

مقاله پژوهشی

اثرات دو فازی- سمی دیگوکسین بر کاردیومیوپاتی ناشی از دوکسوروبیسین: نقش بالقوه به عنوان یک شاخص سمیت حاد

محمد آزادبخت^۱، وحید خوری^{۲*}، سیده حدیثه هاشمیان^۳، مونا پورابوک^۲، مریم رجائی^۲

۱. گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری

۲. مرکز تحقیقات اختلالات ایسکمیک، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان

۳. دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری

پذیرش: ۸ شهریور ۹۴

دریافت: ۱۱ خرداد ۹۴

چکیده

زمینه و هدف: هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات دیگوکسین بر خصوصیت الکتروفیزیولوژیک و مکانیکی قلب موش صحرایی نارسا شده بوسیله دوکسوروبیسین می باشد.

روش ها: جهت ایجاد نارسایی قلب، دوکسوروبیسین با دوز ۵ mg/kg داخل صفاقی یکبار در هفته بمدت ۳ هفته به موشهای صحرایی تزریق شد. بعد از ۵ هفته با اندازه گیری پارامترهای الکتریکی، مکانیکی و تغییرات بافتی در ۱۲ قلب جدا شده، از ایجاد نارسایی قلب اطمینان حاصل شد. با روش لانگهندروف خصوصیات مکانیکی و الکتریکی قلب در تماس ۶۰ دقیقه ای با غلظت های مختلف دیگوکسین (۸۰-۰/۱ μ M) اندازه گیری شد.

یافته ها: اثرات دیگوکسین بر قلب نارسا دو فازی بود. هم در غلظتهای کمتر از ۸۰ μ M (فاز ۱) و هم در غلظتهای بیشتر از ۸۰ μ M (فاز ۲) دیگوکسین فشار دیاستولی بطن چپ و RPP (حاصل ضرب ضربان قلب در فشار دیاستولی بطن چپ) را بطور فاحشی زیاد کرد. با این حال در فاز ۲ موجب کاهش معنی دار جریان کرونر، ضربان قلب، فشار پیشرونده بطن چپ و برون ده قلب شد.

نتیجه گیری: در قلب نارسا شده توسط دوکسوروبیسین، اثرات دیگوکسین با توجه به غلظت به شکل دو مرحله ای ظاهر می شود. تغییر پارامترهای الکتروفیزیولوژیک در فاز ۲، می تواند بعنوان معیار مناسبی در پیش آگهی از اثرات دیگوکسین مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: اثرات دو فازی، دوکسوروبیسین، دیگوکسین، قلب جدا شده، کاردیومیوپاتی، لانگهندروف

مقدمه

این دسته دارویی موجب محدودیت کاربرد درمانی آن ها شده است به علاوه، فواید درمانی دیجیتالیس در قرن اخیر منجر به ارائه فرضیه وجود دیژیتال های درون زاد شده است. این ترکیبات اندوژن در غلظت های بالا در پلاسما در زمان وقوع بیماری هایی از قبیل پر فشاری خون و نارسایی قلبی تولید شده و می توانند منجر به دفع سدیم و در نتیجه موجب کاهش حجم خون می شوند [۱].

علاوه بر این مطالعات اخیر نشان داده است که دیگوکسین می تواند به عنوان مهارکننده رشد سلول سرطانی در

کاردنولیدها و بوفادی انولیدها به عنوان اجزای اصلی گیاهان رده دیجیتالیس، در شرق و غرب به طور گسترده در درمان بالینی فیبریلاسیون دهلیزی و نارسایی قلبی کاربرد دارند. با این وجود پتانسیل آریتمی زایی و پنجره درمانی باریک

vaph99@yahoo.com

http://ijpp.phypha.ir

ijpp@phypha.ir

* نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

پست الکترونیکی:

اتونوم، مغز و سیستم بارورسپتور را دخیل می دانند [۸]. این در حالی است که در اکثر مطالعات قلبی اثرات دیگوگسین در گستره جدا شده بطنی در گونه های مختلف حیوانی مطالعه شده و در کمتر تحقیقی قلب کامل به عنوان مدل نارسایی قلبی مورد استفاده قرار گرفته است. از طرفی عده ای دیگر از محققان طیف اثرات دوفازی گلیکوزیدهای قلبی را به علت شرایط الکترولیتی و سیستم اتونوم و حساسیت کاردیومیوسیت ها در شرایط قلب سالم و نارسایی قلبی مسئول اثرات آن می دانند. به هر حال با توجه به کلیه این مطالعات تاکنون علت دقیق اثرات دوفازی دیگوگسین در غلظت های مختلف به صورت دینامیک در ارتباط با پارامترهای مکانیکی و الکتریکی قلب در کمتر مطالعه ای بررسی شده است.

مهم ترین فرضیه تحقیق حاضر این است که دیگوگسین میتواند در شرایط پتاسیم نرمال، عدم وجود سیستم سمپاتیک و پاراسمپاتیک در قلب جدا شده در قلب سالم و قلب نارسا در غلظت های مختلف رفتارهای مختلفی را مخصوصا بر پارامترهای مکانیکی و الکتریکی قلب داشته باشد. در صورت اثبات این فرضیه نقش متغیرهای فارماکوکینتیک در اثرات دوفازی دیگوگسین کاملا از بین می رود و نقش فارماکودینامیک نحوه جذب و اتصال دیگوگسین به پمپ $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ اساسی یا پررنگ تر می شود. بنابراین تحقیق حاضر با هدف بررسی اثرات دوفازی دیگوگسین بر خواص مکانیکی و الکتریکی قلب موش صحرایی کاردیومیوپاتی شده با دوکسوروبیسین طراحی شده است.

مواد و روش ها

در این مطالعه از موش های صحرایی نر نژاد ویستار با محدوده وزنی ۲۵۰-۳۰۰ گرم استفاده شد. در گروه دوکسوروبیسین به دلیل احتمال ۳۰ درصد مرگ و میر ۸ سر و در گروه شاهد ۶ سر حیوان انتخاب شدند. تمام حیوانات قبل از آزمایش، در قفس های مخصوص با رعایت چرخه نور/تاریکی (۱۲/۱۲) و دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. شاخص های پایه الکتروفیزیولوژی در هر گروه قبل از تزریق دوکسوروبیسین، هفته دوم پس از شروع و انتهای هفته ۵ تا ۶ اندازه گیری شدند. همچنین کلیه نمونه ها پس از ایجاد نارسایی قلبی، جراحی شده و قلب آن ها جداسازی و در مدل پرفیوژن لانگهندروف تغذیه شده و پروتکل های اختصاصی اجرا

غلظت های بالا در ایجاد مرگ برنامه ریزی شده سلولی ایفای نقش کند [۲]. به همین دلیل در سالهای اخیر دیگوگسین و مشتقات کاردنولیدهای قلبی دوباره مورد توجه قرار گرفته اند. از طرف دیگر اثرات دیگوگسین وابسته به غلظت می باشد. بدین صورت که همانند اثرات مختلف آن در درمان نارسایی قلبی، این دارو می تواند در طیف غلظتی متفاوت اثرات مختلف و خلاف یکدیگری را در رشد و مرگ سلولی و همچنین در سایر اثرات مانند ایجاد آریتمی های قلبی و اثرات عروقی داشته باشد [۳]. با وجود این، در بسیاری از مطالعات گذشته اثر کاردنولیدهای قلبی در محدوده غلظتهای درمانی کار شده که نمی تواند اثرات این ترکیبات را در غلظت های بالا نشان دهد [۴].

بنابراین لزوم انجام تحقیقی که بتواند طیف اثرات غلظت های مختلف دیگوگسین را در قلب با نارسایی قلبی نشان دهد می تواند به عنوان یک مدل مناسب از اثرات درمانی و سمی این دارو بکار رود.

در مطالعه Mandel و همکاران، دیگوگسین توانست در یک رابطه وابسته به زمان سبب تغییر پارامترهای الکتریکی قلب از قبیل ERP (زمان تحریک ناپذیری موثر قلبی) و AMP (دامنه نوسانات) شود. بدین صورت که تا زمان ۱۲۰ دقیقه پارامترهای فوق به تدریج طولانی و سپس یک افزایش ناگهانی در زمان ۱۸۰ ثانیه مشاهده شد [۵]. همچنین Dolphen و همکاران نشان داده اند که در قلب جدا شده کوچک هندی تیمار شده با گلیکوزید های دیژیتال (ژیتالوکسین و ژیتوکسین)، تغییرات دوگانه به صورت افزایش کاهش خاصیت اینوتروپیک دیده می شود. دینامیک متفاوت در مهار پمپ $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ به عنوان دلیل این رفتار دوگانه ذکر شده است. علت رفتار دوگانه وجود زیر واحدهای مختلف α در قسمت خارج سلولی پمپ $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ می باشد [۶]. از طرف دیگر در مطالعات بالینی در محدوده غلظت های درمانی دیگوگسین اثرات دوفازی کاملا خلاف یکدیگر در پارامترهای مختلف قلبی عروقی نشان داده شده است [۷]. در این زمینه دیگوگسین می تواند در غلظت های کم به عنوان ضد آریتمی و کاهنده ضربانات بطنی در زمان رخداد تاکی کاردی های فوق بطنی عمل کند در حالی که در غلظت های بالا موجب ریتم های دوتایی و آریتمی های بطنی کشنده می گردد. در توجیه این رفتار دوگانه اثرات مختلف این دارو بر اعصاب

ورید اجوف تحتانی را کلامپ کرده و با برش در آئورت در ۱ تا ۲ میلی متری قلب کانول مخصوص متصل به تیروید اکسیژن دار درون آئورت (دیستال به دریچه آئورت) ثابت شد و سپس قلب را از قفسه سینه خارج کرده و قلب جدا شده در محفظه مرکزی با روش تغذیه کرومر مدل لانگهندروف (Langendorff) ثابت شد. محلول تیروید اکسیژنه شده توسط اکسیژن (۹۵٪) و دی اکسید کربن (۵٪) با درجه حرارت 37 ± 0.1 درجه سانتیگراد و pH معادل 7.4 ± 0.1 بافت را تغذیه می کرد. مواد تشکیل دهنده محلول تیروید بر حسب میلی مولار عبارت بودند از:

NaCl (118), KCl (4.07), CaCl_2 (1.4), MgCl_2 (1.2), NaHCO_3 (25), NaH_2PO_4 (1.2), Dextrose (11.1). ثبت داده ها در این مطالعه به صورت خارج سلولی با استفاده از الکترودهای نقره به صورت تک قطبی انجام شد. با قرار دادن یک الکتروده در دهلیز چپ، یک الکتروده در نوک قلب و دو الکتروده جهت حذف سیگنال های اضافه ثبت سه کاناله (دهلیز، بطن ECG) از قلب صورت گرفت [۹].

جهت بررسی سمیت مزمن دوکسوروبیسین میزان مرگ و میر حیوانات در کل دوره آزمایشات ثبت شد. همچنین حیوانات به صورت هفتگی از نظر وزن، آلپسی، کاشکسی، هپاتومگالی، ادم در ناحیه صفاق و پرده جنب ارزیابی می شدند. برای رتبه بندی شدت سمیت در صورت مشاهده همه علائم درجه شدید، ۷۰٪، علائم درجه متوسط و ۵۰٪ علائم درجه خفیف در نظر گرفته شد.

آریتمی ها شامل ضربانات نابجای بطنی (VEBs)، تکیکاردی

و پارامترهای الکتروکاردیوگرافیک قلبی شامل QRS، QT، QTc، ST، PQ به صورت دیجیتالی و توسط نرم افزار Lab Chart Pro 7 اندازه گیری شد. کلیه اصول اخلاقی مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه علوم پزشکی گلستان رعایت شد.

نارسایی قلبی به وسیله تزریق داخل صفاقی دوکسوروبیسین ساخت کمپانی EBWE Pharma استرالیا با دوز ۵ mg/kg، یکبار در هفته به مدت سه هفته متوالی ایجاد شد. حیوانات به مدت پنج تا شش هفته پس از اولین تزریق تحت نظر بودند. گروه شاهد نیز محلول ایزوتونیک سالین دریافت نمودند. از کلیه حیوانات در شروع آزمایش، هفته دوم پس از شروع و پایان هفته ۶-۵ ثبت نوار قلبی توسط دستگاه پاورلب مدل (ML780) به عمل آمد. نقطه پایانی القا نارسایی قلبی با طولانی شدن پارامترهای الکتروکاردیوگرام، QT، QTc، QRS و افزایش ST-height، آنالیز افزایش پله ای فشار و تغییرات پاتولوژی قلب مشخص گردید [۱، ۲].

پس از اطمینان از ایجاد نارسایی قلبی، اقدامات اولیه آماده سازی جهت جراحی انجام شد و برای حیوان لوله گذاری داخل تراشه با لوله ی مخصوص صورت گرفت. ریه های حیوان در طول زمان جراحی با ونتیلاتوری که به دستگاه اکسیژن ساز متصل بود و اکسیژن ۱۰۰ درصد تولید می کرد، تهویه شد. ۰/۱ واحد هپارین جهت جلوگیری از لخته شدن خون، به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. بعد از باز کردن شکم و برداشتن پرده ی دیافراگم، جدار قفسه ی سینه کنار زده شد. بعد از پریکاردیوتومی و گرفتن ۲ میلی لیتر خون از قلب حیوان،

جدول ۱- نحوه امتیازبندی شدت آریتمی

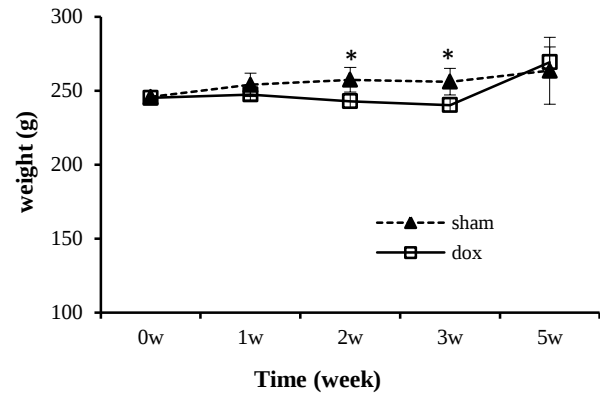
امتیاز	توضیح
۰	۱ تا ۳ مورد PVC
۰/۵	۳ تا ۷ مورد PVC
۱	۷ تا ۱۲ مورد PVC یا وجود Couplet/Bigimime/trigimime/triplet
۲	بیشتر از ۲۰ مورد PVC یا بیشتر از ۳ مورد Couplet/Bigimime/trigimime/triplet
۳	۱-۲ مورد VT یا مدت زمان VT کمتر و یا مساوی ۵ ثانیه
۳/۵	۲-۵ مورد VT یا مدت زمان VT ۵۰-۵۵ ثانیه
۴	۵-۱۰ مورد VT یا مدت زمان VT ۹۵-۵۰ ثانیه
۴/۵	۱۰-۱۵ مورد VT یا مدت زمان VT ۱۳۵-۹۵ ثانیه
۴/۹	۱۵-۱۸ مورد VT یا مدت زمان VT ۱۸۰-۱۳۵ ثانیه
۵	۱۰-۱۵ اپیزود VF یا طول مدت کمتر یا مساوی ۵ دقیقه
۵/۵	۱۵-۲۰ اپیزود VF یا طول مدت بین ۵-۱۵ دقیقه
۶	بیشتر از ۳۰ اپیزود VF یا طول مدت بیشتر از ۱۵ دقیقه

LVDP, LVEDP در افزایش پلکانی فشار با فرمول
Graph pad prism توسط نرم افزار $Y=Y_0 \cdot \exp(k \cdot X)$
انجام شد.

یافته‌ها

در موشهای دچار کاردیومیوپاتی شده توسط دوکسوروبیسین تغییرات معنی دار در پارامترهای الکتروکاردیوگرام و پاتولوژیک مؤید ایجاد کاردیومیوپاتی است. از ۸ موش وارد شده در آزمایش ۲ موش (۳۰٪) از بین رفتند و زودترین مرگ یک روز پس از اولین تزریق دوکسوروبیسین روی داد. بیشتر مرگ و میرها بعد از هفته دوم رخ داد. تجمع مایعات در شکم، فضای پرده جنب و اندام های محیطی، کاشکسی و هپاتومگالی در ۳۰٪ از موشهای دریافت کننده دوکسوروبیسین شدید، در ۶۰٪ موارد علائم به صورت متوسط و در ۱۰ درصد موشها به صورت خفیف مشاهده شد. در گروه دوکسوروبیسین در طی سه هفته اول کاهش وزن و پس از آن افزایش وزن مشاهده شد (هفته ۵) بطوری که بین گروه کنترل و دوکسوروبیسین در هفته دوم و سوم تفاوت معنی داری مشاهده شد (نمودار ۱).

نسبت وزن قلب به وزن بدن در گروه دریافت کننده دوکسوروبیسین بطور فاحشی بیشتر از گروه کنترل بود ($p < 0.05$). میانگین ثبت های الکتروکاردیوگرام در ارتباط با پارامترهای QT, QTc, ST-Height, QRS, T peak T end در هفته های ۰، ۲ و ۵ پس از شروع آزمایشات در جدول ۲ نمایش داده شده است.



نمودار ۱- وزن موش های صحرایی در دو گروه دریافت کننده دوکسوروبیسین و کنترل.
*: اختلاف معنادار بین گروه در هفته های ۲ و ۳ با $p < 0.05$.

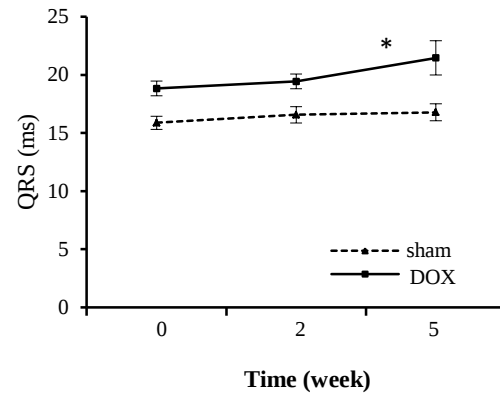
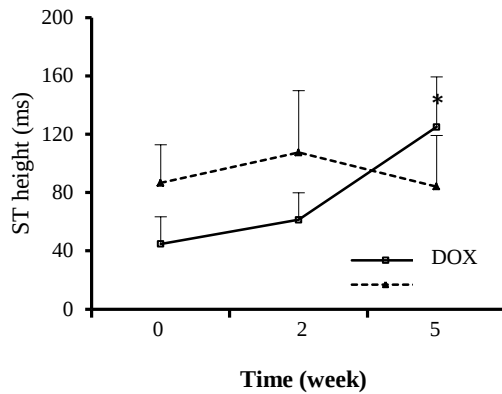
بطنی (VT) و فیبریلاسیون بطنی (VF) در طی ایسکمی و رپرفیوژن مورد بررسی قرار گرفت. در بررسی شدت آریتمی از سیستم امتیاز دهی Lambeth (جدول ۱) استفاده شد [۱۰]. بعد از پایداری شرایط، پرفیوژن قلب به مدت ۱۰ دقیقه بوسیله محلول تیروید انجام شد تا ثبت ها به حالت پایدار برسد. سپس با افزایش پله ای فشار پایان دیاستول، مقدار اختلاف فشار سیستولی و دیاستولی اندازه گیری شد تا نمودار تغییرات فشار در دو گروه جهت بررسی کاردیومیوپاتی در قسمت نتایج رسم گردد. سپس دیگوکسین (تهیه شده از شرکت زهراوی) که در غلظت های مختلف (۸۰-۰/۱ میکرو مولار) در تیروید تهیه شده بود وارد پرفیوژن بافتی شده و ثبت مربوط به کانالهای مختلف توسط نرم افزار Lab Chart انجام شد.

از آزمون های Unpaired t-test و Mann-Whitney u test و نرم افزار Graph pad prism ورژن ۵ برای مقایسه گروه ها استفاده شد. $p < 0.05$ بعنوان ملاک معنی دار بودن تفاوت گروهها در نظر گرفته شد. آنالیز تک توانی شاخص های

جدول ۲- تغییرات الکتروکاردیوگرام در هفته شروع، هفته دوم و هفته پنجم پس از دریافت دوکسوروبیسین

پارامتر	شاهد	۰	۲	۵
QT (میلی ثانیه)	$67/36 \pm 0.02$	$0/06 \pm 0.02$	$0/07 \pm 0.02$	$0/08 \pm 0.02$
QTc (میلی ثانیه)	$0/128 \pm 0.06$	$0/130 \pm 0.04$	$0/15 \pm 0.05$	$0/180 \pm 0.08$
ST height (میلی ثانیه)	$0/057 \pm 0.02$	$0/044 \pm 0.018$	$0/06 \pm 0.010$	$0/125 \pm 0.034$
T peak t end (میلی ثانیه)	$0/037 \pm 0.001$	$0/036 \pm 0.001$	$0/03 \pm 0.001$	$0/050 \pm 0.006$
HR (تعداد در دقیقه)	$216/8 \pm 12/82$	$233/9 \pm 10/01$	$223/2 \pm 8/73$	$200/3 \pm 10/86$
interval QRS (میلی ثانیه)	$0/017 \pm 0.007$	$0/019 \pm 0.006$	$0/01 \pm 0.006$	$0/021 \pm 0.001$

مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نمایش داده شده اند. تعداد نمونه در هر گروه برابر ۶ می باشد. *: $p < 0.05$ در مقایسه با هفته صفر. QT: فاصله ی میان شروع موج QRS و پایان موج T است. QTc: اصلاح شده ی فاصله QT بر اساس ضربان قلبی که بر اساس فرمول بازت گزارش می شود. ST-segment elevation: تغییرات قطعه ی ST در حین سکته قلبی است که در ECG به صورت بالا رفتن از خط ایزوالکتریک قابل ارزیابی است. HR: تعداد ضربانات قلبی در هر دقیقه.



نمودار ۲- مقایسه ST-height و QRS در دو گروه دریافت کننده دوکسوروبیسین و Sham. *: اختلاف معنا دار بین دو گروه در هفته ۵ با $p < 0.05$.

دیگوکسین بطور وابسته به غلظت به صورت دوفازی سبب تغییر ایندکس‌های قلبی می‌شود.

همانطور که در جدول ۳ مشخص است در قلب کاردیومیوپات اثر دیگوکسین در غلظت‌های مختلف به صورت دوفازی است به این معنا که تا غلظت ۵۰ میکرومولار (افزایش غیرمعنی دار ایندکس و در غلظت‌های بیشتر از ۸۰ میکرومولار کاهش معنادار ایندکس‌های قلبی) ظاهر می‌شود.

به دلیل تغییرات ناگهانی و شدید پس از غلظت ۸۰ میکرو مولار اثرات هر ۱۰ دقیقه اندازه گیری شده و به صورت کدهای 80A, 80B, 80C, 80D نشان داده شده است.

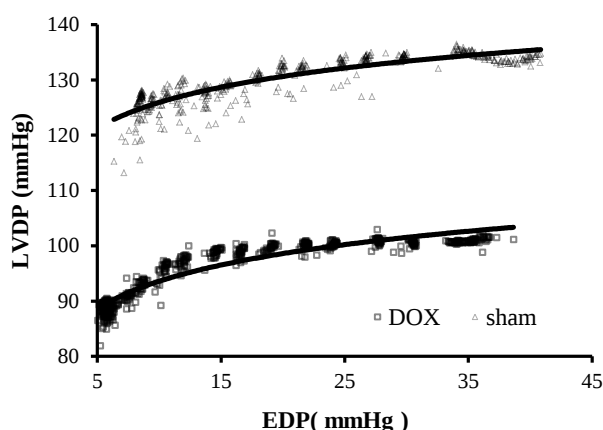
در جدول ۴ غلظت موثر دیگوکسین در دو گروه کاردیومیوپات و شاهد نشان داده شده است. در گروه کاردیومیوپات به دلیل تغییرات دوفازی در متغیرهای قلب

گروه دریافت کننده دوکسوروبیسین و شاهد در پایان هفته ۵ کلیه پارامترها نسبت به هفته اول و نسبت به گروه شاهد به صورت معنی دار افزایش یافت در حالی که ضربانات قلبی کاهش غیر معنی داری را نشان داد.

همچنین پارامترهای ST-Height و QRS interval در گروه کاردیومیوپات افزایش معنی داری یافتند. پارامتر QT نیز در گروه دوکسوروبیسین از ۶۹/۷ در هفته شروع به ۸۸/۰۹ در هفته پنجم افزایش یافت که این مقدار در گروه شاهد از ۶۷/۳۶ در هفته شروع به ۷۳/۴۵ در هفته پنجم متغیر بود و اختلاف معناداری بین دو گروه در هفته پنجم مشاهده شد (نمودار ۲).

در مدل قلب ایزوله لانگهندروف اثرات کاردیوتوکسیسته دوکسوروبیسین در مقایسه با گروه شاهد با استفاده از استرس افزایش تدریجی فشار بر روی پارامترهای اختلاف فشار سیستول و فشار پایان دیاستول به عنوان شاخصی از برون ده قلبی بررسی شد تا صحت کاردیومیوپاتی دوکسوروبیسین به اثبات برسد. همانطور که در نمودار ۳ دیده می‌شود با افزایش فشار پایان دیاستول، فشار پیشرونده بطن چپ به صورت صعودی افزایش می‌یابد که این افزایش در قلب با کاردیومیوپاتی کمتر بوده و در مقایسه با قلب سالم، منحنی قلب کاردیومیوپات به سمت پایین شیفต์ پیدا می‌کند (نمودار ۳).

در ارتباط با پارامترهای همودینامیک قلب دچار نارسایی، پس از پایداری قلب متعاقب مرحله پله ای فشار، دیگوکسین از غلظت ۰/۱ تا ۸۰ میکرومولار وارد پرفیوژن بافتی شد و ثبت‌ها آنالیز شد. مقایسه پارامترهای مختلف قلبی در غلظت‌های مختلف دیگوکسین نشان داد که در قلب دچار کاردیومیوپاتی،



نمودار ۳- مقایسه افزایش پلکانی فشار EDP در مقابل LVDP در نمونه دریافت کننده دوکسوروبیسین (DOX) و نمونه sham. آنالیز ریاضی تک توانی بالارونده در متغیرهای همودینامیک افزایش پلکانی فشار، اختلاف معناداری را در پارامترهای k_{YO} نشان داد که در گروه دریافت کننده دوکسوروبیسین پارامتر k_{YO} کمتر از گروه شاهد می‌باشد.

جدول ۳- تغییرات پارامترهای مکانیکی قلب در غلظت های مختلف دیگوکسین در گروه کاردیومیوپات

RPP (bpm/mmHg)	HR (bpm)	LVDP (mmHg)	Concentration (μM)
20372 ± 2108	195 ± 12.7	100.6 ± 7.249	0.00
20716 ± 2215	196 ± 13.2	103.3 ± 7.466	0.10
20465 ± 2010	198 ± 12.2	101.6 ± 7.106	0.50
19787 ± 2197	190 ± 14.0	101.9 ± 7.045	1.00
19886 ± 1983	188 ± 13.5	103.8 ± 6.189	5.00
19741 ± 1958	187 ± 13.5	103.8 ± 6.100	10.0
20204 ± 1984	197 ± 14.6	101.7 ± 7.223	15.0
20581 ± 2060	197 ± 15.2	104.2 ± 8.350	25.0
19695 ± 2082	186 ± 14.9	107.5 ± 7.620	50.0
17316 ± 1659	164 ± 17.8	106.3 ± 7.275	80A
15269 ± 1679	150 ± 19.2	105.1 ± 8.811	80B
12646 ± 1086*	123 ± 12.2*	107.7 ± 7.193	80C
10400 ± 704.7*	121 ± 15.5*	94.17 ± 9.068	80D

تمامی داده ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش شده اند و تعداد نمونه در گروه ۶ عدد بوده است. *: تفاوت معنی دار با غلظت ۰ با $p < 0.05$

دیگوکسین موجب تغییرات همودینامیک و الکتروفیزیولوژیک و متفاوت با قلب سالم می گردد.

در مطالعه Herman، صرفاً ادم در اطراف شکم، بزرگی کبد و کلیه به عنوان نشانه های بروز نارسایی قلبی گزارش شده است [۱۱]. در حالیکه در مطالعه حاضر علاوه بر علائم تجمع شدید مایعات در شکم (صفاق) و اندام های محیطی (ادم)، کاشکسی، هیپاتومگالی، تجمع مایعات در فضای پرده جنب (در ۳۰٪ از موش های دریافت کننده دوکسوروبیسین بصورت شدید، در ۶۰٪ موش ها علائم متوسط و در ۱۰٪ به صورت خفیف)، پارامترهای الکتروفیزیولوژیک شامل افزایش طول QTc و T peak T end، طولانی شدن موج QRS و بالا رفتن قطعه ST در گروه دریافت کننده دوکسوروبیسین نیز ارائه شده است.

در مطالعه Rossi و همکاران، بیشترین تغییرات ECG ناشی از دوکسوروبیسین پهن شدن QRS و افزایش طول QT گزارش شده و بالا رفتن قطعه ST به عنوان نشانه ای از کاردیو توکسیسیته مزمن ناشی از دوکسوروبیسین در جوندگان تلقی شده است [۱۲].

نشان دهنده کاهش شدید فشار پیشرونده بطن چپ (LVDP) در قلب نارسا نسبت به گروه شاهد بوده و با نتایج

کاردیومیوپات، غلظت موثر ۵۰٪ به صورت جداگانه در فاز ۱ (۰/۱ تا ۸۰ میکرومولار) نیز محاسبه شد.

نمودار ۴ اثرات دیگوکسین بر روی پارامترهای حداکثر فشار پر شدن بطن چپ در سیستول (+dp. dt)، فشار خالی شدن بطن چپ در حین دیاستول (-dp. dt)، افزایش فشار پایه پر شدن و کاهش فشار خالی شدن بطن را نشان می دهد. بطور کلی در گروه قلب نارسا، دیگوکسین در غلظت های بالای ۸۰ میکرومولار در فاز مسمومیت موجب کاهش فشار سیستولی و افزایش فشار دیاستول می گردد.

همانطور که در نمودار ۵ مشاهده می شود در قلب نارسا فشار پایان دیاستول "A" در غلظت های مختلف دیگوکسین تغییرات دوفازی از خود نشان می دهد بطوری که در غلظت بالای ۸۰ میکرومولار در اثر سمیت وابسته به دوز دیگوکسین میزان بروز VT (تاکی کاردی بطنی) "B" نیز افزایش می یابد. با توجه به جدول ۵ غلظت ۸۰ میکرومولار دیگوکسین در قلب نارسا موجب کاهش معنی دار جریان کرونری قلب می شود.

بحث

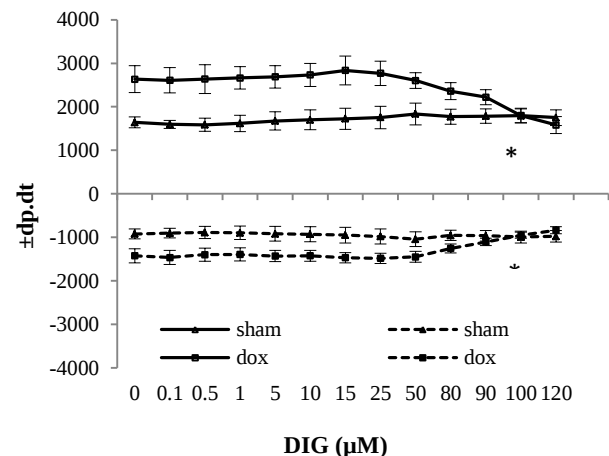
نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که در قلب دچار نارسایی شده توسط دوکسوروبیسین (۱۵ mg/kg طی پنج هفته)

جدول ۴- مقایسه غلظت موثر ۵۰٪ دیگوکسین در دو گروه کاردیومیوپات و شاهد

Digoxin (μM)			متغیرهای همودینامیک
DOX (phase II)	DOX (phase I)	Sham	
$8.7\text{e-}5 \pm 5.0\text{e-}6$	$1.3\text{e-}5 \pm 5.6\text{e-}6^{\#}$	$1.9\text{e-}5 \pm 4.6\text{e-}6$	RPP (bpm/mmHg)
$8.5\text{e-}5 \pm 3.5\text{e-}6$	$6.6\text{e-}6 \pm 4.9\text{e-}6^{\#}$	$1.5\text{e-}5 \pm 6.9\text{e-}6^*$	LVEDP (mmHg)
$7.8\text{e-}6 \pm 4.2\text{e-}6$	$2.2\text{e-}5 \pm 7.4\text{e-}6^{\#}$	$3.7\text{e-}6 \pm 2.0\text{e-}6$	LVDP (mmHg)
$3.1\text{e-}5 \pm 9.8\text{e-}6$	$1.5\text{e-}5 \pm 1.0\text{e-}5^{\#}$	$4.1\text{e-}5 \pm 2.6\text{e-}5$	+dP/dT(mmHg/s)

کلیه داده ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نمایش داده شده‌اند و تعداد نمونه در هر گروه برابر ۶ عدد بوده است. *: تفاوت معنادار نسبت به گروه دوکسوروبیسین (DOX) در فاز ۱ (تا ۸۰ میکرومولار) با $p < 0.05$. #: تفاوت معنادار نسبت به گروه دوکسوروبیسین (DOX) با $p < 0.05$.

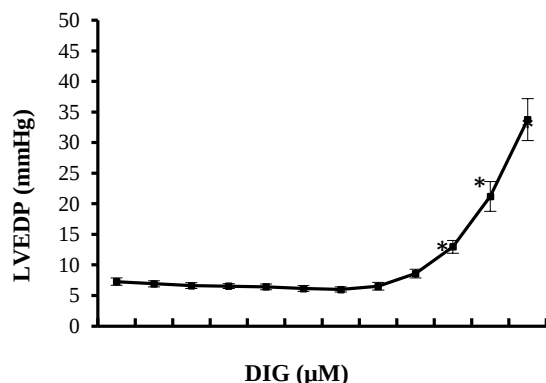
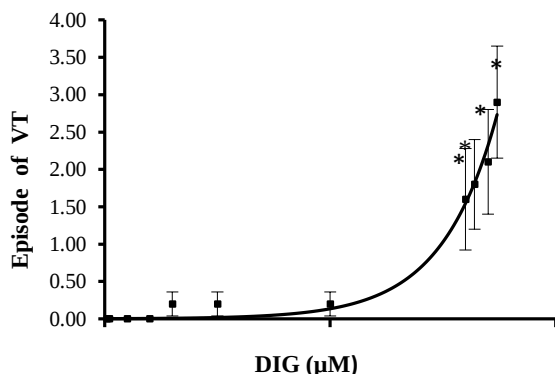
در غلظت های بالاتر از ۸۰ میکرومولار دیگوکسین (فاز ۲) سمیت قلبی به صورت افزایش شدید فشار پایان دیاستول و کاهش شدید فشار پرشدن بطن چپ ظاهر می شود. جهت آنالیز فاز ۲ ابتدا درصد (وقوع) این پدیده بررسی شد که نتایج بیانگر وقوع کامل این پدیده در تمامی نمونه های دارو بوده است. این یافته ها مؤید آن است که این اثر سمی یک جز غیر قابل تفکیک از اثرات گلیکوزیدهای قلبی می باشد. این یافته

DIG (μM)

نمودار ۴- میانگین حداقل فشار پرشدن بطن چپ در حین سیستول و حداکثر فشار خالی شدن بطن چپ در حین دیاستول در قلب موش صحرایی. dox: دوکسوروبیسین. *: اختلاف معنادار نسبت به غلظت اولیه با $p < 0.05$.

مطالعات قبل هماهنگی داشت که بیانگر صحت و اعتبار مدل مطالعه حاضر است [۱۳].

نتایج این مطالعه نشان داد که دیگوکسین در یک مدل وابسته به غلظت به صورت دوفازی سبب تغییر ایندکس های قلبی می شود. در فاز ۱ افزایش وابسته به غلظت پارامترهای اینوتروپ و در فاز ۲ کاهش وابسته به غلظت LVDP عمدتاً به دلیل بالا رفتن فشار پایان دیاستولی (LVEDP) و به صورت همزمان کاهش فشار سیستولی رخ می دهد. مطالعات نشان داده است کاهش شدید LVDP می تواند به علت ایسکمی بافتی همزمان با کاهش خاصیت انعطاف پذیری بطنی و به علت افزایش غلظت Ca^{+2} داخل سلولی ایجاد شود. در مطالعه ای دیگر، نشان داده شد که ۳۰ دقیقه ایسکمی بافتی در قلب به دلیل افزایش Ca^{+2} داخل سلولی (که منجر به استرس اکسیداتیو می شود) موجب کاهش در میزان LVDP و افزایش LVEDP می شود [۱۴، ۱۵]. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که



نمودار ۵- بررسی ارتباط بین میزان بروز تاکی کاردی بطنی و افزایش فشار پایان دیاستولی در سمیت وابسته به غلظت دیگوکسین در قلب کاردیومیوپات. *: اختلاف معنادار نسبت به غلظت اولیه با $p < 0.05$.

جدول ۵- جریان کرونری قلب قبل و بعد از تجویز دیگوکسین در دو قلب نارسا و سالم

Coronary flow (ml/min)		
DOX	Sham	Group
9.64 ± 0.69	13.33 ± 0.88	Before DIGOXIN
7.71 ± 0.56*	13.17 ± 0.83	After DIGOXIN

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده اند. داده‌ها به صورت DOX: دوکسوروبیسین. *: تفاوت معنی دار با گروه قبل از تجویز دیگوکسین با $p < 0.05$

در تایید مطالعات قبلی در نمونه های آزمایشگاهی قلب خارج از بدن، مبنی بر افزایش شدید ERP (زمان تحریک ناپذیری موثر قلبی)، کاهش AMP (دامنه نوسانات به میلی ولت)، کاهش شدید پتانسیل عمل و افزایش فاز ۴ پتانسیل عمل می باشد [۵، ۱۴].

همچنین در مطالعه‌ای که توسط Kassebaum و Rosen بر اثرات استروفانتین (یکی دیگر از گلیکوزیدهای قلبی) بر روی قلب جدا شده انجام شد اثرات biphasic (دو بخشی) این گلیکوزید قلبی بر خواص مکانیکی قلبی مشاهده گردید که مقاومت غشایی در ابتدا افزایش (کاهش نفوذپذیری پتاسیم) و سپس کاهش (افزایش نفوذپذیری پتاسیم) می یابد بطوری که این تغییرات در نفوذپذیری موجب وقفه ابتدایی و سپس تسریع در رپولاریزاسیون می شود که در نتیجه آن پتانسیل عمل در ابتدا طولانی و سپس کاهش می یابد [۱۶، ۱۷]. علاوه بر این تاثیرات الکتروفیزیولوژیک دیژیتوکسین بر رپولاریزاسیون پتانسیل عمل رفتار دوگانه مشابهی را نشان می دهد، بدین صورت که در سلول‌های جنینی قلب جوجه دیژیتوکسین در ابتدا موجب طولانی شدن و سپس سبب سرعت گرفتن رپولاریزاسیون و کاهش دامنه پتانسیل عمل می شود در صورتی که بر پتانسیل استراحت هیچ تاثیری ندارد [۱۸]. بنابراین به صورت کلی می توان گفت که دیگوکسین با مکانیسم های مختلف رفتار دو فازی به صورت افزایش و کاهش برون ده قلبی در غلظت های مختلف نشان می دهد که این اثرات تا حدودی با اثرات بالینی دیگوکسین مطابقت دارد.

مطالعات نشان می دهد که گلیکوزیدهای قلبی در غلظت های بالا اثرات سمی خود را به صورت کاهش طول دوره پتانسیل عمل و بدنبال آن کاهش فشار سیستولی نشان می دهند [۱۷]. غلظت های سمی گلیکوزیدهای قلبی موجب

تجمع Na^+ و Ca^{+2} داخل سلولی و بدنبال آن افزایش نوسانات داخل سلولی می شود [۱۹]. مطالعه ما نشان داد که دیگوکسین می تواند سبب کاهش جریان کرونر در غلظت های سمی شود. مطالعات بالینی نشان داده است که دیگوکسین در دوز سمی می تواند با مکانیسم های مختلفی از قبیل افزایش حساسیت به اپی نفرین، افزایش کلسیم داخل سلولی و دپلاریزاسیون خارج سلولی سبب انقباض عروق و افزایش فشار خون شود [۲۰]. این یافته ها می تواند در تایید نتایج مطالعه حاضر می باشد. همچنین دیگوکسین در غلظتهای بالای ۸۰ میکرومولار عمدتاً تاکیکاردی بطنی (VT) ایجاد می کند. در ارتباط با علت آریتمی های ایجاد شده می توان به افزایش شدید فشار پایان دیاستول و در نتیجه ایسکمی میوکارد در نتیجه افزایش Ca^{+2} داخل سلولی اشاره کرد. در صورتی که این حدس صحیح باشد باید منحنی افزایش فشار پایان دیاستول با الگوی ایجاد آریتمی های بطنی دیگوکسین هم پوشانی داشته باشد. بنابراین می توان این احتمال را مطرح کرد که مکانیسم وقوع این آریتمی با مکانیسم افزایش فشار پایان دیاستولی دیگوکسین منشا یکسانی دارند.

محدوده غلظت سمی دیگوکسین در مطالعات بالینی ۱/۳-۱/۶ ng/ml می باشد به حداکثر غلظت به کاررفته در آزمایش حاضر بسیار بالاتر از میزان فوق می باشد. این محدوده غلظت مشابه غلظت های به کار رفته در مطالعات Mohammadi و همکاران است [۴]. این در حالی است که در مطالعات دیگر محدوده های پایین تر غلظتی از دیگوکسین استفاده شده است [۵]. علت این اختلاف را می توان به علت وجود فاکتورهایی از قبیل هایپوکالمی و نوسانات سیستم اتونوم در نمونه های *in vivo* و همچنین تغییر گونه های حیوانات نسبت داد. همچنین در بسیاری از مطالعات به جای استفاده از قلب کامل از گستره بطنی در نمونه های بدون نارسایی قلبی استفاده شده است. در هر حال این اختلاف غلظتی می تواند به عنوان یکی از محدودیت های تحقیق حاضر در نظر گرفته شود و جهت روشن شدن علت اصلی این اختلافات می توان مطالعات دیگری را با استفاده از سایر نمونه های حیوانی و به صورت *in vivo* طراحی کرد.

از طرفی کاربرد جدید دیگوکسین در درمان سرطان می باشد. در مطالعه حاضر نیز اثرات دیگوکسین در ادامه تزریق مزمن داروی ضدسرطان دوکسوروبیسین انجام شده است.

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

سهم نویسندگان

م.ا: انجام مطالعه و نگارش مقاله؛ و.خ: ایده، طراحی، و نظارت بر حسن اجرای مطالعه؛ س.ح.ه: انجام مطالعه و نگارش مقاله؛ م.پ: انجام مطالعه؛ م.ر: مشاوره.

اصطلاحات

ST-segment elevation: تغییرات قطعه‌ی ST در حین سکته قلبی است که در ECG به صورت بالا رفتن از خط ایزو الکتریک قابل ارزیابی است.

QT: فاصله‌ی میان شروع موج QRS و پایان موج T است. QT_C: اصلاح شده‌ی فاصله QT بر اساس ضربان قلبی که بر اساس فرمول بازت گزارش می‌شود.

فشار پایان دیاستولی: LVEDP (EDP)

فشار پایان سیستولی: LVSB

تعداد ضربانات قلبی در هر دقیقه: HR

$LVDP \times HR = RPP$

$+dp.dt$: حداکثر فشار پرشدن بطن چپ هنگام سیستول (شیب صعودی منحنی فشار)

$-dp.dt$: حداکثر فشار خالی شدن بطن در هنگام دیاستول (شیب نزولی منحنی فشار)

VT = Ventricular Tachycardia

ERP = Effective Refractory Period

AMP = Amplitude (mv)

فهرست منابع

- [1] Schoner W, Scheiner-Bobis G, Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth. *Am J Physiol Cell Physiol* 293 (2007) C509-C536.
- [2] Kepp O, Menger L, Vacchelli E, Adjemian S, Martins I, Ma Y, Sukkurwala AQ, Michaud M, Galluzzi L, Zitvogel L, Kroemer G, Anticancer activity of cardiac glycosides: At the frontier between cell-autonomous and immunological effects. *Oncoimmunology* 1 (2012) 1640-1642.
- [3] Rathore SS, Curtis JP, Wang Y, Bristow MR, Krumholz HM, Association of serum digoxin concentration and outcomes in patients with heart failure. *JAMA* 19 (2003) 871-878.

مشخص شده است که اثرات سمی دیگوکسین در قلب نارسا شده بوسیله دوکسوروبیسین بروز می‌کند در حالی که در قلب های گروه شاهد سمیت شاخص های مطرح شده درسمیت دیگوکسین تغییر معناداری نداشته است. بنابراین نتایج حاضر نقش دیگوکسین را به عنوان داروی موثر در از بین بردن سلول های سرطانی به همراه دوکسوروبیسین مطرح می‌کند. پیشنهاد می‌شود که اثرات ترکیبی دو داروی دوکسوروبیسین و دیگوکسین بر سلول های سرطانی مطالعه شود.

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که دیگوکسین اثرات سمی دوکسوروبیسین بر قلب موش را تشدید می‌کند. جهت مشخص شدن بیشتر مکانیسم این اثرات انجام مطالعات مولکولی لازم است.

سپاسگزاری

این مقاله منتج از بخشی از پایان نامه دوره دکتری داروسازی می‌باشد. از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی گلستان و مازندران جهت تصویب و در اختیار گذاشتن اعتبار جهت انجام طرح تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض در منافع

- [4] Mohammadi K, Liu L, Tian J, Kometiani P, Xie Z, Askari A, Positive inotropic effect of ouabain on isolated heart is accompanied by activation of signal pathways that link Na⁺/K⁺-ATPase to ERK1/2. *J Cardiovasc Pharmacol* 41 (2003) 609-614.
- [5] Mandel WJ, Bigger JT Jr, Butler VP Jr, The electrophysiologic effects of low and high digoxin concentrations on isolated mammalian cardiac tissue: reversal by digoxin-specific antibody. *J Clin Invest* 51 (1972) 1378-1387.
- [6] Dolphen R, Lesne M, Uptake and pharmacological effect of gitoxin and gitaloxin in rat and guinea-pig perfused hearts. Comparison with digitoxin and digoxin. *Arzneimittel-Forschung* 30 (1980) 614-618.
- [7] Adams KF Jr, Patterson JH, Gattis WA, O'Connor CM, Lee CR, Schwartz TA, Gheorghiadu M, Relationship of serum digoxin concentration to mortality and

- morbidity in women in the digitalis investigation group trial: a retrospective analysis. *J Am Coll Cardiol* 46 (2005) 497-504.
- [8] Slatton ML, Irani WN, Hall SA, Marcoux LG, Page RL, Grayburn PA, Eichhorn EJ, Does digoxin provide additional hemodynamic and autonomic benefit at higher doses in patients with mild to moderate heart failure and normal sinus rhythm? *J Am Coll Cardiol* 29 (1997) 1206-1213.
- [9] Abud EM, Maylor J, Undem C, Punjabi A, Zaiman AL, Myers AC, Sylvester JT, Semenza GL, Shimoda LA, Digoxin inhibits development of hypoxic pulmonary hypertension in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 109 (2012) 1239-1244.
- [10] Walker MJ, Curtis MJ, Hearse DJ, Campbell RW, Janse MJ, Yellon DM, Cobbe SM, Coker SJ, Harness JB, Gharron DW, Higgins AJ, Julian DG, Lab MJ, Manning AS, Northover BJ, Parratt JR, Riemersma RA, Riva E, Russell DC, Sheridan DJ, Winslow E, Woodward B, The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia, infarction, and reperfusion. *Cardiovasc Res* 22 (1988) 447-455.
- [11] Herman EH, Ferrans VJ, Young RS, Hamlin RL, Effect of pretreatment with ICRF-187 on the total cumulative dose of doxorubicin tolerated by beagle dogs. *Cancer Res* 48 (1988) 6918-6925.
- [12] Rossi F, Filippelli W, Russo S, Filippelli A, Berrino L, Cardiotoxicity of doxorubicin: effects of drugs inhibiting the release of vasoactive substances. *Pharmacol Toxicol* 75 (1994) 99-107.
- [13] Piuholo J, Szokodi I, Kinnunen P, Ilves M, Vuolteenaho O, Ruskoaho H, Endothelin-1 contributes to the Frank-Starling response in hypertrophic rat hearts. *Hypertension* 41 (2003) 93-98.
- [14] Khatter JC, Agbanyo M, Navaratnam S, Nero B, Hoeschen RJ, Digitalis cardiotoxicity: cellular calcium overload a possible mechanism. *Basic Res Cardiol* 84(1989) 553-563.
- [15] Makazan Z, Saini HK, Dhalla NS, Role of oxidative stress in alterations of mitochondrial function in ischemic-reperfused hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292 (2007) H1986-H1994.
- [16] Rosen MR, Gelband H, Merker C, Hoffman BF, Mechanisms of digitalis toxicity. Effects of ouabain on phase four of canine Purkinje fiber transmembrane potentials. *Circulation* (1973) 681-689.
- [17] Kassebaum DG, Electrophysiological effects of strophanthin in the heart. *J Pharmacol Exp Ther* 140 (1963) 329-338.
- [18] Rosen MR, Cellular electrophysiology of digitalis toxicity. *J Am Coll Cardiol* 5 (1985) 22A-34A.
- [19] Kass RS, Lederer WJ, Tsien RW, Weingart R, Role of calcium ions in transient inward currents and after contractions induced by strophanthidin in cardiac Purkinje fibres. *J Physiol* 281(1978) 187-208.
- [20] Hauptman PJ, Kelly RA, Digitalis. *Circulation* 99 (1999) 1265-1270.

Research paper

Biphasic-toxic effects of digoxin on doxorubicin cardiomyopathy in rats: Potential role as an indicator of acute cardiotoxicity

Mohammad Azadbakht¹, Vahid Khoori^{2*}, Seyedeh Hadiseh Hashemian³, Mona Pourabouk², Maryam Rajaei²

1. Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

2. Ischemic Disorders Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

3. School of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

Received: 1 June 2015

Accepted: 30 August 2015

Abstract

Background and aim: In this study, effects of digoxin on the cardiac electrophysiology and mechanical properties were examined in a rat model of heart failure induced by doxorubicin.

Methods: In order to induce heart failure, doxorubicin 5 mg/kg was injected to rat, i.p., once per week for 3 weeks. Heart failure was confirmed after 5 weeks, by measuring electrical, mechanical and histological changes in 12 isolated hearts. Isolated Langendorff perfused hearts were then treated with digoxin (0.1-80 μ M) during a 60 min period and functional outcomes were assessed.

Results: Effect of digoxin on the heart was biphasic. In concentrations below 80 μ M (the first phase) digoxin significantly increased LVDP (left ventricular diastolic pressure) and RPP (heart rate $\times$ LVDP). LVDP and RPP were also increased at the concentrations higher than 80 μ M (the second phase). However, coronary flow, heart rate, left ventricular developed pressure and cardiac output were significantly decreased in the second phase.

Conclusion: Effects of digoxin on doxorubicin cardiomyopathy are biphasic. Electrical and functional changes in the second phase can be considered as an indicator of digoxin cardiotoxicity.

Keywords: Biphasic effects, Cardiomyopathy, Digoxin, Doxorubicin, Isolated heart, Langendorff

Please cite this article as follows:

Azadbakht M, Khoori V, Hashemian SH, Pourabouk M, Rajaei M, Biphasic-toxic effects of digoxin on doxorubicin cardiomyopathy in rats: Potential role as an indicator of acute cardiotoxicity. *Iran J Physiol Pharmacol* 1 (2017) 98-108.

*Corresponding author e-mail: vaph99@yahoo.com

Available online at: <http://ijpp.phypha.ir>

E-mail: ijpp@phypha.ir