

Examining Effects of Metformin and Coenzyme Q10 on Doxorubicin-Induced Oxidative Hepatotoxicity in Rats

Mohammad Bahrani¹,
 Pouria Sobhi¹,
 Faraz Mahdizadeh²,
 Shiva Rahimi³,
 Lida Khodaei⁴,
 Masoud Ojarudi⁵,
 Aliakbar Fazaeli⁶,
 Ramin Salimnejad⁷,
 Lotfollah Rezagholizadeh⁶

¹ BSc Student in Laboratory Sciences, Students Research Committee, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

² Medical Student, Students Research Committee, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

³ MSc Student in Biochemistry, Department of Biochemistry, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

⁴ BSc in Laboratory Sciences, Imam Khomeini Hospital, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

⁵ PhD Student in Biochemistry, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

⁶ Assistant Professor, Department of Biochemistry, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

⁷ Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

(Received February 4, 2024; Accepted April 20, 2024)

Abstract

Background and purpose: Cancer is considered one of the most common causes of mortality, in today's world. A growing body of evidence has demonstrated that the global cancer burden is expected to rise significantly in the years to come. Cancer is characterized by the uncontrollable rate of cells growth, ultimately proving fatal if not treated. Both genetic and environmental contributing factors have proven critical in developing differential cancers. Chemotherapy is the most common form of treatment used for cancers all around the world. Despite a high efficiency in treating malignancies, toxicity and targeting of normal healthy tissues are considered the most common side effects of chemotherapeutic agents. Thus, reducing the aforementioned side effects with complementary treatments can prove critical through maximizing therapeutic efficiency while also minimizing unwanted side effects at the same time. Doxorubicin (DOX) is a common chemotherapy drug that, has limitations on its use due to severe side effects such as hepatotoxicity, nephrotoxicity, as well as cardiotoxicity. Metformin is one of the most common drugs originally used for the treatment of type II diabetes. Additionally, coenzyme Q10 is naturally produced by the body and can also be obtained from diet and supplements. Both metformin and coenzyme Q10 have demonstrated protective effects against toxicity and oxidative stress and are attractive candidates for the treatment of diseases with the basis of inflammation and oxidative stress as demonstrated by various studies investigating the effect of metformin as well as coenzyme Q10 against toxicities. This study investigates the protective effects of metformin and coenzyme Q10 alone and in combination against doxorubicin-induced oxidative damage in rats.

Materials and methods: In this experiment, 36 male Wistar rats were divided into six groups (n=6). The groups consisted of a normal control group (distilled water), metformin and coenzyme Q10 control group: (metformin+coenzyme Q10), doxorubicin control group (doxorubicin), Metformin pre-treatment group (metformin+doxorubicin), coenzyme Q10 pre-treatment group (coenzyme Q10+doxorubicin), as well as metformin and coenzyme Q10 pre-treatment group (metformin + coenzyme Q10+doxorubicin). Metformin (200 mg/kg) and coenzyme Q10 (15 mg/kg) were administered orally daily for one week, and doxorubicin (25 mg/kg), was injected on the eighth day. 24 hours after the last injection, blood and liver tissue samples were collected to analyze liver enzymes (i.e. ALT, AST, ALP), oxidative stress parameters (i.e. malondialdehyde, total antioxidant capacity, catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase), and histological changes.

Results: The results showed that doxorubicin significantly elevates the activity of liver enzymes, concentration of malondialdehyde, and tissue damage and decreases total antioxidant capacity, catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activity ($P<0.001$). Treatment with metformin, coenzyme Q10, and their combination significantly reduced liver enzymes' activity, improved antioxidant parameters, and significantly contributed to histomorphological amelioration compared to the doxorubicin control group.

Conclusion: These findings showed that metformin and coenzyme Q10, alone or in combination, can significantly reduce and protect against the liver complications of doxorubicin injection in rats. This effect is likely, through mitigating oxidative stress and bolstering antioxidant defense mechanisms.

Keywords: doxorubicin, liver damage, oxidative stress, metformin, coenzyme Q10

J Mazandaran Univ Med Sci 2024; 34 (233): 1-14 (Persian).

Corresponding Author: Lotfollah Rezagholizadeh- School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran. (E-mail: Reza34055@gmail.com)

بررسی اثرات متفورمین و کوآنزیم Q10 بر آسیب اکسیداتیو کبدی ناشی از دوکسوروبیسین در موش صحرایی نر

محمد بهرامی^۱
پوریا صبحی^۱
فرزاد مهدی زاده^۲
شیوا رحیمی^۳
لیدا خدائی^۴
مسعود اجارودی^۵
علی اکبر فضایی^۶
رامین سلیم نژاد^۷
لطف اله رضاقلی زاده^۶

چکیده

سابقه و هدف: امروزه سرطان یکی از شایع ترین علت مرگ و میر در جهان محسوب می شود. شواهد در حال رشد نشان می دهند که شیوع بدخیمی ها در سال های پیش رو به طور قابل توجهی افزایش خواهد یافت. مشخصه سرطان، سرعت رشد غیر قابل کنترل سلول ها می باشد، که در صورت عدم درمان مرگبار است. عوامل دخیل ژنتیکی و محیطی در ابتلا به انواع سرطان ها نقش مهمی را ایفا می کنند. شیمی درمانی رایج ترین نوع درمان برای انواع سرطان ها در کل دنیا محسوب می شود. با وجود فواید زیاد در درمان بدخیمی ها، سمیت و هدف قرار دادن بافت های طبیعی و سالم به عنوان شایع ترین عوارض جانبی داروهای شیمی درمانی در نظر گرفته می شوند. بنابراین، کاهش عوارض جانبی با ترکیبات مکمل، می تواند از طریق به حداقل رساندن بازده درمانی و همزمان، به حداقل رساندن عوارض جانبی ناخواسته، بسیار حیاتی باشد. دوکسوروبیسین (DOX) یک داروی شیمی درمانی رایج در درمان سرطان می باشد که به خاطر عوارض جانبی شدیدی مانند سمیت کبدی، کلیوی و قلبی محدودیت استفاده دارد. متفورمین یکی از داروهای رایج مورد استفاده که در اصل برای درمان دیابت تیپ دو می باشد. علاوه بر این، کوآنزیم Q10 یک آنتی اکسیدان است که به صورت طبیعی توسط بدن ساخته می شود و همچنین می تواند از طریق رژیم غذایی و مکمل ها به دست آید. در مطالعات قبلی، هر دو داروی متفورمین و کوآنزیم Q10 اثرات محافظتی علیه سمیت و استرس اکسیداتیو نشان داده و به عنوان کاندیدهای جذاب در درمان بیماری های با مبنای استرس اکسیداتیو و التهاب در نظر گرفته می شوند. هدف از این مطالعه، بررسی اثرات متفورمین و کوآنزیم Q10 به تنهایی و همچنین به صورت ترکیب و تجویز توأم، در کاهش آسیب های اکسیداتیو ناشی از داروی شیمی درمانی دوکسوروبیسین در موش های صحرایی می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، ۳۶ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به ۶ گروه تقسیم شدند. گروه ها شامل کنترل نرمال (آب مقطر)، گروه کنترل متفورمین و کوآنزیم Q10 (متفورمین + کوآنزیم Q10)، گروه کنترل دوکسوروبیسین (دوکسوروبیسین)، گروه پیش درمان متفورمین (متفورمین + دوکسوروبیسین)، گروه پیش درمان کوآنزیم Q10 (کوآنزیم Q10 + دوکسوروبیسین) و گروه پیش درمان متفورمین و کوآنزیم Q10 (متفورمین + کوآنزیم Q10 + دوکسوروبیسین) بودند. متفورمین (۲۰۰ mg/kg) و کوآنزیم Q10 (۱۵ mg/kg) روزانه به مدت یک هفته به صورت خوراکی تجویز شد و دوکسوروبیسین (۲۵ mg/kg) در روز هشتم، تزریق گردید. ۲۴ ساعت بعد از آخرین تزریق، نمونه خون و بافت کبد به منظور بررسی آنزیم های کبدی (ALT، AST، ALP)، پارامترهای استرس اکسیداتیو (مالون دی آلدئید، ظرفیت آنتی اکسیدانی تام، کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز) و تغییرات بافتی برداشته شد.

یافته ها: نتایج نشان داد که دوکسوروبیسین به طور معناداری، فعالیت آنزیم های کبدی، غلظت مالون دی آلدئید و آسیب بافتی را افزایش داده و ظرفیت آنتی اکسیدانی تام، کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز را کاهش می دهد ($P < 0.001$). درمان با متفورمین، کوآنزیم Q10 و ترکیب آن ها، فعالیت آنزیم های کبدی را کاهش داده، میزان فعالیت پارامترهای آنتی اکسیدانی را در مقایسه با گروه کنترل آسیب، به طور معنی داری افزایش داده و موجب بهبود هیستومورفولوژی بافت کبد شد.

استنتاج: این یافته ها نشان داد که متفورمین و کوآنزیم Q10 به تنهایی و در ترکیب با همدیگر می توانند عوارض کبدی تزریق دوکسوروبیسین را در موش ها به طور قابل ملاحظه ای کاهش داده و خواص محافظت کنندگی علیه آن داشته باشند. این تأثیر احتمالا از طریق کاهش آسیب های اکسیداتیو و افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی و ظرفیت آنتی اکسیدان های تام اعمال می شود.

واژه های کلیدی: دوکسوروبیسین، آسیب کبدی، آسیب اکسیداتیو، متفورمین، کوآنزیم Q10

E-mail: Reza34055@gmail.com

مؤلف مسئول: لطف اله رضاقلی زاده - اردبیل: انتهای خیابان دانشگاه، بالاتر از فلکه دانشگاه، دانشکده پزشکی و پیراپزشکی

۱. دانشجوی کارشناسی علوم آزمایشگاهی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

۲. دانشجوی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

۳. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

۴. کارشناسی علوم آزمایشگاهی، بیمارستان امام خمینی (ره)، دانشکده علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

۵. دانشجوی دکتری بیوشیمی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

۶. استادیار، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

۷. استادیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

✉ تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۱۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۲/۱۱/۲۱ تاریخ تصویب: ۱۴۰۳/۲/۱

مقدمه

از جمله بیماری‌های شایع در جوامع، انواع مختلف سرطان‌ها می‌باشند. سرطان ناشی از تجمع جهش‌هایی است که سبب افزایش تکثیر سلول‌ها همراه با رفتارهای تهاجمی فزاینده می‌باشند. بیش‌تر جهش‌های مربوط به سرطان از نوع سوماتیک هستند و این جهش‌ها فقط در سلول‌هایی که سرطانی شده‌اند، وجود دارند (۱). طبق پیش‌بینی‌های صورت گرفته، تعداد موارد جدید مبتلا به سرطان در کل جهان، تا سال ۲۰۷۰ میلادی به ۳۴ میلیون نفر خواهد رسید (۲). مطالعات نشان داده‌اند که از هر ۵ نفر، یک نفر در زندگی دچار سرطان شده و از هر ۱۰ نفر مبتلا به سرطان، یک نفر بر اثر این بیماری جان خود را از دست می‌دهد (۳). درمان این بیماری، مستلزم هزینه‌های قابل توجه از سوی سیستم مراقبت‌های بهداشتی و درمانی جامعه است (۴).

طی چند دهه اخیر، شیمی درمانی به‌عنوان یکی از رایج‌ترین روش‌های درمان سرطان، بخش وسیعی از مداخلات درمانی را به خود اختصاص داده است. اما اثرات جانبی داروهای مورد استفاده در این روش، موفقیت درمان و کاربرد بالینی آن را محدود ساخته است (۵). یکی از داروهایی که بیش‌تر در شیمی درمانی استفاده می‌شود، آنتراسایکلین بسیار مؤثری به نام دوکسوروبیسین (Doxorubicin: DOX) با نام تجاری آدریامایسین است که در درمان بسیاری از تومورهای بدخیم مورد استفاده واقع می‌شود (۶). DOX طیف گسترده‌ای از فعالیت ضد تومور را نشان می‌دهد. هنگامی که این دارو از طریق شریان کبدی تجویز شد، اثرات ضد توموری و پاسخ نسبی در بیماران کارسینوم هپاتوسلولار (HCC) نشان داد. DOX ممکن است تحت یک آبشار واکنشی، فرآیندهای رادیکال آزاد در سلول‌های طبیعی و سرطانی را از سر گیرد. به‌طور معمول، این فرایندها شامل برهمکنش مولکول با زنجیره انتقال الکترون سلول، به ویژه سیتوکروم P450 ردوکتاز است. رادیکال‌های سمی داخل سلولی می‌توانند بیش‌تر به پراکسید هیدروژن و

رادیکال‌های هیدروکسیل تبدیل شوند که می‌توانند مستقیماً به DNA، RNA، لیپیدها و پروتئین‌ها آسیب بزنند (۷، ۸).

دوکسوروبیسین با کاهش آنتی‌اکسیدان‌ها و القای آپوپتوز منجر به سمیت کبدی می‌شود. بنابراین در مراحل درمانی، علم پزشکی را با مشکلات زیادی مواجه نموده است (۹). نتایج مطالعات مختلف، حاکی از اثرات سمی DOX بر روی بافت‌های غیرهدف نظیر قلب، کبد، عضلات اسکلتی، ریه‌ها، مغز، کلیه، سلول‌های خونی و بیضه‌ها است. در حقیقت DOX همانند یک شمشیر دو لبه عمل می‌کند که نه تنها سلول‌های سرطانی، بلکه سلول‌های دیگر را هدف قرار می‌دهد و به آن‌ها آسیب می‌رساند (۱۰-۱۲). سازوکارهای متعددی برای سمیت کبدی ناشی از درمان به وسیله DOX بیان شده است که از جمله آن می‌توان به آسیب کبدی ناشی از تولید گونه‌های اکسیژنی فعال (ROS)، پراکسیداسیون لیپید، آسیب میتوکندری و سمیت سلولی، اشاره کرد (۱۳، ۱۴).

بنابراین داروی DOX با مکانیسم‌های مختلفی از قبیل تولید ROS و فعال‌سازی مسیرهای آپوپتوزی موجب از هم گسیختگی DNA در سلول‌های سرطانی می‌شود. اما از طرفی، در بافت کبد سبب اختلال در آنزیم‌های کبدی، تغییرات بافتی و افزایش ROS و فعال‌سازی پروتئین‌های آغازگر آپوپتوز مانند BAX و کاهش BCL-2 و پیرو آن باعث سمیت بافت کبد می‌شود (۱۵). هرگونه اختلال در روند آپوپتوز، سبب کاهش یا افزایش نا متعارف مرگ سلولی و در نهایت بیماری می‌گردد (۱۶). در نتیجه، مطالعات زیادی در مورد عوامل درمانی بالقوه‌ای که از سمیت کبدی DOX جلوگیری می‌کنند یا آن را کاهش می‌دهند، مورد نیاز است. متفورمین از جمله داروهای مهم و پرمصرف در درمان بیماران دیابتی است (۱۷). متفورمین برای کاهش سطح گلوکز خون استفاده شده و هم‌چنین در تعدادی از مطالعات نیز گزارش شده است که می‌تواند به‌عنوان دارویی با اثر محافظتی در مقابل شیمی درمانی (و اثرات

ناخواسته آن) عمل کند (۱۸). داروی متفورمین می‌تواند به‌عنوان یک مداخله دارویی بالقوه از طریق کاهش آسیب اکسیداتیو، التهاب و آپوپتوز قلبی برای کاهش سمیت قلبی ناشی از درمان با DOX باشد (۱۹).

در مطالعه‌ای که توسط Yueqi Zhang و همکاران صورت گرفته است، به بررسی اثر متفورمین بر جلوگیری از آسیب‌های کبدی منجر شونده به کارسینوما پرداخته شده است؛ نشان داده شد که متفورمین به‌طور متناوب گلوکونوژنز را با تنظیم وضعیت ردوکس (اکسایش-کاهش) هپاتوسیت تنظیم می‌کند، به علاوه، باعث کاهش (احیا) بیش‌تر سیتوزول می‌شود. تغییر حالت ردوکس هپاتوسیت توسط متفورمین ممکن است استرس اکسیداتیو را کاهش دهد و از پیشرفت سرطان کبد جلوگیری کند. هم‌چنین متفورمین آپوپتوز ناشی از استرس اکسیداتیو را در سلول‌های کبدی موش‌های صحرایی مهار می‌کند (۲۰). کوآنزیم Q10 نیز به‌عنوان یک آنتی اکسیدان قوی محسوب می‌شود که به‌صورت مکمل غذایی برای بیماران سرطانی تحت شیمی درمانی و به‌عنوان درمان نارسایی قلبی، دیابت، سرطان سینه و فشارخون بالا مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۱-۲۳). علاوه بر موارد ذکر شده، کوآنزیم Q10، قادر به مهار رادیکال‌های آزاد بوده و هم‌چنین در واکنش‌های التهابی می‌تواند نقش داشته باشد (۲۴، ۲۵).

مطالعه دقیقی که بتواند اثر حفاظتی تجویز توام دو ترکیب متفورمین و کوآنزیم Q10 بر آسیب‌های القا شده توسط DOX بر کبد را شرح دهد وجود ندارد. هر چند تعدادی پژوهش برای بررسی اثرات جداگانه هر یک از این مواد انجام شده‌اند، اما نیاز است تا برای بررسی اثرات ترکیبی متفورمین و کوآنزیم Q10 این مطالعه صورت پذیرد. تجویز همزمان متفورمین و کوآنزیم Q10 می‌تواند اثر محافظتی افزایشی علیه DOX داشته باشد. لذا، در این مطالعه سعی شده است که تأثیر تجویز همزمان و جداگانه متفورمین و Q10 در پیشگیری از آسیب کبدی ناشی از DOX در موش صحرایی بررسی

گردد. با توجه به این که در فرایندهای آسیب بافتی، التهاب و رخداد تومور و آسیب به کبد، افزایش سطوح سرمی بعضی از آنزیم‌ها و میزان استرس اکسیداتیو، پراکسیداسیون لیپیدی، تولید متابولیت‌های سمی اکسیژن و... مشاهده می‌گردد؛ بنابراین در مطالعه مذکور، به بررسی این پارامترها نیز پرداخته خواهد شد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و کیت‌ها

ماده شیمیایی TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) بوتانول، پراکسید هیدروژن، سدیم مونو هیدروژن سلفات، مونو سدیم دی‌هیدروژن، استات سدیم، سولفات آهن، کلرید آهن، آلبومین سرم گاوی، کوماسی بلو از شرکت فلوکا (Fluka) خریداری شد. مواد شیمیایی اسید کلریدریک، سولفات آهن، کلروفریک و سدیم استات به‌کار رفته در این آزمایش از شرکت مرک (Merck) آلمان تهیه شدند. کیت‌های تجاری سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، گلوکاتیون پراکسیداز (GPX)، از کمپانی Zellbio (آلمان)، کیت مربوط به آنزیم‌های کبدی از شرکت بایومد (تهران، ایران) خریداری گردید. ماده کتامین از شرکت آلفاسان (هلند) و DOX از اکتروفارما و متفورمین از شرکت اکتورکو (البرز، ایران) خریداری شدند.

انتخاب حیوانات

نوع مطالعه حاضر، تجربی آزمایشگاهی و نوع طرح کاربردی بنیادی است. ۳۶ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار، با سن ۸ هفته از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران خریداری شد و جهت تطبیق با محیط و شرایط جدید به مدت دو هفته بدون هیچ مداخله تحقیقاتی دسترسی آزاد به منابع از قیل آب و غذا نگهداری شدند تا وزن آن‌ها به ۱۸۰-۲۰۰ گرم برسد. شرایط نگهداری حیوانات شامل دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد، ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و در بستری از پوشال

بود. این تحقیق از نظر رعایت موازین اخلاقی، مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اردبیل بوده و دارای کد اخلاق IR.ARUMS.AEC.1402.019 است.

دسته بندی حیوانات

موش های صحرایی، به طور تصادفی (Random) به ۶ گروه ۶ تایی تقسیم بندی شدند:

۱- گروه کنترل نرمال (C.N)، یک هفته بدون مداخله درمانی و با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند.

۲- گروه کنترل متفورمین و کوانزیم Q10 (C.Met+Q10) روزانه به مدت یک هفته ترکیبی از ۲۰۰ میلی گرم متفورمین و ۱۰ میلی گرم کوآنزیم Q10 (به ازای کیلوگرم وزن بدن) از طریق گاوژ دریافت کردند.

۳- گروه کنترل آسیب با دوکسوروبیسین (C.Dox)، به مدت یک هفته آب مقطر و در روز هشتم ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم Dox به صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

۴- گروه پیش درمان با متفورمین (T.Met)، روزانه به مدت یک هفته ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن متفورمین از طریق گاوژ (Gavage) و در روز هشتم ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم DOX به صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

۵- گروه پیش درمان با کوانزیم Q10 (T.Q10)، روزانه به مدت یک هفته ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن کوآنزیم Q10 از طریق گاوژ و در روز هشتم ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم DOX به صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

۶- گروه پیش درمان با ترکیبی از متفورمین و کوانزیم Q10 (T.Met+Q10)، روزانه به مدت یک هفته ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن متفورمین و ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن کوآنزیم Q10 از طریق گاوژ و در روز هشتم ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم DOX به صورت داخل صفاقی دریافت کردند.

موش های صحرایی، ۲۴ ساعت پس از تزریق DOX، با تزریق ۱۰ mg/kg کتامین و ۹۰ mg/kg زایلازین به ازای وزن بدن، از طریق داخل صفاقی بیهوش شدند. بعد از خونگیری مستقیم از قلب، بافت کبد و نمونه سرم برای تجزیه و تحلیل بیوشیمیایی و هیستوپاتولوژیک جمع آوری گردید. قسمتی از نمونه های بافتی در فرمالین ۱۰ درصد و بقیه بافت ها و نمونه سرمی در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند (۲۶-۳۱).

تهیه لیز بافت

برای تهیه لیز بافت، ۲۰۰ میلی گرم بافت کبد بعد از خرد شدن با ۲ میلی لیتر بافر هموژنیزاسیون (تریس بافر) ترکیب شد. سپس با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲ دقیقه در دستگاه هموژنایزر هموژنیزه شد. سوسپانسیون به دست آمده با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد تا سلول های غیر همگن رسوب کنند. محلول همگن خالص در اندازه گیری فاکتورهای استرس اکسیداتیو استفاده شد (۳۲).

اندازه گیری فاکتورهای سرمی

سطوح سرمی ALT، AST و ALP با استفاده از کیت های سنجش استاندارد Biomed طبق دستورالعمل سازنده اندازه گیری شد. آزمایش ها براساس دستورالعمل های ارائه شده در هر کیت آزمایشگاهی با استفاده از یک آنالایزر خودکار (بیوشیمی آنالایزر BT 1500، ایتالیا) انجام شد.

اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدان تام به روش FRAP

برای اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدان تام، هموژنات بافت ها با تست FRAP از روش Benzie & Strain استفاده شد (۳۳). برای تهیه معرف FRAP ابتدا میزان ۵۰ میلی لیتر از بافر استات (pH=۳/۶، ۳۰۰ mmol/l) با ۵ میلی لیتر از TPTZ (۱۰ mmol/l) محلول در اسید کلریدریک (۴۰ mmol/l) مخلوط شد و سپس ۵ میلی لیتر محلول کلرید آهن (۲۰ mmol/l) اضافه گردید. پس از تهیه

معرف FRAP، ۱/۵ میلی لیتر از این معرف به داخل کووت ریخته شد تا به دمای ۳۷ درجه برسد. جذب آن در طول موج ۵۹۳ نانومتر با استفاده از فوتومتر (Ependorf, Ecom-E6125) اندازه گیری شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از هر کدام از هموژنات ها به محلول فوق اضافه گردید تا واکنش آغاز شود. پس از ۱۰ دقیقه جذب آن در طول موج ۵۹۳ نانومتر اندازه گیری گردید. بعد از کسر جذب بلانک، مقدار FRAP به دست آمده با استفاده از استاندارد $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ به واحد $\mu\text{mol FeSO}_4 \text{ equivalent/gram tissue}$ بیان گردید (۳۴).

اندازه گیری مالون دی آلدئید (MDA) در کبد
مالون دی آلدئید براساس روش Mihara & Uchiyama با تغییرات جزئی اندازه گیری شد. به طور خلاصه ۴۰۰ میکرولیتر از مایع رویی لیزات بافتی در ۴۰۰ میکرولیتر تری کلرواستیک اسید حل و سانتریفیوژ شد. سپس، ۴۰۰ میکرولیتر مایع رویی با ۲۴۰۰ میکرولیتر اسید فسفریک (۱ درصد) مخلوط شد و پس از ورتکس، ۱ میلی لیتر تیوباریتوریک اسید (۰/۶۷ درصد) به لوله آزمایش اضافه شد و پس از یک بار ورتکس، به مدت ۶۰ دقیقه در بن ماری در حال جوش قرار داده شد. پس از سرد شدن، ۱۶۰۰ میکرولیتر pH -بوتانول به نمونه ها اضافه شد و یک بار دیگر به مدت ۱ دقیقه ورتکس شدند. بعد از سانتریفیوژ، جذب نوری محلول رویی، در طول موج ۵۳۲ نانومتر در برابر pH -بوتانول به عنوان بلانک اندازه گیری شد. پس از انتقال نتایج به دست آمده به منحنی استاندارد ۱، ۳، ۳-تترا اتوکسی پروپان، غلظت MDA نمونه ها تعیین شد (۳۵).

اندازه گیری فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و گلوکاتایون پراکسیداز (GPx)
اندازه گیری فعالیت آنزیم های SOD و GPx با استفاده از کیت SOD کمپانی Zellbio آلمان (Cat No.:ZB-SOD-96A) و کیت GPx کمپانی

اندازه گیری فعالیت کاتالاز بافتی

پس از برداشت بافت کبد و همگن شدن آن در بافر فسفات (pH=۷)، از محلول همگن خالص برای اندازه گیری فعالیت کاتالاز با پراکسید هیدروژن به عنوان سوسترا استفاده شد. فعالیت کاتالاز به روش Aebi اندازه گیری شد. به طور خلاصه در این روش، ۵۰ میکرولیتر مایع رویی سانتریفیوژ شده ۵۰۰ برابر با بافر فسفات رقیق شد. سپس ۲ میکرولیتر از این محلول با ۱ میلی لیتر پراکسید هیدروژن ۳۰ میلی مولار در کووت ریخته شد و تغییرات جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر در برابر بلانک، در ۱ دقیقه بررسی گردید. واکنش شیمیایی با افزودن پراکسید هیدروژن آغاز و سپس فعالیت آنزیم محاسبه شد (۳۶).

بررسی های هیستوپاتولوژیکی

به منظور بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیکی نمونه ها در فرمالین ۱۰ درصد ثابت شده و سپس مراحل پاساژ بافتی را طی کرده و قالب گیری شدند. از قالب های مورد نظر مقاطع ۵ میکرونی تهیه شد و روی لام ها قرار گرفت. در نهایت نمونه ها به روش هماتوکسیلین-ئوژین (H&E) رنگ آمیزی گردید. پس از تهیه لام ها تغییرات بافتی با استفاده از میکروسکوپ و تصویربرداری از نمونه ها مورد ارزیابی قرار گرفت. ارزیابی ها شامل بررسی ساختار ورید مرکزی، آسیب سلول های کبدی و تخریب سینوزوئیدی بود.

تحلیل آماری

آنالیز تمام تست های آماری با استفاده از SPSS-22 انجام گرفت و توسط آزمون ANOVA (آنالیز واریانس) یک طرفه و با سطح معنی داری کم (LSD) تحلیل شدند. میزان معنی داری به صورت $P < 0.05$

در نظر گرفته شد و نتایج آنالیز آماری به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار گزارش گردید.

یافته‌ها

اثر متفورمین و کوآنزیم Q10 بر عوامل بیوشیمیایی

سطح سرمی سه آنزیم مهم و کلیدی کبد در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند. تأثیر داروهای متفورمین و Q10 بر روی میزان سطح سرمی این آنزیم‌ها در گروه‌های مربوطه در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. با توجه به جدول شماره ۱، میزان سطح سرمی آنزیم AST، در گروه کنترل آسیب، بیش‌تر از گروه‌های دیگر از جمله گروه کنترل نرمال بود و این تفاوت، کاملاً معنادار مشاهده شد ($P < 0/001$). هم‌چنین گروه‌های درمان نیز به‌طور معناداری ($P < 0/001$)، نسبت به گروه کنترل آسیب، کاهش در میزان این آنزیم کبدی را نشان دادند. در رابطه با آنزیم ALT و ALP نیز نتایج مشابهی رویت شد. میزان فعالیت سرمی این آنزیم‌ها در گروه کنترل آسیب، بیش‌تر از گروه کنترل نرمال و در گروه‌های درمان (متفورمین، کوآنزیم Q10 و ترکیب این دو) به‌طور معناداری ($P < 0/001$) کم‌تر از گروه کنترل دو کسورویسین بود.

اثر متفورمین و کوآنزیم Q10 بر سطوح پراکسیداسیون لیپیدی

مقایسه MDA بافتی در موش‌های آسیب دیده با دو کسورویسین با موش‌های سالم (C.N) نشان دهنده افزایش معنی‌دار سطح MDA پس از القای استرس

اکسیداتیو بود ($P < 0/001$). با این حال، تیمار با داروهای متفورمین و کوآنزیم Q10، جداگانه و هم‌چنین در ترکیب با یکدیگر، سطح پراکسیداسیون لیپیدی را به‌طور معناداری ($P < 0/001$) کاهش داد که منجر به کاهش سطح MDA در مقایسه با گروه بدون تیمار (گروه آسیب) شد (نمودار شماره ۱).

مقایسه سطوح عوامل استرس اکسیداتیو در گروه‌های مورد مطالعه

مقایسه سطوح آنتی‌اکسیدانی کاتالاز، SOD و GPx در بافت موش‌های آسیب دیده با DOX، با موش‌های سالم (C.N)، کاهش قابل توجهی در سطوح این آنزیم‌ها پس از القای آسیب و التهاب نشان داد ($P < 0/001$). با این حال، تیمار با داروهای متفورمین و کوآنزیم Q10 به‌طور معنی‌داری مانع از کاهش فعالیت کاتالاز، SOD و GPx بافتی در مقایسه با گروه کنترل آسیب شد (نمودارهای شماره ۲، ۳ و ۴).

با توجه به نمودار شماره ۵، ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در گروه کنترل آسیب، به‌طور معناداری کم‌تر از گروه کنترل نرمال بود ($P < 0/001$) که نشان از کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در گروه‌های آسیب و بدون درمان است. اما با بررسی تأثیر داروها بر TAC، مشاهده شد که در گروه‌های درمان، مخصوصاً به‌صورت ترکیب دو دارو، میزان TAC نسبت به گروه کنترل آسیب، با سطح معنی‌داری ($P < 0/001$) افزایش داشته است.

جدول شماره ۱: تأثیر پیش درمان با متفورمین و کوآنزیم Q10 بر آنزیم‌های کبدی (AST, ALP, ALT).

گروه‌ها	کنترل نرمال (C.N)	کنترل متفورمین و Q10 (C.Met+Q10)	کنترل دو کسورویسین (C.Dox, Q10)	پیش درمان با متفورمین (T.Met)	پیش درمان با کوآنزیم Q10 (T.Q10)	پیش درمان با متفورمین و کوآنزیم Q10 (T.Met+Q10)
ALT	60.5 ± 5.06	66.0 ± 7.23	a 113.16 ± 10.04	b 93.33 ± 14.96	b 106.5 ± 14.93	b 87.75 ± 7.27
ALP	361.75 ± 16.47	333.75 ± 26.11	a 543.2 ± 47.91	b 389.6 ± 33.65	b 426.25 ± 24.39	b 329.5 ± 35.87
AST	97.25 ± 10.53	96.4 ± 8.87	a 180.33 ± 18.95	b 160.2 ± 20.04	b 140.2 ± 19.02	b 120.6 ± 16.54

اعداد به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار گزارش شده‌اند.

a نشان دهنده معنادار بودن ($P < 0/001$) گروه کنترل آسیب نسبت به گروه کنترل نرمال،

b نشان دهنده معنادار بودن ($P < 0/001$) گروه درمان نسبت به گروه آسیب،

C.N: گروه کنترل نرمال،

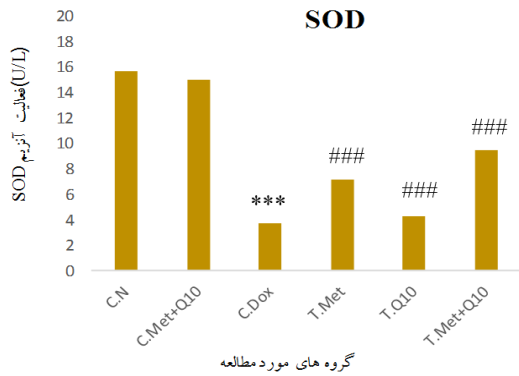
C.Met+Q10: گروه کنترل متفورمین و کوآنزیم Q10،

C.Dox: گروه کنترل آسیب با دو کسورویسین،

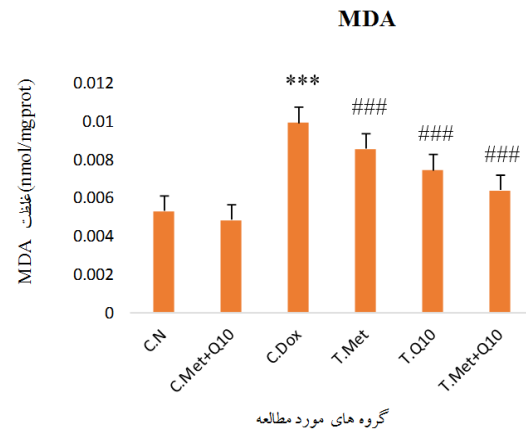
T.Met: گروه پیش درمان با متفورمین،

T.Q10: گروه پیش درمان با کوآنزیم Q10،

T.Met+Q10: گروه پیش درمان با ترکیب متفورمین و کوآنزیم Q10.



نمودار شماره ۳: پیش درمان با متفورمین و کوآنزیم Q10 بر میزان فعالیت SOD در بافت کبد تأثیر گذاشته است. این تأثیر در گروه کنترل آسیب ***: نسبت به گروه کنترل نرمال ($P > 0.001$) و گروه درمان ###: نسبت به گروه آسیب ($P > 0.001$) معنادار بوده است.



نمودار شماره ۱: تأثیر پیش درمان با متفورمین و کوآنزیم Q10 بر MDA بافت کبد. اعداد به صورت میانگین $\pm$ خطای معیار گزارش شده‌اند.

***: نشان دهنده معنادار بودن ($P < 0.001$) گروه کنترل آسیب نسبت به گروه کنترل نرمال،

###: نشان دهنده معنادار بودن ($P < 0.001$) گروه درمان نسبت به گروه آسیب،

C.N: گروه کنترل نرمال،

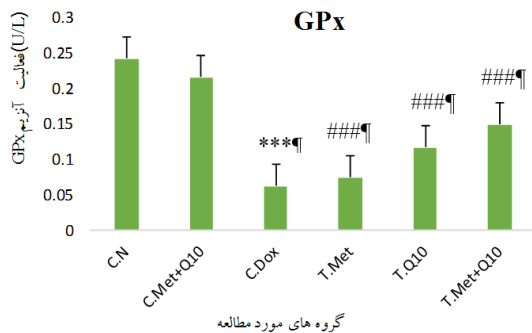
C.Met+Q10: گروه کنترل متفورمین و کوآنزیم،

C.Dox, Q10: گروه کنترل دوکسوروبیسین،

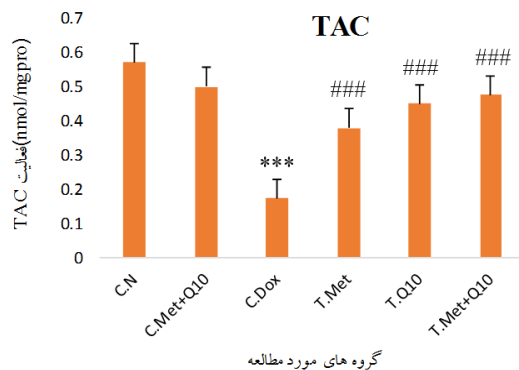
T.Met: گروه پیش درمان با متفورمین،

T.Q10: گروه پیش درمان با کوآنزیم Q10،

T.Met+Q10: گروه پیش درمان با ترکیب متفورمین و کوآنزیم Q10.



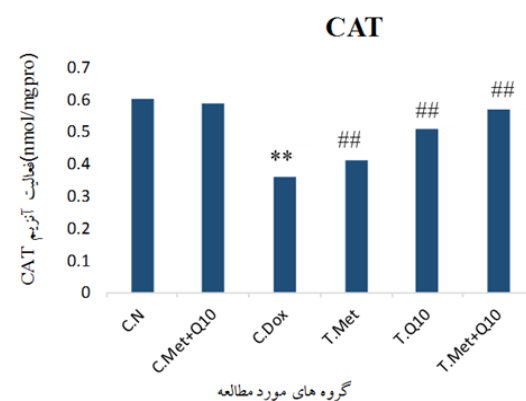
نمودار شماره ۴: پیش درمان با متفورمین و کوآنزیم Q10 بر میزان فعالیت GPx در بافت کبد تأثیر گذاشته است. این تأثیر در گروه کنترل آسیب ***: نسبت به گروه کنترل نرمال ($P < 0.001$) و گروه درمان ###: نسبت به گروه آسیب ($P < 0.001$) معنادار بوده است.



نمودار شماره ۵: پیش درمان با متفورمین و کوآنزیم Q10 بر توان آنتی اکسیدانی (TAC) در بافت کبد تأثیر گذاشته است. این تأثیر در گروه کنترل آسیب

***: نسبت به گروه کنترل نرمال ($P > 0.001$) و گروه درمان

###: نسبت به گروه آسیب ($P > 0.001$) معنادار بوده است.



نمودار شماره ۲: پیش درمان با متفورمین و کوآنزیم Q10 بر میزان فعالیت CAT در بافت کبد تأثیر گذاشته است. این تأثیر در گروه کنترل آسیب

*: نسبت به گروه کنترل نرمال ($P > 0.001$) و گروه درمان

##: نسبت به گروه آسیب ($P > 0.001$) معنادار بوده است.

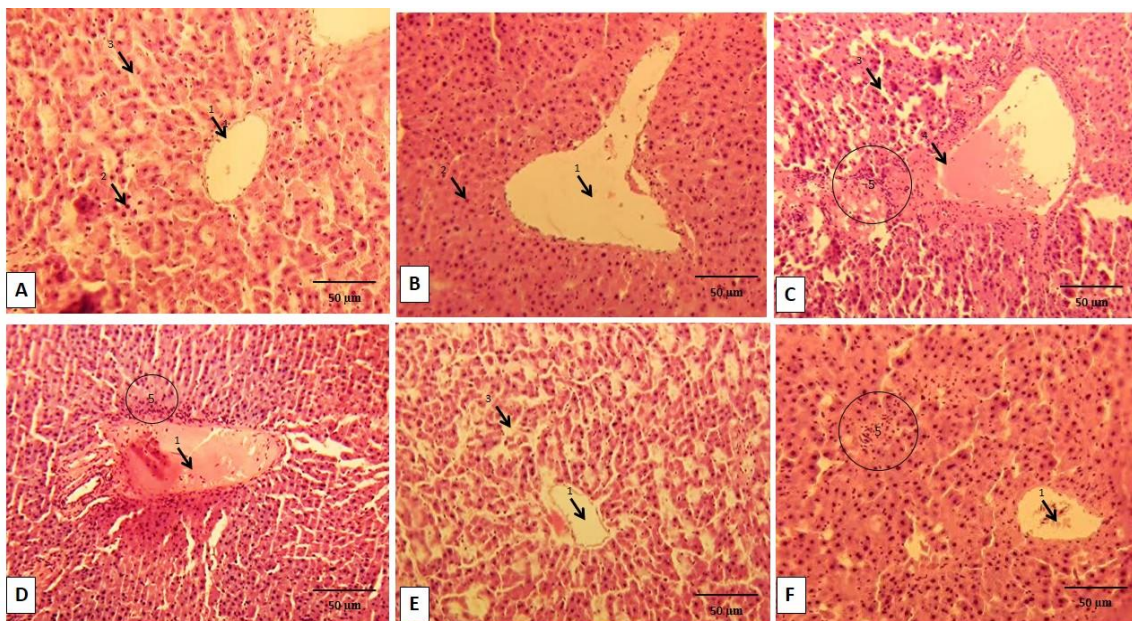
نتایج هیستوپاتولوژیکی

بررسی‌های هیستوپاتولوژیکی نشان داد که ساختمان بافتی کبد در گروه کنترل نرمال (تصویر شماره A-1) و کنترل متفورمین و کوآنزیم Q10 (تصویر شماره B-1) حالت طبیعی داشته و ساختار سلول‌های کبدی، ورید مرکزی و سینوزوئیدها طبیعی می‌باشد. در گروه کنترل دوکسوروبیسین، تخریب دیواره‌های کبدی و سینوزوئیدها، اینفلتراسیون لنفوئیدی و پرخونی ورید مرکزی به همراه آسیب دیواره ورید مشاهده شد (تصویر شماره C-1). در گروه‌هایی که تحت درمان قرار گرفته بودند میزان آسیب وارده به ساختار بافتی کبد نسبت به گروه کنترل دوکسوروبیسین کم تر بود. در گروه‌هایی که کوآنزیم Q10 و متفورمین به تنهایی دریافت کرده بودند، هر چند ساختار بافتی دچار آسیب‌هایی بود؛ اما میزان آسیب نسبت به گروه کنترل دوکسوروبیسین کم تر بود (تصویر شماره D-1 و E-1). از طرفی، مقایسه بین گروه کنترل دوکسوروبیسین و گروه تحت درمان با ترکیب متفورمین

و کوآنزیم Q10 بیش‌ترین تاثیر در جلوگیری از آسیب بافتی را نشان داد (تصویر شماره F-1).

بحث

یافته‌های این مطالعه نشان داد که تزریق DOX به موش‌ها باعث آسیب شدید کبدی می‌شود که با افزایش سطح سرمی AST، ALT و ALP تشخیص داده می‌شود. آسیب به سلول‌های کبدی فاکتورهای عملکردی آن‌ها را تغییر می‌دهد، باعث نفوذپذیری غشا شده و منجر به نشت آنزیم‌ها به فضای خارج سلولی می‌گردد (۳۸،۳۷). درمان با متفورمین و کوآنزیم Q10، تا حد زیادی شدت آسیب کبدی ناشی از DOX را تعدیل کرد. بازگشت سطح آنزیم به سطوح تقریباً طبیعی در موش‌های تحت درمان نشان می‌دهد که متفورمین و کوآنزیم Q10 می‌توانند غشاهای سلولی کبد را تثبیت کرده و از نشت آنزیم‌ها جلوگیری کنند. جلوگیری از تولید رادیکال‌های آزاد و خنثی‌سازی آن‌ها و هم‌چنین پتانسیل حفاظتی در برابر



تصویر شماره ۱: ساختمان میکروسکوپی بافت کبد در گروه‌های مورد مطالعه. در گروه کنترل نرمال (A) و کنترل متفورمین و کوآنزیم Q10 (B) ساختمان طبیعی ورید مرکزی (۱)، سلول‌های هپاتوسیت (۲)، سینوزوئیدها (۳) قابل مشاهده می‌باشد. DOX باعث آسیب بافتی در تغییرات سینوزوئیدی (۳)، پرخونی ورید مرکزی به همراه آسیب دیواره ورید (۴)، اینفلتراسیون لنفوئیدی (۵) شده است (C). درمان موش‌های صحرایی با متفورمین (D)؛ کوآنزیم Q10 (E) و ترکیب متفورمین و کوآنزیم Q10 (F) مانع از آسیب بافتی ناشی از DOX شده است.

سموم کبدی می‌تواند از دیگر دلایل احتمالی اثر درمانی متفورمین و Q10 باشد. یکی دیگر از شاخص‌های آسیب به سلول‌های کبدی پراکسیداسیون لیپیدی است (۳۹). در واقع پراکسیداسیون لیپیدی عدم تعادل بین میزان رادیکال‌های آزاد و آنتی‌اکسیدان‌ها را در بدن نشان می‌دهد. اگر مقدار آنتی‌اکسیدان‌ها در بدن کم‌تر از میزان اکسیدان‌ها باشد، این اکسیدان‌های اضافی می‌توانند با ترکیبات حیاتی بدن از جمله پیوندهای دوگانه غشاء متصل شده و باعث آسیب شوند (۴۰).

نتایج اندازه‌گیری میزان MDA در گروه‌های درمان (متفورمین + Q10) نشان داد که این داروها می‌توانند به صورت جداگانه و هم‌چنین در ترکیب با یکدیگر، باعث کاهش شاخص پراکسیداسیون لیپیدی شوند. رابطه بین متفورمین و MDA در زمینه‌های مختلف از جمله دیابت، سرطان و استرس اکسیداتیو مورد مطالعه قرار گرفته است. یک مطالعه نشان داد که متفورمین، استرس اکسیداتیو ناشی از دیابت ملیتوس و کارسینوم هپاتوسلولار را در مدل موش بهبود می‌بخشد و این عمل را با اثرات قابل توجهی بر سطوح MDA و دیگر نشانگرهای زیستی استرس اکسیداتیو انجام می‌دهد (۴۱). هم‌چنین یک مطالعه در موش‌های دیابتی نشان داد که متفورمین کاهش قابل توجهی در غلظت MDA و بهبود قابل توجهی در فعالیت‌های تغییر یافته آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نشان می‌دهد که بیانگر اثرات آنتی‌اکسیدانی بالقوه آن است (۴۲). علاوه بر این، رابطه بین کوآنزیم Q10 و MDA نیز در زمینه‌های مختلف از جمله بیماری‌های قلبی-عروقی، دیابت و التهاب مورد مطالعه قرار گرفته است. یک مرور سیستماتیک و متآنالیز کارآزمایی‌های بالینی تصادفی‌سازی و کنترل شده، اثر مکمل کوآنزیم Q10 را بر بیومارکرهای استرس اکسیداتیو ارزیابی کرد. این مطالعه نشان داد که این مکمل به طور قابل توجهی سطوح MDA سرم را کاهش می‌دهد (۴۳). در مطالعه حاضر نیز اثر جداگانه متفورمین و Q10 و هم‌چنین اثر توأم آن‌ها بررسی گردید که نتایج نشان‌دهنده کاهش

معنی دار این شاخص در گروه‌های تحت درمان در مقایسه با گروه کنترل دوکسوروبیسین بود. بنابراین متفورمین و کوآنزیم Q10 می‌توانند موجب کاهش پراکسیداسیون لیپیدی به سبب DOX شوند.

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نسبت به آسیب شدید به سلول‌ها حساس هستند (۴۴). می‌توان گفت کاهش سطوح SOD، GPx و CAT نشان‌دهنده آسیب اکسیداتیو به کبد توسط داروی DOX است. آسیب به کبد به دنبال تزریق DOX نتیجه پراکسیداسیون لیپیدی است که توسط رادیکال‌های آزاد مشتق شده از DOX ایجاد می‌شود. بنابراین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مهار تولید رادیکال‌های آزاد در پیشگیری از هپاتوپاتی‌ها و آسیب‌های اکسیداتیو کبدی ناشی از DOX مهم است. آنزیم‌های SOD، GPx و CAT یک سیستم پشتیبانی مشترک در برابر ROS تشکیل می‌دهند. در آسیب‌های کبدی ناشی از داروی DOX، تعادل بین تولید ROS و سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی این آنزیم‌ها در نتیجه استرس اکسیداتیو مختل می‌شود که از طریق برخی رویدادها عملکرد سلولی را مختل کرده و باعث آسیب کبد و نکروز بافتی می‌شود. در شرایط عادی، ROS از طریق سیستم آنتی‌اکسیدانی که حاوی آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیر آنزیمی است، سم‌زدایی می‌شود. SOD یک آنتی‌اکسیدان ویژه برای تبدیل آنیون سوپر اکسید به پراکسید هیدروژن است که آن نیز از طریق CAT و GPx سم‌زدایی می‌شود. بنابراین، GPx از گلو تاتیون احیاء (GSH) به عنوان بستر استفاده می‌کند و رادیکال‌های آزاد را با همکاری SOD دفع می‌کند (۴۵). طی مطالعه‌ای که انجام شده است، تأثیر کوآنزیم Q10 بر روی میزان فعالیت آنزیم‌های اکسیدانی مورد بررسی قرار گرفته است که در آن، یک همبستگی مثبت بین این مکمل و فعالیت آنزیم‌ها مشاهده شده است (۴۶). هم‌چنین در مطالعه دیگر نشان داده شده است که این مکمل در محدوده دوزهای آزمایش شده باعث کاهش غلظت MDA و افزایش TAC و آنزیم‌های سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی می‌شود (۴۷). برخی مطالعات نشان داده‌اند که متفورمین

مربوطه می شود.

در این مطالعه، تجویز توام متفورمین و Q10 باعث افزایش معنادار در میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی (SOD، GPx و CAT)، کاهش سطوح سرمی آنزیم های کبدی و همچنین سبب کاهش شاخص پراکسیداسیون لیپیدی (MDA) شد که نشان می دهد استفاده همزمان از این دو ماده، در کنار شیمی درمانی با داروی دوکسوروبیسین می تواند به میزان زیادی در حفظ یا افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی و TAC نقش داشته باشد و سبب کاهش آسیب های اکسیداتیو ناشی از آزاد شدن رادیکال های آزاد مخصوصاً در بافت کبد شود.

سپاسگزاری

از کارشناسان محترم آزمایشگاه مرکزی و آزمایشگاه بیوشیمی بالینی و نیز از کمیته تحقیقات و فناوری دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل که با حمایت های مادی و معنوی خود، در جهت پیشبرد مراحل طرح یاریمان کردند، تشکر و قدردانی می گردد. این مقاله دارای تایید اخلاق از دانشگاه علوم پزشکی اردبیل با کد اخلاق: IR.ARUMS.AEC.1402.019 می باشد.

References

- Dietlein F, Wang AB, Fagre C, Tang A, Besselink NJM, Cuppen E, et al. Genome-wide analysis of somatic noncoding mutation patterns in cancer. *Science* 2022; 376(6589): eabg5601.
- Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer* 2021; 149: 778-789.
- Soerjomataram I, Bray F. Planning for tomorrow: global cancer incidence and the role of prevention 2020-2070. *Nat Rev Clin Oncol* 2021; 18(10): 663-672.
- Rezapour A, Nargesi S, Mezginejad F, Rashki Kemmak A, Bagherzadeh R. The Economic Burden of Cancer in Iran during 1995-2019: A Systematic Review. *Iran J Public Health* 2021; 50(1): 35-45.
- Hanaka J, Fujita T, Hisamatsu A, Kondo R. Effect of Pharmacist Interview before Doctor's Examination for Breast Cancer Chemotherapy Patients. *Gan To Kagaku Ryoho* 2020; 47(8): 1209-1212.
- Kong CY, Guo Z, Song P, Zhang X, Yuan YP, Teng T, et al. Underlying the Mechanisms of Doxorubicin-Induced Acute Cardiotoxicity: از طریق افزایش اثرات آنتی اکسیدانی، مهار مسیرهای آپوپتوز و حفظ عملکرد میتوکندری، اثر محافظتی در برابر سمیت قلبی ناشی از DOX دارد (۴۸). نتایج مطالعه حاضر حاکی از بهبود فعالیت آنزیم های SOD، GPx و CAT در گروه های پیش درمان و کنترل متفورمین و کوآنزیم Q10 نسبت به گروه کنترل دوکسوروبیسین می باشد. بازگشت وضعیت موش ها به حالت عادی پس از آسیب دیدگی توسط DOX در گروه های تجویز شده با متفورمین، کوآنزیم Q10، متفورمین+کوآنزیم Q10 ممکن است به دلیل توانایی این داروها در تحریک آنزیم های آنتی اکسیدانی برای مقابله با ROS تولید شده توسط DOX باشد. سیستم های آنتی اکسیدانی غیرآنزیمی مانند GSH حساسیت بافت را به آسیب های اکسیداتیو تعیین می کنند. کاهش GSH کبد باعث افزایش حساسیت کبد به مواد شیمیایی مانند CCl₄ و DOX می شود (۴۹).

هم چنین با توجه به نتایج هیستوپاتولوژیکی، تجویز متفورمین و کوآنزیم Q10 در مقایسه با گروه کنترل دوکسوروبیسین موجب کاهش التهاب، آسیب بافتی و تغییرات هیستومورفولوژیکی و اینفلتراسیون لنفونیدی از طریق دارا بودن خاصیت آنتی اکسیدانی و بهبود پارامترهای

- Oxidative Stress and Cell Death. *Int J Biol Sci* 2022; 18(2): 760-770.
7. Rivankar S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *J Cancer Res Ther* 2014; 10(4): 853-858.
 8. Kciuk M, Gielecińska A, Mujwar S, Kołat D, Kałuzińska-Kołat Ż, Celik I, et al. Doxorubicin-An Agent with Multiple Mechanisms of Anticancer Activity. *Cells* 2023; 12(4): 659.
 9. Shuey A, Patricelli C, Oxford JT, Pu X. Effects of doxorubicin on autophagy in fibroblasts. *Hum Exp Toxicol* 2024; 43: 9603271241231947.
 10. Sin TK, Tam BT, Yung BY, Yip SP, Chan LW, Wong CS, et al. Resveratrol protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in aged hearts through the SIRT1-USP7 axis. *J Physiol* 2015; 593(8): 1887-1899.
 11. Sin TK, Tam BT, Yu AP, Yip SP, Yung BY, Chan LW, et al. Acute Treatment of Resveratrol Alleviates Doxorubicin-Induced Myotoxicity in Aged Skeletal Muscle Through SIRT1-Dependent Mechanisms. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2016; 71(6): 730-739.
 12. Shinlapawittayatorn K, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. The effects of doxorubicin on cardiac calcium homeostasis and contractile function. *J Cardiol* 2022; 80(2): 125-132.
 13. Kumral A, Giriş M, Soluk-Tekkeşin M, Olgaç V, Doğru-Abbasoğlu S, Türkoğlu Ü, et al. Beneficial effects of carnosine and carnosine plus vitamin E treatments on doxorubicin-induced oxidative stress and cardiac, hepatic, and renal toxicity in rats. *Hum Exp Toxicol* 2016; 35(6): 635-643.
 14. Prasanna PL, Renu K, Valsala Gopalakrishnan A. New molecular and biochemical insights of doxorubicin-induced hepatotoxicity. *Life Sci* 2020; 250: 117599.
 15. Rahmani F, Najafizade P, Mousavi Z, Rastegar T, Barzegar E. The protective effect of quercetin against hepatotoxicity induced by doxorubicin in male rats. *Iranian J Pharmacol Ther* 2018; 16: 1-8.
 16. Dillard CJ, Litov RE, Savin WM, Dumelin EE, Tappel AL. Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J Appl Physiol Environ Exerc Physiol* 1978; 45(6): 927-932.
 17. Dutta S, Shah RB, Singhal S, Dutta SB, Bansal S, Sinha S, Haque M. Metformin: A Review of Potential Mechanism and Therapeutic Utility Beyond Diabetes. *Drug Des Devel Ther* 2023; 17: 1907-1932.
 18. Ma R, Yi B, Riker AI, Xi Y. Metformin and cancer immunity. *Acta Pharmacol Sin* 2020; 41(11): 1403-1409.
 19. Abbasi F, Chu JW, McLaughlin T, Lamendola C, Leary ET, Reaven GM. Effect of metformin treatment on multiple cardiovascular disease risk factors in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 2004; 53(2): 159-164.
 20. Zhang Y, Wang H, Xiao H. Metformin Actions on the Liver: Protection Mechanisms Emerging in Hepatocytes and Immune Cells against NASH-Related HCC. *Int J Mol Sci* 2021; 22(9): 5016.
 21. Niklowitz P, Sonnenschein A, Janetzky B, Andler W, Menke T. Enrichment of coenzyme Q10 in plasma and blood cells: defense against oxidative damage. *Int J Biol Sci* 2007; 3(4): 257-262.
 22. Madmani ME, Yusuf Solaiman A, Tamr Agha K, Madmani Y, Shahrour Y, Essali A, et al. Coenzyme Q10 for heart failure. *Cochrane Database Syst Rev* 2014 (6): Cd008684.

23. Arenas-Jal M, Suñé-Negre JM, García-Montoya E. Coenzyme Q10 supplementation: Efficacy, safety, and formulation challenges. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2020; 19(2): 574-594.
24. Lamia SS, Emran T, Rikta JK, Chowdhury NI, Sarker M, Jain P, et al. Coenzyme Q10 and Silymarin Reduce CCl(4)-Induced Oxidative Stress and Liver and Kidney Injury in Ovariectomized Rats-Implications for Protective Therapy in Chronic Liver and Kidney Diseases. *Pathophysiology* 2021; 28(1): 50-63.
25. Chen HH, Yeh TC, Cheng PW, HoWY, Ho CY, Lai CC, et al. Antihypertensive Potential of Coenzyme Q10 via Free Radical Scavenging and Enhanced Akt-nNOS Signaling in the Nucleus Tractus Solitarii in Rats. *Mol Nutr Food Res* 2019; 63(6): e1801042.
26. Djabir YY, Arsyad MA, Sartini S, Lallo S. Potential Roles of *Kleinhovia hospita* L. Leaf Extract in Reducing Doxorubicin Acute Hepatic, Cardiac and Renal Toxicities in Rats. *Pharmacognosy Res* 2017; 9(2): 168-173.
27. Alkreathy H, Damanhour Z, Ahmed N, Slevin M, Ali SS, Osman AM. Aged garlic extract protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Food Chem Toxicol* 2010; 48(3): 951-956.
28. Fatemi I, Saeed-Askari P, Hakimzadeh E, Kaeidi A, Esmaeil-Moghaddam S, Pak-Hashemi M, Allahtavakoli M. Long-term metformin therapy improves neurobehavioral functions and antioxidative activity after cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Brain Res Bull* 2020; 163: 65-71.
29. Oner G, Ozcelik B, Ozgun MT, Ozturk F. The effects of metformin and letrozole on endometrium and ovary in a rat model. *Gynecol Endocrinol* 2011; 27(12): 1084-1086.
30. Güleş Ö, Kum Ş, Yıldız M, Boyacıoğlu M, Ahmad E, Naseer Z, et al. Protective effect of coenzyme Q10 against bisphenol-A-induced toxicity in the rat testes. *Toxicol Ind Health* 2019; 35(7): 466-481.
31. Vasiliev AV, Martinova EA, Sharanova NV, Gapparov MM. Effects of coenzyme Q10 on rat liver cells under conditions of metabolic stress. *Bull Exp Biol Med* 2011; 150(4): 416-419.
32. Dey S, Bindu S, Goyal M, Pal C, Alam A, Iqbal MS, et al. Impact of Intravascular Hemolysis in Malaria on Liver Dysfunction: Involvement of hepatic free heme overload, nf-kb activation, and neutrophil infiltration*. *J Biol Chem* 2012; 287(32): 26630-26646.
33. Putri D, Elya B, Puspitasari N. Fractionation of the n-hexane extract of *garcinia bancana* miq. (manggis hutan) leaves and its antioxidant activity based on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl and ferric reducing antioxidant power assays. *International Journal of Applied Pharmaceutics* 2018; 10(1): 407-411.
34. Munteanu IG, Apetrei C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Int J Mol Sci* 2021; 22(7): 3380.
35. Aguilar Diaz De Leon J, Borges CR. Evaluation of Oxidative Stress in Biological Samples Using the Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay. *J Vis Exp* 2020 (159): 10.3791/61122.
36. Dashtestani F, Ghourchian H, Najafi A. Silver-gold-apoferritin nanozyme for suppressing oxidative stress during cryopreservation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2019; 94: 831-840.
37. Prasanna PL, Renu K, Valsala Gopalakrishnan A. New molecular and biochemical insights of doxorubicin-induced hepatotoxicity. *Life Sci* 2020; 250: 117599.

38. Aljobaily N, Viereckl MJ, Hydock DS, Aljobaily H, Wu TY, Busekrus R, et al. Creatine Alleviates Doxorubicin-Induced Liver Damage by Inhibiting Liver Fibrosis, Inflammation, Oxidative Stress, and Cellular Senescence. *Nutrients* 2020; 13(1): 41.
39. Wang X, Wang B, Cheng M, Yu L, Liu W, Nie X, et al. Lipid peroxidation mediates the association between iron overload and liver injury: cross-sectional and longitudinal analyses in general Chinese urban adults. *Environ Sci Pollut Res Int* 2023; 30(21): 60343-60353.
40. Wang L, Tang J, Wang L, Tan F, Song H, Zhou J, et al. Oxidative stress in oocyte aging and female reproduction. *J Cell Physiol* 2021; 236(12): 7966-7983.
41. Ahmed Mobasher M, Galal El-Tantawi H, Samy El-Said K. Metformin Ameliorates Oxidative Stress Induced by Diabetes Mellitus and Hepatocellular Carcinoma in Rats. *Rep Biochem Mol Biol* 2020; 9(1): 115-128.
42. Chukwunonso Obi B, Chinwuba Okoye T, Okpashi VE, Nonye Igwe C, Olisah Alumanah E. Comparative Study of the Antioxidant Effects of Metformin, Glibenclamide, and Repaglinide in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *J Diabetes Res* 2016; 2016: 1635361.
43. Sangsefidi ZS, Yaghoubi F, Hajiahmadi S, Hosseinzadeh M. The effect of coenzyme Q10 supplementation on oxidative stress: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Food Sci Nutr* 2020; 8(4): 1766-1776.
44. Tan W, Zheng Q, Feng K, Feng X, Zhong W, Liao C, et al. Neuroprotection of *Gastrodia elata* polyphenols against H₂O₂-induced PC12 cell cytotoxicity by reducing oxidative stress. *Front Pharmacol* 2022; 13.
45. Jomova K, Alomar S, Alwasel S, Nepovimova E, Kuca K, Valko M. Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants. *Arch Toxicol* 2024; 98(5): 1323-1367.
46. Lee BJ, Lin YC, Huang YC, Ko YW, Hsia S, Lin PT. The relationship between coenzyme Q10, oxidative stress, and antioxidant enzymes activities and coronary artery disease. *Scientific World Journal* 2012; 2012: 792756.
47. Akbari A, Mobini GR, Agah S, Morvaridzadeh M, Omidi A, Potter E, et al. Coenzyme Q10 supplementation and oxidative stress parameters: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Eur J Clin Pharmacol* 2020; 76(11): 1483-1499.
48. Zilinyi R, Czompa A, Czegledi A, Gajtko A, Pituk D, Lekli I, Tosaki A. The Cardioprotective Effect of Metformin in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: The Role of Autophagy. *Molecules* 2018; 23(5): 1184.
49. Abirami A, Nagarani G, Siddhuraju P. Hepatoprotective effect of leaf extracts from *Citrus hystrix* and *C. maxima* against paracetamol induced liver injury in rats. *Food Science and Human Wellness* 2015; 4(1): 35-41.