکسوروبیسین یکی از مهم‌ترین داروهای شیمی درمانی در درمان تومورهای سخت می‌باشد که از طریق تولید رادیکال‌های آزاد و تخلیه‌ی آنتی اکسیدانت‌ها باعث سمیت قلبی می‌شود. بنابراین استفاده از ترکیبات آنتی اکسیدانت سبب کاهش سمیت سلول‌های قلبی می‌گردد. کرفس دارای ترکیباتی با خاصیت آنتی اکسیدانتی می‌باشد و انتظار می‌رود که بتواند سلول‌ها را در برابر آسیب اکسیداتیو ناشی از دوکسوروبیسین محافظت نماید. هدف از این مطالعه بررسی اثر کرفس برسمیت دوکسوروبیسین در سلول‌های قلبی می باشد.*

روش بررسی: *سلول‌های قلبی (H9c2) به مدت ٤ ساعت با غلظت‌های مختلف عصاره‌ی کرفس انکوبه شدند، سپس در حضور دوکسوروبیسن با غلظت ۵ میکرومولار، تا ۲٤ ساعت انکوباسیون ادامه یافت. میزان زنده ماندن سلول‌ها و تحریک آپوپتوز به ترتیب به کمک تست‌های رنگ سنجی MTT و PI مورد ارزیابی قرار گرفت.*

یافته‌ها: *عصاره‌ی کرفس در غلظت‌های ۱۲۵ تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، میزان سمیت ناشی از دوکسوروبیسین را افزایش داد. همچنین کرفس در غلظت‌های ۲۵۰میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آپوپتوز ناشی از دوکسوروبیسین را تحریک نمود.*

نتیجه گیری: *نتایج نشان داد که استفاده از کرفس به تنهایی سمیتی بر سلول‌های قلبی نداشت اما عصاره نتوانست از سلول‌های قلبی در برابر سمیت ناشی از دوکسوروبیسین محافظت نماید. مکانیسم‌های مختلفی مانند افزایش تولید رادیکال‌های آزاد، افزایش بیان پروتئین‌های دخیل در آپوپتوز و افزایش دارو رسانی به سلول می‌توانند نقش داشته باشند.*

واژگان کلیدی: ***دوکسوروبیسین، H9c2، آپوپتوز، کرفس***

مقدمه

دوکسوروبیسین (Doxorubicin) با نام تجاری آدریامایسین (Adriamycin) یک داروی ضد سرطان است که با رشد و گسترش سلول‌های سرطانی که در بدن تداخل ایجاد می‌کنند، مبارزه می‌کند. این دارو از خانواده‌ی آنتی‌بیوتیک‌های آنتراسیکلین می‌باشد که بسیار قوی و دارای طیف اثرضد توموری بالایی می‌باشد و برای درمان تومورهای سخت و بدخیمی‌های خونی مورد استفاده قرار می‌گیرد. دوکسوروبیسین برای درمان انواع مختلف سرطان مانند سرطان پستان، مثانه، تخمدان، تیروئید، معده، ریه، استخوان، بافت‌های عصبی، عضلات، مفاصل، و بافت نرم مورد استفاده قرار می‌گیرد. دوکسوروبیسین همچنین برای درمان بیماری هوچکین و انواع خاصی از سرطان خون استفاده می‌شود.

۱- دانشجوی دکترای تخصصی فارماکولوژی، گروه فارماکولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد

۲- دکترای تخصصی فارماکولوژی، استادیار مرکز تحقیقات فارماکولوژی گیاهان دارویی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد

۳- دکترای داروسازی، استادیار مرکز تحقیقات فارماکولوژی گیاهان دارویی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد

دوکسوروبیسین با قرار گرفتن در میان دو جفت باز DNA و بازکردن رشته‌های آن، ساخت DNA و RNA وابسته به DNA را مهار می‌کند، و از این طریق، اثر سمی خود را بر روی سلول اعمال می‌کند. دوکسوروبیسین از ساخت پروتئین‌ها مانند DNA، RNA پلیمراز و DNA توپوایزومراز II نیز جلوگیری می‌کند و باعث آپوپتوز می‌شود. دوکسوروبیسین علیرغم اثرات ضد سرطانی خوبی که دارد اما دارای عوارض جانبی بسیار زیادی می‌باشد، از آن جمله می‌توان به تب، پارستزی، نوروپاتی محیطی، مسمومیت قلبی (تغییرات EKG، مانند تاکیکاردی سینوسی، پهن‌شدن موج T، پایین‌افتادن قطعه ST و کاهش ولتاژ)، آریتمی، کاردیومیوپاتی برگشت‌ناپذیر اشاره کرد (۱). مکانیسم دقیق سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین مشخص نشده است. دو تئوری اصلی در این رابطه وجود دارد: ۱-تولید متابولیت دوکسوروبیسینول که باعث تداخل در چرخه‌ی آهن و کلسیم شده و همچنین تولید رادیکال‌های آزاد وابسته به آهن ۲- تخریب میتوکندری سلول (۱). با این وجود محققین همواره در تلاش برای یافتن راهی در جهت کاهش عوارض جانبی، سمیت دوکسوروبیسین و همچنین حفظ اثرات درمانی آن بر روی سلول‌های سرطانی می‌باشند. امروزه به علت اینکه ترکیبات طبیعی دارای اثرات آنتی‌اکسیدانتی قوی‌تری هستند استفاده از این ترکیبات در جهت کاهش عوارض جانبی دوکسوروبیسین مورد توجه قرار گرفته است. گیاه کرفس با نام علمی *Apium graveolens* که با نام عمومی Celery و یا Wild Celery در جهان مشهور است، متعلق به تیره‌ی چتریان ودارای ۱۱٤ جنس و ٤۲۰ گونه است. کرفس گیاه علفی ودوساله، تقریبا سبز مات، بدون کرک با ریشه‌ی عمودی و دوکی شکل است. گل آن سفید و مجتمع در چترهای بدون پایه است. این گیاه بیشتر در شمال شرقی سمنان، کوه پیغمبر، دره گز، شرق وجنوب شرقی زابل در سیستان و بلوچستان وجود دارد (۲). گیاه کرفس سرشار از انواع ویتامین‌ها از جمله ویتامین آ، ب و ث است و دارای املاح و مواد معدنی بسیار زیادی می‌باشد و می‌تواند مکمل خوبی برای زیبایی پوست و مو باشد. مصرف آن به تقویت لثه‌ها کمک کرده و از بروز بیماری اسکوروی پیشگیری می‌کند (۳). اسیدهای چرب فرار موجود در این گیاه، محرک اشتهاست و پتاسیم موجود در کرفس علاوه بر تحریک ادرار باعث کاهش فشار خون می‌شود و به‌همراه گوگرد موجود در آن بیش از همه برای بیماران مبتلا به نقرس و افرادی که از دردهای مفصلی و روماتیسم رنج می‌برند، توصیه می‌شود (۵و٤). گیاه کرفس دارای خاصیت ضدمیکروبی است و در بهبود آسم و سرماخوردگی‌های ریوی مناسب است. این گیاه حاوی درصد بالایی فیبر است، بنابراین ملین بسیار مناسبی به‌شمار می‌آید. مصرف برگ و ساقه‌های کرفس در مورد کسانی که از ناراحتی‌های گوارشی نظیر یبوست رنج می‌برند بسیار نافع است. کرفس همچنین ضد نفخ است و تب را نیز پایین می‌آورد (۵). مصرف آن به خصوص به افراد درگیر با بیماری‌های قلبی عروقی و چربی خون بالا توصیه می‌شود، ویتامین B6 و اسید پانتوتنیک موجود در آن به همراه منیزیم و کلسیم اثر مثبتی در تقویت ماهیچه‌ها داشته و دارای اثرات شگرف در آرامش روانی است (۶). فلاونوئیدهای زیادی از جمله لوتئولین، کرستین در گیاه کرفس یافت می‌شود که دارای خواص آنتی اکسیدانتی می‌باشند. با توجه به اثرات آنتی اکسیدانتی گیاه، در این مطالعه اثرات گیاه کرفس در برابر سمیت ناشی از دوکسوروبیسین بر روی رده‌ی سلولی میوسیت قلبی مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت.

روش بررسی

گیاه کرفس از بازار محلی مشهد خریداری شد. پروپیدیم یدید (PI)، سیترات سدیم، تریتون X-100 و ۳-(۴ و ۵- دی متیل تیازول-۲-ایل)-۲ و ۵- دی فنیل تترازولیوم (MTT) از سیگما خریداری شد. مواد دیگر به‌طور عمده شامل DMEM

گلوکز بالا، پنی سیلین-استرپتومایسین و FBS از Gibco خریداری شد.

تهیه‌ی عصاره: بخش‌های هوایی کرفس، خشک، سپس پودرشده و در معرض استخراج با اتانول ۷۰ درصد در دستگاه سوکسله به مدت ٤٨ ساعت قرار گرفتند. سپس عصاره‌ی آبی الکلی به‌دست آمده درحمام آب خشک شده و در حلال DMSO محلول شد.

کشت سلول و درمان: سلول‌های H9c2 از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول‌ها در محیط DMEM با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، ۱۰۰ واحد بر میلی لیتر پنی سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین کشت داده شدند. سپس از پلیت‌های ۹٦ و ٢٤ خانه جهت بررسی میزان زنده ماندن سلول‌ها و آپوپتوز به‌ترتیب استفاده گردید. جهت بررسی آپوپتوز، سلول‌ها درپلیت ٢٤ خانه به تعداد ۱۰۰،۰۰۰ سلول در هر چاهک کشت داده شدند (۲۱). تمام تست‌ها سه بار تکرار گردید. جهت بررسی MTT، در ابتدا سلول‌ها با عصاره پیش درمان شدند بدین صورت که سلول‌ها به مدت ٤ ساعت در مجاورت غلظت‌های مختلف عصاره (۱۵-۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) قرار گرفتند، سپس دوکسوروبیسین با غلظت ۵ ماکرومولار اضافه شد. پس از گذشت ٢٤ ساعت میزان زنده ماندن سلول‌ها از طریق تست MTT مورد ارزیابی قرار گرفت.

تعیین میزان بقای سلولی (viability) با استفاده از آزمون MTT: اساس این روش شکستن نمک تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده است. نتیجه‌ی این فعالیت ایجاد بلورهای فورمازان ارغوانی رنگ می‌باشد که توسط دی متیل سولفوکساید به صورت محلول در می‌آیند. پس از دو پاساژ سلولی جهت سنجش MTT سلول‌های H9c2 به میزان ۵۰۰۰ سلول در هر خانه کشت داده شدند. پس از مجاورت سلول‌ها با غلظت‌های مختلف از عصاره‌ی کرفس (۱۵ تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۴ ساعت، سپس دوکسوروبیسین اضافه شد و بعد از ۲۴ ساعت با استفاده از رنگ دی متیل تیازول و دی فتیل تترازولیوم میزان زنده ماندن سلول‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. به این ترتیب که ۱۰ میکرولیتر محلول MTT حل شده در محیط کشت به غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به هر کدام از خانه‌های ۹۶ تایی اضافه شد و سلول‌ها برای دو ساعت در انکوباتور در حرارت ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از اینکه محیط سلول‌ها دور ریخته شد به رسوب (سلول‌ها و بلورهای حاصله از محلول) ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد و جذب نوری آن‌ها در ۵۷۰ نانومتر (در برابر ۶۲۰ نانومتر) در دستگاه الایزا ریدر بررسی شد (۸و ۷).

رنگ آمیزی PI: از خاصیت نفوذپذیر شدن غشای سلول‌های مرده و زنده می‌توان برای تعیین سلول‌های آپوپتوتیک استفاده کرد. در رنگ آمیزی با محلول فلورسنت PI، غشای سلول‌ها نفوذ پذیر شده و هسته سلول‌های آپوپتوتیک که دارای DNA تکه تکه شده هستند رنگ‌آمیزی می‌شود. برای انجام این تست از یک پلیت ۲۴ خانه استفاده می‌شود. ۵۰۰ میکرولیتر از محیط کشت همراه سلول (۱۰۰۰۰۰ سلول) به هر کدام از چاهک‌ها انتقال داده شد. به‌مدت ۲۴ ساعت پلیت مربوطه را در انکوباتور قرار دادیم تا سلول‌ها به‌طور کامل در کف پلیت بچسبند. بعد از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف از عصاره‌ی کرفس با دوکسوروبیسین، محیط رویی جدا شده و سانتریفیوژ گردید. در مرحله‌ی بعدی رنگ PI به مقدار ۷۵۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد و به مدت نیم ساعت داخل انکوباتور قرار گرفت. بعد از نیم ساعت محیط هر چاهک به رسوب قبلی حاصل از سانتریفیوژ اضافه و برای یک شب در یخچال قرار گرفت و در روز بعد توسط فلوسایتومتری خوانده شد (۱۰و۹).

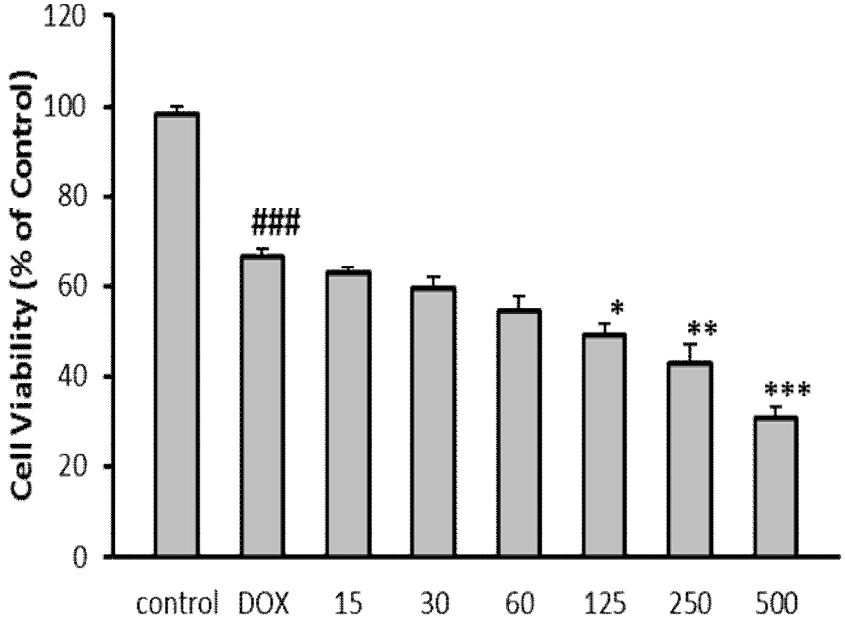
روش تجزیه و تحلیل داده‌ها و بررسی آماری: برای تحلیل داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس ANOVA استفاده شد و

تعیین اختلاف بین گروه‌ها با آزمون Benferoni بررسی گردید. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارایه گردید و P<۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد. نتایج به‌دست آمده در ارزیابی آپوپتوز توسط فلوسایتومتری به‌وسیله‌ی نرم‌افزار WinMDI-2.7 مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها

اثر عصاره‌ی هیدروالکلی کرفس بر میزان زنده ماندن سلول‌های قلبی در مقایسه با گروه کنترل:

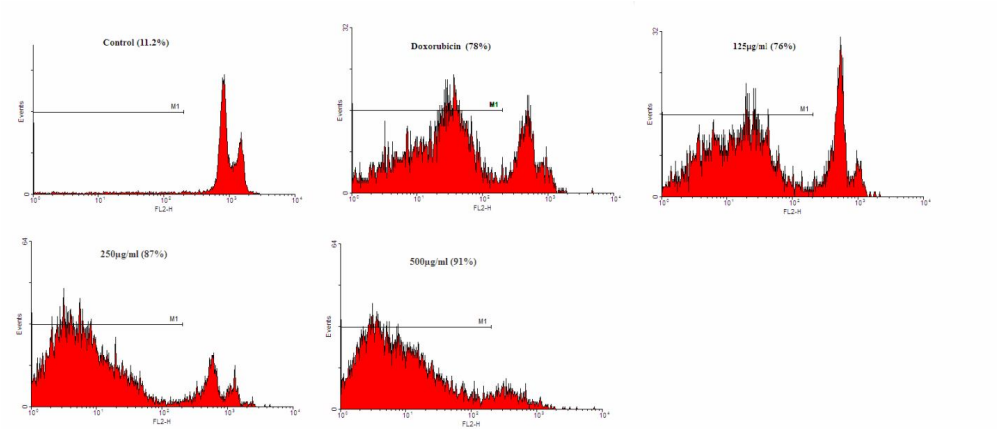
دوکسوروبیسین میزان زنده ماندن سلول‌ها را به طور قابل توجهی کاهش داد (P<۰/۰۰۱, ۶۷±۱/۴ درصد). عصاره‌ی کرفس در غلظت‌های مختلف نتوانست سمیت دوکسوروبیسین را کاهش دهد و در غلظت‌های ۱۲۵ تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر میزان سمیت دوکسوروبیسین را به‌طور معنی‌داری افزایش داد (۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و P<۰/۰۵)، (۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و P< ۰/۰۱)، (۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و P<۰/۰۰۱) (شکل ۱).

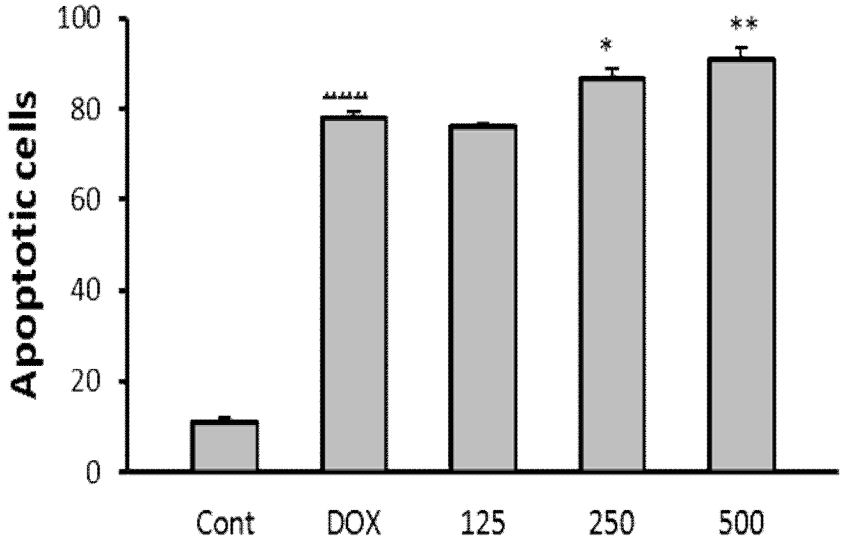


شکل ۱: بررسی میزان زنده ماندن سلول‌ها. ابتدا سلول‌ها به مدت ۴ ساعت با غلظت های مختلف عصاره پیش درمان شدند سپس دوکسوروبیسین با غلظت ۵ ماکرومولار به محیط اضافه شد و پس از ۲۴ ساعت میزان زنده ماندن سلول ها بررسی گردید $P<۰/۰۰۱^{###}$ در مقایسه با گروه کنترل $P<۰/۰۵^{*}$، $P<۰/۰۱^{**}$ و $P<۰/۰۰۱^{***}$ در مقایسه با گروه دوکسوروبیسین.

اثر عصاره‌ی هیدروالکلی کرفس بر میزان تحریک آپوپتوز:

میزان آپوپتوز در سلول‌های H9c2 توسط فلوسایتومتری دستگاه BDFACS Calibur و به وسیله‌ی رنگ آمیزی PI مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که دوکسوروبیسین میزان آپوپتوز را در مقایسه با گروه کنترل به طور قابل توجهی افزایش داد (P<۰/۰۰۱). غلظت‌های مختلف عصاره نتوانست آپوپتوز ناشی از دوکسوروبیسین را کاهش دهد، و در غلظت ۲۵۰ و ۵۰۰ آپوپتوز ناشی از دوکسوروبیسین را افزایش داد (شکل ۲).





شکل ۲: بررسی میزان تحریک آپوپتوزیس توسط فلوسایتومتری، ###P<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه کنترل
*****P< ۰/۰۱ و *P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه دوکسوروبیسین***

بحث

آدریامایسین (دوکسوروبیسین) یکی از مهم‌ترین داروهای شیمی درمانی در بیماری‌هایی چون لوکمی، لنفوم و خیلی از تومورهای سخت می‌باشد. اما درمان با این دارو منجر به عوارض حاد (میلو ساپرشن، آریتمی، ...) که برگشت پذیر و قابل درمان بوده و عوارض مزمن (کاردیومیوپاتی پیشرفته و نارسایی احتقانی قلب) که غیر قابل برگشت (Irreversible) بوده و دارای پیش آگهی بدی می‌باشد، می‌گردد. از آنجا که در برخی از بیماران اولین علایم سمیت قلبی ظرف ٤ تا ٢٠ سال بعد از قطع درمان بروز می‌کند لذا ریسک گسترش نارسایی قلب در بیماران سرطانی درمان شده با آدریامایسین به‌عنوان یک عامل تهدید کننده‌ی حیات باقی می‌ماند (۱۱). تحقیقات نشان داده‌اند که دوکسوروبیسین از طریق تولید رادیکال‌های آزاد و تخلیه‌ی آنتی‌اکسیدانت‌ها سمیت قلبی را باعث می‌شود (۱۲). بنابراین استفاده از ترکیباتی که دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی باشند می‌توانند سبب کاهش سمیت و یا حفاظت سلول‌های قلبی در برابر سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین شود. عوامل آنتی اکسیدانت مانند

Dexrazoxane از طریق مهار تولید رادیکال‌های آزاد سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسن را کاهش داده‌اند (۱۳). براساس مطالعات موجود استفاده از ترکیبات گیاهی به عنوان محافظت کننده‌ی قلب در طب سنتی ایران و جهان سال‌هاست که مورد توجه قرار گرفته است. در مطالعه‌ای اثر Glycyrrhiza uralensis در رت‌های درمان شده با دوکسوروبیسین مورد ارزیابی قرار گرفت، نتایج نشان داد که عصاره‌ی گیاه توانست سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسن را کاهش دهد (۱٤). چن و همکارانش نشان دادند که ترکیب Gingerol (ماده موثره‌ی زنجبیل) با ماده‌ای به نام Higenamine (یک ترکیب شیمیایی که در بسیاری از گیاهان یافت شده و اثرات کاردیوتونیک دارد) از طریق کاهش استرس اکسیداتیو و آپوپتوز سمیت ناشی ازدوکسوروبیسین در سلول‌های قلبی را کاهش می‌دهد (۱۵). در مطالعه‌ای دیگر اثر محافظتی آنتی اکسیدانت گیاه Seasamol بر سمیت قلبی دوکسوروبیسین گزارش شده است (۱٦). ایکسائو و همکاران نیز اثرات محافظتی ترکیب گیاهی Kaempferol بر سمیت قلبی دوکسوروبیسین را گزارش کرده‌اند (۱۷). همچنین به اثرات محافظتی فلاونویید گیاهی Chrysoeriol در برابر سمیت قلبی دوکسوروبیسین اشاره شده است (۱۸). در مطالعه‌ای دیگر به اثرات حفاظتی عصاره‌ی گیاه Gnetum bucholzianum بر استرس اکسیداتیو ناشی از دوکسوروبیسین در سلول‌های قلبی اشاره شده است (۱۹). با توجه به مطالعات انجام شده، در این مطالعه اثر عصاره‌ی هیدروالکلی کرفس بر سمیت ناشی از دوکسوروبیسین در سلول‌های H9c2 مورد ارزیابی قرار گرفت. کرفس به خانواده‌ی چتریان تعلق دارد و در اکثر نقاط دنیا کشت داده می‌شود. از برگ‌ها، ساقه و دانه‌ی آن در درمان بیماری‌های مختلف استفاده می‌شود. کرفس حاوی ترکیبات آروماتیک در برگ، ساقه و ریشه می‌باشد. ترکیبات آنتی‌اکسیدانت مختلفی مانند کرستین، لوتئولین و فلاونوئیدها در کرفس یافت می شود. مطالعات نشان داده‌اند که کرفس اثرات ضد قارچ، ضد باکتری، ضد دیابت، آنتی‌اکسیدانتی و حفاظت کبدی دارد. همچنین در رت‌های هایپرکلسترولمیک سبب کاهش میزان چربی خون می‌شود (۲۳-۲۰). با توجه به ترکیبات موجود در کرفس و خاصیت آنتی‌اکسیدانتی آن انتظار می‌رود که بتواند سلول‌ها را در برابر آسیب اکسیداتیو محافظت نماید، بنابراین در این مطالعه اثر حفاظتی آن علیه دوکسوروبیسین در سلول‌های قلبی مورد ارزیابی قرار گرفت. سلول‌های قلبی از نظر مورفولوژی شبیه سلول‌های جنینی هستند، از آنجا که سلول‌های H9c2 تمام مسیرهای الکتریکی که در سلول بالغ یافت می شود را دارند بنابراین جهت مطالعات فارماکولوژیکی و آسیب اکسیداتیو مدل مناسبی می‌باشند (۲۴). در این مطالعه نشان داده شد که دوکسوروبیسین میزان مرگ و میر سلول‌ها و میزان آپوپتوز را در سلول‌های قلبی افزایش داد. نتایج نشان داد که استفاده از کرفس به تنهایی سمیتی بر سلول‌های قلبی نداشت. اما در ترکیب با دوکسوروبیسین، نتوانست از سلول‌های قلبی در برابر دوکسوروبیسین محافظت نماید و میزان مرگ و میر سلول‌ها افزایش یافت. همچنین نتایج به دست آمده از PI نشان داد که میزان سلول‌های آپوپتوتیک افزایش داشتند. این نتایج بیانگر این است که رادیکال‌های آزاد در محیط افزایش یافته است. مطالعات نشان داده‌اند که نیتریک اکساید، O_2 را از محیط برداشته و از تولید رادیکال‌های آزاد توسط دوکسوروبیسین جلوگیری می‌کند بنابراین در غیاب محرک‌های تولید نیتریک اکساید (iNOS) دوکسوروبیسین آسیب جدی به سلول‌های قلبی وارد می‌کند (۲۵). گزارشات قبلی نشان داده‌اند که کرفس به‌عنوان یک مهار کننده بیان (iNOS) بوده بنابراین احتمال دارد از طریق این مکانیسم باعث افزایش تولید رادیکال آزاد در سلول‌های قلبی شده است. مکانیسم دیگری که احتمال دارد نقش داشته باشد افزایش ورود دارو به سلول می‌باشد (۲٦). در مخزن الادویه عقیلی خراسانی به این مطلب اشاره نموده است که خوردن

کرفس قبل و بعد از گزیدن عقرب یا سایر سموم می‌تواند سمیت ناشی از آن‌ها را تشدید نماید که نشان دهنده‌ی این است که باعث افزایش ورود سم به داخل سلول شده است یا به‌عبارتی دیگر ورود آن را تسهیل نموده است (۲۷). در نتیجه این مکانیسم هم می‌تواند در افزایش سمیت ناشی از دوکسوروبیسین در سلول‌های قلبی H9c2 نقش داشته باشد.

نتیجه گیری

یافته‌های ما نشان می‌دهند که باوجود ترکیبات آنتی‌اکسیدانتی فراوانی که در کرفس وجود دارد عصاره‌ی هیدروالکلی آن نتوانست سلول‌ها را در مجاورت دوکسوروبیسین در محیط in vitro محافظت نماید. مکانیسم‌های مختلفی می‌توانند از جمله افزایش تولید رادیکال‌های آزاد، افزایش بیان پروتئین‌های دخیل در آپوپتوز و افزایش دارو رسانی به سلول می‌توانند نقش داشته باشند. در نتیجه مطالعات بیشتری جهت تعیین مکانیسم دقیق آن لازم می‌باشد.

References

1- Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetics Genomics*. 2011; 21: 440-6.

2- Sahroverdi N, Sahroverdi F. Determination of chemical compounds of *Apium graveolens*. The First of Conference on Modern Agricultural Sciences & Technologies. 1390.

3- Kooti W, Ali-Akbari S, Asadi-Samani M, Ghadery H, Ashtary-Larky D. A review on medicinal plant of *Apium graveolens*. *Adv Herbal Med*. 2014; 1: 48-59.

4- Dianat M, Veisi A, Ahangarpour A, Fathi Moghaddam H. The effect of hydro-alcoholic celery *(Apium graveolens)* leaf extract on cardiovascular parameters and lipid profile in animal model of hypertension induced by fructose. *Adv Herbal Med*. 2014; 5: 203-9.

5- Salman HR, Al-Khafaji BA, Mohammed N. Effect of *Apium graveolens* leaves and stalks in reducing the side effects of doxorubicin in male rabbits. *Med J Babylon*. 2014; 10: 1-8.

6- Hardani A, Afzalzadeh MR, Amirzargar A, Mansouri E, Meamar Z. Effects of aqueous extract of celery *(Apium graveolens L.)* leaves on spermatogenesis in healthy male rats. *Avicenna J Phytomed*. 2015; 5: 113-9.

7- Suzuki Y, Ono Y, Hirabayashi Y. Rapid and specific reactive oxygen species generation via NADPH oxidase activation during Fas-mediated apoptosis. *FEBS Lett*. 1998; 425: 209-12.

8- Finkel T. Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett*. 2000; 476: 52-4.

9- Tammariello SP, Quinn MT, Estus S. NADPH oxidase contributes directly to oxidative stress and apoptosis in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons. *J Neurosci*. 2000; 20: RC53.

10- Hampton MB, Orrenius S. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett*. 1997; 414: 552-6.

11- Singal PK, Tiamaoli, Kumar D. Adriamycin-induced heart failure: mechanisms and modulation. *Mol Cell Biol*. 2000; 207: 77-85.

12- Libby P, Bonow R. Braunwalds Heart disease. Nine edition; 2011.

13- Laurence L. Brunton, Keith L. Parker. The pharmacological basis of therapeutics Goodman &Gillman, 12th ed. New York: McGraw-Hill; 2011.

14- Zhang L, Yang Y, Yu L, Wang Y, Liu L, Fan X. Cardioprotective effects of glycyrrhiza uralensis extract against doxorubicin-induced toxicity. 2011; 30: 181-9.

15- Chen YL, Zhuang XD, Xu ZW, Lu LH. Higenamine combined with [6]-Gingerol suppresses doxorubicin-triggered oxidative stress and apoptosis in cardiomyocytes via upregulation of PI3K/Akt Pathway. *J Altern Complement Med*. 2013; 2013.

16- Nayak PG, Paul P, Bansal P, Kutty NG, Pai KS. Sesamol prevents doxorubicin-induced oxidative damage and toxicity on H9c2 cardiomyoblasts. *J Pharm Pharmacol*. 2013; 65: 1083-93.

17- Xiao J, Sun G-B, Sun B, et al. Kaempferol protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in vivo and in vitro. *J Toxicol Sci*. 2012; 292: 53-62.

18- Zhe L, Xiao-dong S, Ying X, et al. Protective effect of chrysoeriol against doxorubicin-induced cardiotoxicity in vitro. *Chin Med J*. 2009; 122: 2652-56.

19- Johnkennedy N, Ifeoma U.H. Cardioprotective effect of *Gnetum Bucholzianum* leaf extract against doxorubicin cardiomyopathy in wistar rats. *Int J Med Sci*. 2012; 1: 61-64.

20- Li P, Jia J, Zhang D, Xie J, Xu X, Wei D. In vitro and in vivo antioxidant activities of a flavonoid isolated from celery *(Apiumgraveolens L. var. dulce). Food Funct.* 2014; 5: 50-6.

21- Kolarovic J, Popovic M, Zlinska J, Trivic S, Vojnovic M. Antioxidant activities of celery and parsley juices in rats treated with doxorubicin. *Molecules*. 2010; 15: 6193- 6204.

22- Popovic M, Kaurinovic B, Trivic S, Mimica-Dukic N, Bursac M. Effect of celery *(Apiumgraveolens)* extracts on some biochemical parameters of oxidative stress in mice treated with carbon tetrachloride. *Phytother Res.* 2006; 20: 531-37.

23- Tsi D, Das NP, Tan BK. Effects of aqueous celery *(Apium graveolens)* extract on lipid parameters of rats fed a high fat diet. *Planta Med.* 1995; 18-21.

24- Sheng R, Gu ZL, Xie ML, Zhou WX, Guo CY. Epigallocatechin gallate protects H9c2 cardiomyoblasts against hydrogen dioxides-induced apoptosis and telomere attrition. *Eur J Pharmacol*. 2010; 641: 199-206.

25- Cole MP, Chaiswing L, Oberley TD, et al. The protective roles of nitric oxide and superoxide dismutase in adriamycin-induced cardiotoxicity. *Cardiovasc Res.* 2006; 69-186.

26- Mencherini T, Cau A, Bianco G, Della Loggia R, Aquino RP, Autore G. An extract of *Apium*

graveolens var. dulce leaves: structure of the major constituent, apiin, and its anti-inflammatory properties. *J Pharm Pharmacol.* 2007; 59: 891-7.

27- Makhzanol-advieh. Aghili-Khorasani. 2nd Edition. 1371.

The Effect of *Apium Graveolens* on Doxorubicicin-Induced Toxicity in H9c2 Cardiomyoblasts

Mahdian D[1], Hosseini A[2], Rakhshandeh H[2]

[1]Dept. of Pharmacology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

[2]Pharmacological Research Center of Medicinal Plants, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

Corresponding Author: Hosseini A, Pharmacological Research Center of Medicinal Plants, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

E-mail: HoseiniAZ@mums.ac.ir

Received: 30 May 2015 **Accepted:** 13 Sep 2015

Background and Objective: Doxorubicin is one of the most effective chemotherapeutic agents against solid tumors. Doxorubicin causes cardio-toxicity via production of free radicals and depletion of anti-oxidants. However, the use of anti-oxidants can decrease doxorubicin-induced cardio-toxicity. *Apium graveolens* (celery) contains anti-oxidant compounds. Hence, this study was an attempt to figure out if it can protect heart cells against oxidative stress of doxorubicin.

Materials and Methods: The cells were incubated with different concentrations of *Apium graveolens* (celery) extract for 4 hours which continued in the presence of 5µM doxorubicin for 24 hours. Cell viability and the apoptotic induction were determined using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium (MTT) and propidium iodide (PI) staining assays, respectively.

Results: Celery extract increased toxicity of doxorubicin at a concentration of 125-500 µg/ml. Also apoptosis was induced in the presence of doxorubicin at a concentration of 250 and 500µg/ml.

Conclusion: Results showed that celery has no toxicity effect on heart cells alone. However, this extract could not protect cells against doxorubicin- induced cardiotoxicity. A number of mechanisms may increase this effect such as augmentation of free radicals, increased drug delivery into the cells and expression of apoptotic proteins. Further research is needed to decide upon accuracy mechanism.

Keywords: Doxorubicin, H9c2, Apoptosis, Apium graveolens