

Research Article

Effect of *Echium amoenum* Extracts on the Development of Cardiovascular System of Zebrafish Embryos and Expression of *Nkx2-5*, *ApoE*, and *Tbx5* Genes Using the Real-Time PCR Method

Rozhin Solhjoei¹, Tahereh Naji^{1*}, Saeed Mohammadi Motamed², Nikoo Nasoohi¹

1- Department of Basic Sciences, TeMS.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Department of Pharmacognosy, TeMS.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

*Corresponding author: dr_naji@iau.ir

Received: 01 May 2025

Accepted: 11 August 2025

DOI: 10.60833/ascij.2025.1210947

Abstract

Cardiovascular disorders rank among the top leading causes of death on a global scale. Increasing interest has emerged in bioactive plant compounds for the potential support of cardiovascular-related health outcomes. This study assessed the cardiovascular development of zebrafish (*Danio rerio*) embryos and the expression of *Nkx2-5*, *ApoE*, and *Tbx5* genes with unrefined *Echium amoenum* extract. The extract was produced through maceration with 70% ethanol, and zebrafish embryos were treated with concentrations of 7.8 to 125 µg/mL concentration of the extract. Morphological indices of zebrafish embryos, application of cardiac histology, and expression of genes through Real-time PCR. The results demonstrated that at low to moderate concentration levels (7.8 to 62.5 µg/mL), the extract produced an upregulation of zebrafish embryos expression of target genes and more advanced cardiac development. In higher concentration (125 µg/mL), the embryos did not develop, displayed a body curvature, and signs of oxidative stress. Examination of histology showed that at subtoxic concentrations, the zebrafish heart tissue appeared histologically normal in its architecture and showed no signs of acute toxicity. Overall, this study supports that *Echium amoenum* extract and other natural products may act as a potential natural source of cardiovascular support by enhancing gene expression at an embryonic stage of cardiac development. Future studies need to be organized to assess the safety margins of *Echium amoenum* and verify its efficacy in adult models and clinical studies.

Keywords: *Nkx2-5*, *ApoE*, *Tbx5*, *Echium amoenum*, Zebrafish embryo, Cardiovascular system, Real-time PCR.

مقاله پژوهشی

اثر عصاره گل گاوزبان (*Echium amoenum*) بر تکامل سیستم قلبی عروقی جنین گورخرماهی و ژن‌های *ApoE*، *Nkx2-5* و *Tbx5* با استفاده از روش Real-Time PCR

رژین صلح‌جویی^۱، طاهره ناجی^{۱*}، سعید محمدی معتمد^۲، نیکو نصوحی^۱

۱- گروه علوم پایه، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه فارماکونوزی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: dr_naji@iau.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۵/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۱۱

DOI: 10.60833/ascij.2025.1210947

چکیده

اختلالات قلبی عروقی در میان علل اصلی مرگ‌ومیر در سطح جهانی قرار دارند. علاقه مندی فزاینده‌ای به ترکیبات گیاهی زیست فعال برای پشتیبانی بالقوه از پیامدهای سلامت مرتبط با قلب و عروق پدید آمده است. این مطالعه به بررسی رشد قلبی عروقی در جنین‌های گورخرماهی یا زبرافیش (*Danio rerio*) و بیان ژن‌های *ApoE*، *Nkx2-5* و *Tbx5* در پاسخ به عصاره تصفیه‌نشده گل گاوزبان پرداخته است. این عصاره از طریق خیساندن با اتانول ۷۰ درصد تهیه شد و جنین‌های گورخرماهی با غلظت‌هایی از ۷/۸ تا ۱۲۵ میکروگرم/میلی‌لیتر از عصاره تیمار شدند. شاخص‌های مورفولوژیکی جنین‌های گورخرماهی، بررسی بافت‌شناسی قلب و بیان ژن‌ها با استفاده از روش Real-time PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که در غلظت‌های پایین تا متوسط (۷/۸ تا ۶۲/۵ میکروگرم/میلی‌لیتر)، عصاره باعث افزایش بیان ژن‌های هدف در جنین‌های گورخرماهی و رشد پیشرفته‌تر قلب شد. در غلظت‌های بالاتر (۱۲۵ میکروگرم/میلی‌لیتر)، جنین‌ها رشد نکردند، دچار انحنای بدنی شدند و نشانه‌هایی از استرس اکسیداتیو نشان دادند. بررسی‌های بافت‌شناسی نشان داد که در غلظت‌های زیر سمی، بافت قلب زبرافیش از نظر ساختار بافتی طبیعی به نظر می‌رسد و هیچ نشانه‌ای از سمیت حاد وجود ندارد. در مجموع، عصاره گل گاوزبان و سایر فرآورده‌های طبیعی ممکن است با افزایش بیان ژن در مراحل جنینی رشد قلب، به عنوان یک منبع طبیعی بالقوه برای پشتیبانی قلبی عروقی عمل کنند. مطالعات آینده باید برای ارزیابی حاشیه ایمنی گل گاوزبان و تأیید اثربخشی آن در مدل‌های بالغ و مطالعات بالینی برنامه‌ریزی شوند.

کلمات کلیدی: گل گاوزبان، جنین گورخرماهی، *Real-time PCR*، *Tbx5*، *ApoE*، *Nkx2-5*

مقدمه

بر اختلال عملکرد اندوتلیال، پراکسیداسیون لیپیدها، التهاب و آترواسکلروز (تشکیل پلاک‌های چربی در رگ‌ها) ایفا می‌شود (۱-۳). در تلاش برای یافتن مداخلات طبیعی و ایمن‌تر، تمرکز فزاینده‌ای بر استفاده از ترکیبات زیست‌فعال گیاهی (مانند فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها) که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و

بیماری‌های قلبی عروقی عامل نزدیک به ۳۰ درصد از مرگ‌ومیرهای جهانی هستند و به این ترتیب، اصلی‌ترین علت مرگ در سراسر جهان محسوب می‌شوند. شواهد قابل‌توجهی وجود دارد که نشان می‌دهد استرس اکسیداتیو یکی از عوامل مهم در بروز بیماری‌های قلبی عروقی است. این نقش از طریق تأثیر

ضدالتهابی هستند، وجود دارد. یکی از گیاهان خاص در این زمینه، گل گاوزبان (*Echium amoenum*) است که سابقه‌ای طولانی در طب سنتی ایرانی دارد و به عنوان گیاهی محافظ عروق و تقویت‌کننده قلب شناخته می‌شود. گلبرگ‌های این گیاه عمدتاً حاوی آنتوسیانین‌ها (نظیر سیانیدین و دلفینیدین) و اسید رزماری هستند (۶-۴). داده‌های برون‌تنی (*in vitro*) شواهدی از اثرات سیتوپروتکتیو (محافظت از سلول‌ها) گل گاوزبان ارائه می‌دهند: صفائیان و همکاران (۲۰۱۵) (۵) گزارش کردند که عصاره‌های غنی از آنتوسیانین گل گاوزبان موجب افزایش زنده‌مانی سلول‌های اندوتلیال ورید نافی انسان (HUVECs) تحت استرس H_2O_2 شدند، سطح هیدروپراکسید را کاهش دادند و ظرفیت آنتی اکسیدانی (FRAP) را افزایش دادند؛ همه این موارد بدون بروز سمیت سلولی تا غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر مشاهده شد. این داده‌ها نشان‌دهنده توان قابل‌توجه عصاره در محافظت از سلول‌های اندوتلیال در شرایط استرس اکسیداتیو هستند. مکانیسم‌های مولکولی به‌ویژه در ارتباط با رشد قلب، هنوز به طور کافی بررسی نشده‌اند. مدل جنینی گورخرماهی یا زیرافیش (*Danio rerio*) یک سیستم تحقیقاتی قدرتمند محسوب می‌شود، زیرا دارای روند رشد شفاف، اندام‌زایی سریع و شباهت ژنتیکی بالایی با انسان (~۷۰ درصد) است. در فاصله‌ی ۴۸ تا ۷۲ ساعت پس از لقاح، قلب این موجود شکل می‌گیرد و این امکان فراهم می‌شود تا رشد قلبی، سمیت‌زایی قلبی یا محافظت قلبی را به‌صورت پویا در این گونه بررسی کنیم (۵-۳، ۷). عوامل رونویسی اصلی قلب که در این بازه زمانی فعال هستند عبارت‌اند از: *Nkx2-5* یک فاکتور رونویسی مهم و محافظت شده است که در مراحل اولیه رشد قلب نقش اساسی دارد. این ژن به عنوان اولین نشانگر سلول‌های پیش‌ساز قلب شناخته می‌شود و در تمایز کاردیومیوسیت‌ها، ساختار قلبی و

سیستم هدایت الکتریکی مؤثر است. *Nkx2-5* با تنظیم ژن‌هایی مانند *GATA4*، *TBX5* و مسیرهای *Wnt*، *BMP* و *Notch* عمل می‌کند. همچنین، مطالعات اخیر نشان داده‌اند که این ژن در بازسازی قلب بالغ پس از آسیب نیز نقش دارد و اختلال در آن موجب کاهش ترمیم و تکثیر سلولی می‌شود (۸، ۹). جهش‌های ژن *Nkx2-5* به‌عنوان یکی از عوامل ژنتیکی مهم در ایجاد نقایص مادرزادی قلبی (مانند نقص‌های دیواره‌ای، اختلالات هدایت الکتریکی و...) شناسایی شده‌اند و بدین ترتیب نقش تعیین‌کننده‌ای در رشد و بیماری‌های قلبی-عروقی ایفا می‌کند. آپولیپوپروتئین E (*ApoE*) یک پروتئین مهم در انتقال لیپیدهاست که نقش تسهیل‌کننده‌ای در پاک‌سازی چربی‌ها ایفا می‌کند. این پروتئین با حذف لیپوپروتئین‌های غنی از تری‌گلیسیرید و کلسترول از گردش خون، به حفظ هموستاز لیپید پلاسما کمک می‌کند. از یک سو، *ApoE* به عنوان گیرنده‌ای مهم برای لیپوپروتئین‌ها در پاک‌سازی چربی‌ها عمل می‌کند و از سوی دیگر، در سلامت عروق نیز نقش دارد؛ این نقش از طریق تنظیم التهاب، خروج کلسترول (cholesterol efflux) و حفظ یکپارچگی اندوتلیال از راه سیگنال‌دهی گیرنده-واسطه انجام می‌شود. کمبود *ApoE* یا داشتن ایزوفرم‌های پرخطر مانند ε4 با افزایش LDL، آترواسکلروز و اختلال عملکرد عروقی مرتبط است (۱۳-۱۰). *Tbx5* یک فاکتور رونویسی مهم از خانواده T-box است که برای مورفوژنز قلب، تشکیل حفره‌های قلبی، سپتاسیون (جدا شدن حفره‌ها) و تشکیل سیستم هدایتی قلب ضروری است. *Tbx5* در مراحل اولیه رشد در نواحی قلب‌ساز اولیه که دهلیزها و بطن‌ها را تشکیل می‌دهند، بیان می‌شود. از بین رفتن ژن *Tbx5a* منجر به نقایص شدید در خم شدن قلب و ساختار حفره‌ای آن می‌شود (فنوتیپ معروف به Heartstring). در پستانداران نیز سلول‌های پیش‌ساز بیان‌کننده *Tbx5* در ساخت میوکارد و بافت هدایتی الکتریکی قلب نقش

مسترمیکس PCR (پارس طوس) استفاده شد. الکتروفورز ژل با استفاده از پودر آگارز و بافر TBE (سینوهه) انجام شده و رنگ‌آمیزی با DNA Green Viewer (پارس طوس) صورت گرفت. در رنگ‌آمیزی بافت شناسی نیز از پارافرمالدئید ۴ درصد، پارافین (سینوهه) و رنگ‌های هماتوکسیلین و اتوزین (سیناکلون) استفاده شد.

تهیه عصاره گیاه گل گاوزبان (*Echium amoenum*):

شکوفه‌های گل گاوزبان ایرانی (*Echium amoenum*) (Fisch. & C.A. Mey) در فصل رشد بهار ۲۰۲۴ از منطقه البرز ایران جمع‌آوری شدند. این گیاه از نظر طبقه بندی، از گروه گیاه شناسی، شناسایی شد و یک نمونه آزمایشی در هرباریوم دانشکده علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران، با شماره آزمایشی PMP/A-347 نگهداری شد. گلبرگ‌ها در دمای اتاق در سایه خشک، آسیاب و به پودر تبدیل شدند و ۱۰ گرم پودر با استفاده از استخراج‌کننده سوکسله با ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد به مدت ۶ ساعت استخراج شد. عصاره با استفاده از دستگاه تبخیر چرخشی در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و فشار کاهش یافته فیلتر و تغلیظ شد. عصاره خام تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. تمام غلظت‌های کاری (۱۵/۶۲ تا ۲۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر) درست قبل از قرار گرفتن در معرض عصاره، به صورت تازه در محیط کشت جنینی E3 تهیه شدند.

نگهداری و جمع‌آوری جنین گورخرماهی: گورخر ماهی‌های بالغ در سیستم پرورش آبزیان با گردش مجدد در دمای ۲۸.۵ درجه سانتی‌گراد و با چرخه نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی نگهداری شدند. جنین‌ها از طریق جفت‌گیری طبیعی به‌دست آمدند و بر اساس معیارهای استاندارد رشد، طبق توصیف Kimmel و همکاران (۱۹) و Westerfield (۲۰) مرحله‌بندی شدند. جنین‌هایی که در مرحله ۲ تا ۴

دارند، بنابراین *Tbx5* برای توسعه ساختاری و عملکرد الکتریکی قلب حیاتی است. اختلال در عملکرد *Tbx5* منجر به نقایص مادرزادی قلبی مانند نقایص دیواره‌ای (سپتوم) و اختلالات در سیستم هدایتی می‌شود (۱۴-۱۶). اختلال در عملکرد هر یک از این ژن‌ها می‌تواند منجر به نقایص مادرزادی قلبی یا افزایش ریسک بیماری‌های قلبی‌عروقی شود (۱۷، ۱۸). هدف این تحقیق، بررسی تأثیرات وابسته به دوز عصاره گل گاوزبان (*Echium amoenum*) بر رشد قلب در جنین گورخرماهی است. این ارزیابی از طریق بررسی بیان ژن‌های *ApoE*، *Tbx5*، *Nkx2-5* با استفاده از روش qRT-PCR انجام می‌شود. همچنین، تعیین دوز کشنده ۵۰ درصد (LD_{50})، پاسخ به استرس اکسیداتیو و بررسی مسیرهای سیگنال دهی مهم قلبی از جمله *Wnt*، *Notch* و *BMP* نیز در این مطالعه مد نظر قرار دارد.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده در این مطالعه شامل گیاهان گل گاوزبان (*Echium amoenum*) و گل میخک (*Eugenia caryophyllata*) از عطاری‌های محلی و گورخرماهی‌های بالغ (*Danio rerio*) از مرکز پرورش ماهیان زینتی بود. جنین‌های زبرا در محیط E3 (پارس طوس) نگهداری و با غذای خشک فلووال و آرتمیا تغذیه شدند. مواد شیمیایی مورد استفاده شامل اتانول ۷۰، ۹۵ و ۱۰۰ درصد، ایزوپروپانول، دی‌متیل سولفوکساید (DMSO)، کلروفرم و زایلن (مرک) بودند. در آزمایش‌های مولکولی از محلول TRIzol (کالازیست)، آب بدون آنزیم RNase (DEPC)، آب دیونیزه و مقطر (سینوهه)، و محلول RNAlater (سیناکلون) استفاده شد. سنتز cDNA با کیت Thermo Scientific و پرایمر رندوم هگزامر (سیناکلون) انجام شد. برای qRT-PCR از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های *ApoE*، *Tbx5*، *Nkx2-5* و *GAPDH* (سیناکلون) و

سه‌تایی اجرا شدند. بیان نسبی ژن نسبت به β -actin نرمال سازی و طبق روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد. **تحلیل آماری:** هر آزمایش در سه تکرار انجام شد. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (SD) بیان شدند. از آنالیز واریانس یک‌طرفه با آزمون تعقیبی توکی برای تعیین معنی‌داری آماری بین گروه‌ها استفاده شد ($p < 0.05$). تمام تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از GraphPad Prism 9.0 انجام شد.

نتایج

برای ارزیابی کمیت و خلوص RNA استخراج‌شده، نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ اندازه‌گیری شد. این نسبت نشان‌دهنده خلوص اسید نوکلئیک است و مقدار مناسب برای RNA بین ۱/۸ تا ۲ در نظر گرفته می‌شود (جدول ۱). عصاره گل گاوزبان در دوزهای پایین تا متوسط هیچ اثر مضر بر مورفولوژی جنین گورخرماهی نشان نداد؛ اما غلظت‌های بالاتر (۶۲/۵ و ۱۲۵ میکروگرم/میلی‌لیتر) باعث تغییراتی مانند انحنای بدن و توقف رشد شدند. این اثرات وابسته به دوز و زمان بودند (شکل ۱). افزایش وابسته به دوز و زمان در مرگ و میر جنین گورخرماهی با عصاره گل گاوزبان مشاهده شد (شکل ۲). مرگ و میر در ۷۲ ساعت با غلظت ۱۲۵ میکروگرم/میلی‌لیتر بیش از ۵۰ درصد بود. بر اساس مدل، LD_{50} ۷۲ ساعته ۱۰۱ میکروگرم/میلی‌لیتر تخمین زده شد. طبق شکل ۳ A بافت قلب گروه کنترل بدون تغییر و بدون هیچ آسیب و التهابی همراه بود، بنابراین نمره آسیب هیستوپاتولوژیک صفر بود. مطابق شکل ۳ B مقطع قلب جنین در گروه کنترل ساختار سالم و منظم با کاردیومیوسیت‌های طبیعی بدون نشانه‌ای از آسیب یا التهاب را نشان داد و با امتیاز صفر آسیب بافتی مطابقت داشت. مطابق شکل ۳ C در مقطع گروه LD_{50} ساختار قلب دچار اختلالاتی مانند کاهش نظم سلولی، افزایش فضای بین‌سلولی و

سلولی قرار داشتند و سالم تشخیص داده شدند، برای تیمار انتخاب شدند. تمامی مراحل آزمایش مطابق با تأییدیه کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تهران انجام گرفت (کد اخلاق: IR.IAU.PS.REC.1402.584).

الگوی تیمار و انتخاب دوزها: جنین‌ها با عصاره *E. amoenum* در غلظت‌های ۱۵/۶۲، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵ و ۲۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر در محیط کشت *E3* که در پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای (۱۰ جنین در هر خانه، ۳ تکرار در هر دوز) چیده شده بود، تیمار شدند و جنین‌های گروه کنترل فقط محیط کشت *E3* را دریافت کردند. جنین‌ها به مدت ۹۶ ساعت پس از کشت در دمای ۲۸/۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و روزانه از نظر مرگ و میر، ناهنجاری و ضربان قلب ارزیابی شدند.

محاسبه دوز کشنده ۵۰ درصد (LD_{50}): بقای جنین هر ساعت پس از مواجهه ارزیابی شد. LD_{50} با استفاده از آنالیز پروبیت بر اساس مقادیر مرگ و میر ۹۶ hpf در غلظت‌های مختلف تعیین شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA: در ۷۲ hpf، کل RNA از ۲۵ جنین جمع‌آوری شده در هر گروه درمانی با استفاده از معرف (Invitrogen) TRIzol® طبق دستورالعمل سازنده استخراج شد. صحت RNA با الکتروفورز ژل آگارز یک درصد تأیید شد و غلظت آن با استفاده از اسپکتروفتومتر NanoDrop تعیین شد. سنتز cdDNA روی ۱ میکروگرم RNA با استفاده از کیت سنتز cDNA رشته اول RevertAid (Thermo Fisher) انجام شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی در زمان واقعی (qRT-PCR): بیان ژن‌های *Nkx2-5*، *Tbx5* و *ApoE* با استفاده از qRT-PCR مبتنی بر SYBR Green ارزیابی شد. پرایمرها با استفاده از Primer-BLAST (NCBI) طراحی و از یک ارائه‌دهنده تجاری سفارش داده شدند. واکنش‌ها در سیستم Bio-Rad CFX96 به صورت

دژنراسیون کاردیومیوسیت‌ها شده است. این تغییرات با امتیازهای آسیب بافتی (دژنراسیون ۳، نکروز ۲، التهاب ۲) مطابقت دارد و نشان دهنده اثرات سمی عصاره در دوز بالا است. مطابق شکل ۳D، در مقطع قلب گروه LD_{50} ، نکروز، دژنراسیون و نواحی التهابی به وضوح مشاهده می‌شود. تخریب کامل کاردیومیوسیت‌ها، از دست رفتن آرایش سلولی و تجمع سلول‌های التهابی نشان دهنده آسیب شدید بافتی است که با امتیازهای ثبت شده (دژنراسیون: ۳، نکروز: ۲، التهاب: ۲) مطابقت دارد. مطابق شکل ۳E، در گروه زیر LD_{50} بافت قلبی دچار دژنراسیون خفیف تا متوسط شده، اما ساختار کلی حفظ شده و نشانه‌ای از نکروز یا التهاب دیده نمی‌شود. این بیانگر آسیب خفیف عصاره در دوزهای زیر LD_{50} است. مطابق شکل ۳F، در گروه زیر LD_{50} ، دژنراسیون خفیف تا متوسط در میوکاردها مشاهده شد، اما بدون نشانه‌ای از نکروز یا التهاب. این تغییرات نشان دهنده اثرات خفیف و غیرکشنده عصاره هستند، درحالی‌که ساختار کلی قلب تا حد زیادی حفظ شده است. آنالیز BLAST نشان داد پرایمرهای طراحی شده اختصاصی هستند و فقط با ژن‌های هدف در ژنوم گورخرماهی هم‌ترازی دارند، بنابراین برای Real-time PCR مناسب و قابل اعتماد هستند (شکل ۴). کیفیت RNA با ژل آگارز ۱/۲ درصد و کمیت آن با نانودراپ بررسی شد. وجود باندهای ۱۸ S و ۲۸ S ریبوزومی نشان دهنده سلامت و عدم تجزیه RNA بود (شکل ۵). بیان ژن‌های LD_{50} و $ApoE$ ، $Tbx5$ در غلظت‌های ۶۲/۵ و عصاره بررسی شد. نتایج با منحنی تکثیر در دستگاه Real-time PCR ثبت و در شکل ۶ نمایش داده شد. افزایش فلورسانس در طول چرخه‌های PCR را نشان می‌دهد که مقدار Ct هر ژن را مشخص می‌کند. یکنواختی منحنی‌ها در تکرارها و نبود سیگنال

غیرطبیعی، صحت واکنش و اختصاصی بودن پرایمرها را تأیید می‌کند. شکل ۷ نمودار مشتق تغییرات فلورسانس بر اساس دما را نشان می‌دهد که برای تأیید اختصاصی بودن تکثیر ژن‌ها استفاده شده است. وجود یک قله مشخص در دمای ثابت نشان دهنده تولید محصول اختصاصی و عدم وجود پرایمر-دایمر یا محصولات غیراختصاصی است. شباهت قله‌ها در نمونه‌ها بیانگر دقت و تکرارپذیری بالای واکنش PCR می‌باشد. شکل ۸ بیان ژن $ApoE$ را در گروه‌های تیماری مختلف نشان می‌دهد. در غلظت زیر LD_{50} ، افزایش معناداری در بیان ژن نسبت به کنترل مشاهده شد ($p < 0/0001$)، اما در گروه LD_{50} کاهش نسبی دیده شد که از نظر آماری معنادار نبود. این نتایج نشان می‌دهد غلظت‌های پایین عصاره موجب افزایش بیان $ApoE$ می‌شوند، در حالی‌که دوزهای بالاتر ممکن است اثر مهارکننده داشته باشند. شکل ۹ نشان می‌دهد که بیان ژن $Tbx5$ در گروه زیر LD_{50} به طور معناداری افزایش یافته است ($p < 0/0001$)، درحالی‌که در گروه LD_{50} کاهش چشمگیری داشته و پایین‌تر از هر دو گروه دیگر بوده است ($p < 0/0001$). این یافته‌ها بیانگر حساسیت بالای $Tbx5$ به دوز عصاره هستند؛ به طوری‌که دوز پایین بیان را افزایش و دوز بالا آن را به طور قابل توجهی کاهش داده است. بر اساس شکل ۱۰، بیان ژن $Nkx2-5$ در گروه زیر LD_{50} به طور معناداری افزایش یافته است ($p < 0/0001$)، درحالی‌که در گروه LD_{50} کاهش قابل توجهی نشان داده است ($p < 0/0001$). این نتایج نشان می‌دهد که دوز پایین عصاره بیان این ژن را تحریک و دوز بالا آن را سرکوب می‌کند، که بیانگر حساسیت ژن $Nkx2-5$ به دوز و استرس محیطی است و احتمالاً در مسیرهای تکوینی قلب نقش دارد.

جدول ۱- بررسی کمیت RNA استخراج شده با استفاده از نانودراپ

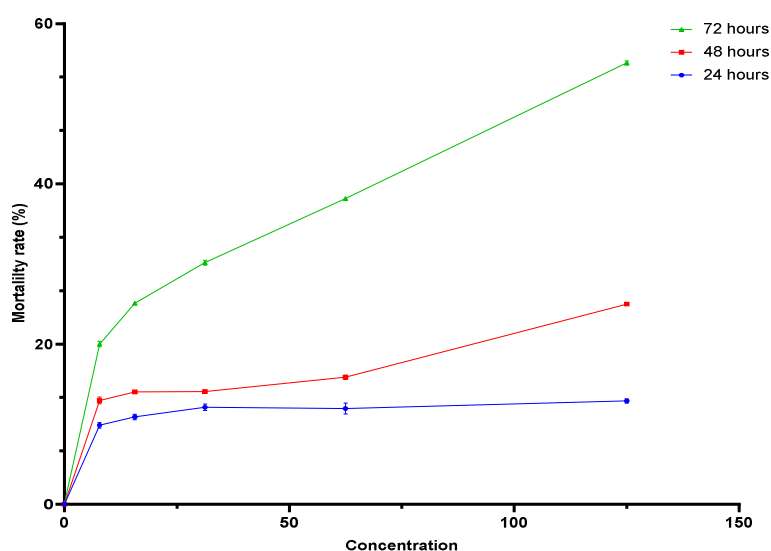
Table 1. Quantification of extracted RNA using Nanodrop

Sample	Concentration($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	OD (260/280)
E	142.253	2.773
F	223.293	2.607
G	148.093	2.219
H	134.813	2.466



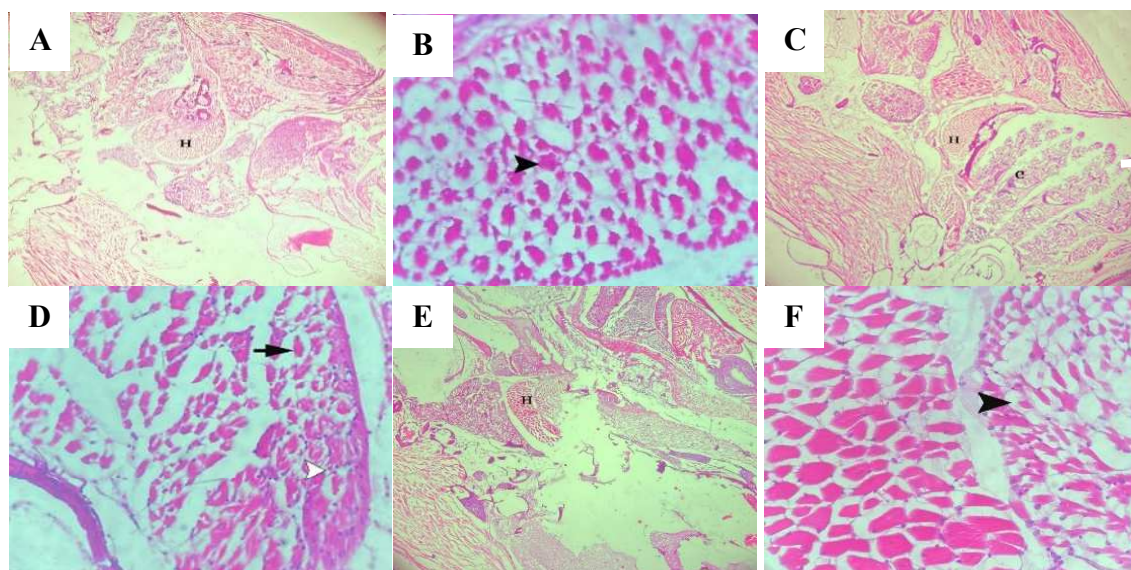
شکل ۱- ویژگی‌های مورفولوژیکی جنین گورخرماهی پس از در معرض قرار گرفتن با عصاره *Echium amoenum*

Fig 1. Morphological characteristics of zebrafish embryos after exposure to *Echium amoenum* extract.



شکل ۲- میزان مرگ و میر در جنین گورخرماهی پس از تیمار در غلظت‌های مختلف با عصاره *Echium amoenum*

Fig 2. Mortality rate in zebrafish embryos after treatment with different concentrations of *Echium amoenum* extract



شکل ۳- A. مقطع قلب گورخرمایی در گروه کنترل، B. مقطع قلب در گروه کنترل که میوکاردهای نرمال دیده می‌شود، C. مقطع قلب گورخرمایی در گروه *LD50* که مقاطع آبشش و قلب دیده می‌شود، D. مقطع قلب در گروه *LD50*، E. مقطع گورخرمایی در گروه کمتر از *LD50*، F. مقطع قلب در گروه کمتر از *LD50*.

Fig 3. A. Cross-section of zebrafish heart in the control group B. Cross-section of the heart in the control group showing normal myocardium. C. Cross-section of zebrafish heart in the *LD50* group showing gills and heart. D. Cross-section of the heart in the *LD50* group. E. Cross-section of zebrafish in the less than *LD50* group. F. Cross-section of the heart in the less than *LD50* group.

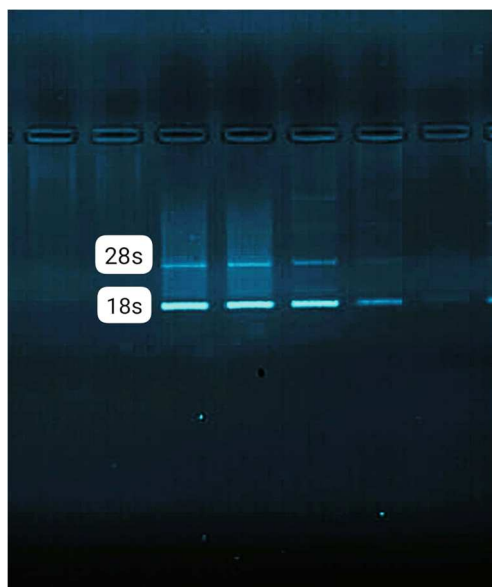
Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	ATGCCATCCGGATCCTCTCT	20	60.18	55.00	8.00	0.00
Reverse primer	COCAGGCTAGGTGTTGTAGG	20	60.11	60.00	2.00	0.00
Products on target templates						
>NM_131421.2 Danio rerio NK2 homeobox 5 (nkx2.5), mRNA						
product length = 582						
Forward primer	1 ATGCCATCCGGATCCTCTCT 20					
Template	276 295					
Reverse primer	1 CGCAGGCTAGGTGTTGTAGG 20					
Template	857 838					

Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CAAAATGGTCTGTGACGGGA	20	59.96	55.00	3.00	0.00
Reverse primer	TGTGTGTTCTGTGTAGGAGC	20	59.97	55.00	2.00	0.00
Products on target templates						
>XM_021475995.1 PREDICTED: Danio rerio T-box 5a (tbx5a), transcript variant X1, mRNA						
product length = 592						
Forward primer	1 CAAATGGTCTGTGACGGGA 20					
Template	467 486					
Reverse primer	1 TGTGTGTTCTGTGTAGGAGC 20					
Template	1058 1039					

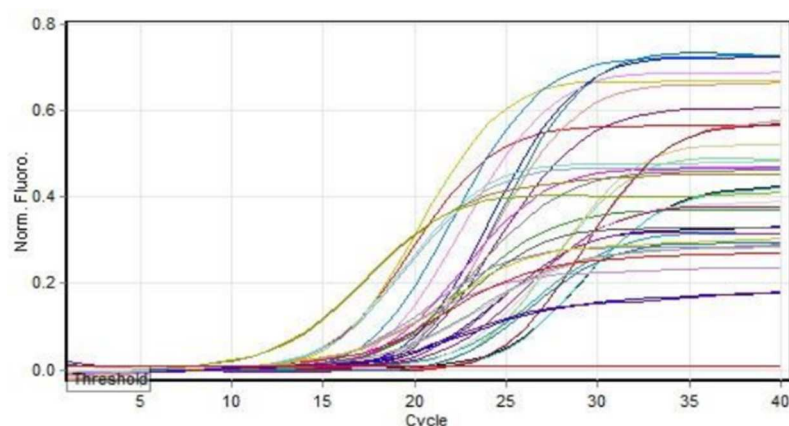
Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TGCTGTACACACAGAGAGG	20	59.97	55.00	8.00	0.00
Reverse primer	TGGAAGGCGGTTTGTGCTT	20	60.11	50.00	3.00	0.00
Products on target templates						
>XM_056476229.1 PREDICTED: Danio aesculapii apolipoprotein C-I (apoc1), transcript variant X1, mRNA						
product length = 120						
Forward primer	1 TGCTGTACACACAGAGAGG 20					
Template	149 168					
Reverse primer	1 TGGAAGGCGGTTTGTGCTT 20					
Template	268 249					

شکل ۴- Blast پرایمر های طراحی شده: A: *Nkx2-5*، B: *Tbx5* و C: *ApoE*

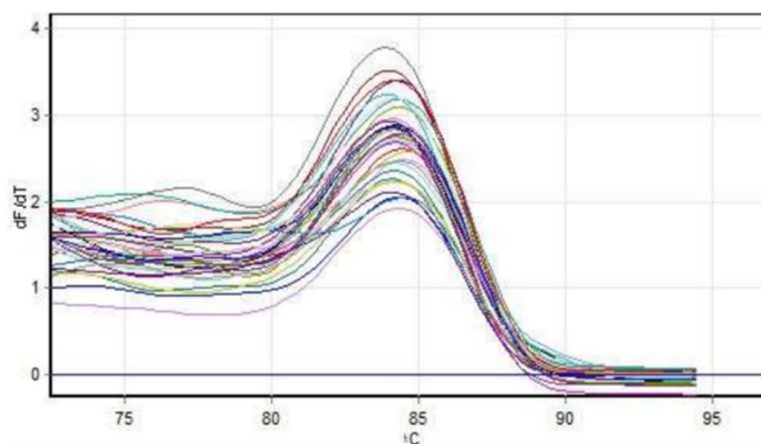
Fig 4. Blast primers designed: A: *Nkx2-5*, B: *Tbx5* and C: *ApoE*



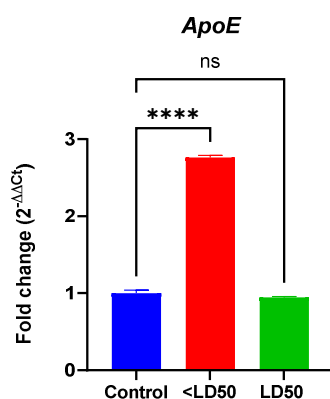
شکل ۵- باندهای حاصل از استخراج RNA بر روی ژل الکتروفورز
Fig 5. Bands from RNA extraction on gel electrophoresis



شکل ۶- منحنی تکثیر ژن‌های *Tbx5* و *Nkx2-5*, *ApoE*
Fig 6. Proliferation curve of *Nkx2-5*, *ApoE* and *Tbx5* genes

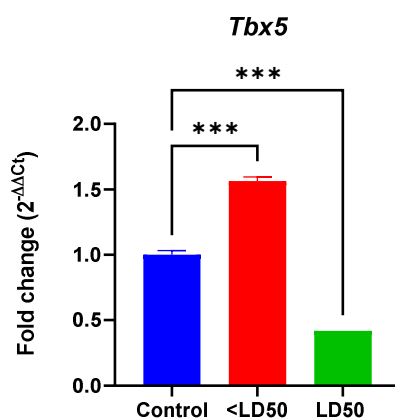


شکل ۷- منحنی ذوب ژن‌های *Tbx5* و *ApoE*, *Nkx2-5* پس از انجام واکنش qPCR
Fig 7. Melting curve of *Nkx2-5*, *ApoE* and *Tbx5* genes after qPCR reaction



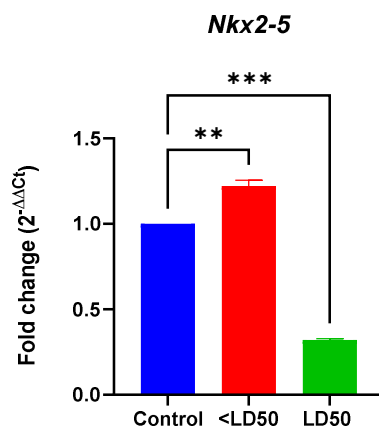
شکل ۸- تغییرات بیان ژن *ApoE* تحت تأثیر تیمار با غلظت‌های مختلف، ۶۲/۵ و ۱۰۱ میکروگرم/میلی‌لیتر

Fig 8. Changes in *ApoE* gene expression under the influence of treatment with different concentrations, 62.5 and 101 micrograms/ml



شکل ۹- تغییرات بیان ژن *Tbx5* تحت تأثیر تیمار با غلظت‌های مختلف، ۶۲/۵ و ۱۰۱ میکروگرم/میلی‌لیتر

Fig 9. Changes in *Tbx5* gene expression under the influence of treatment with different concentrations, 62.5 and 101 micrograms/ml



شکل ۱۰. تغییرات بیان ژن *Nkx2-5* تحت تأثیر تیمار با غلظت‌های مختلف، ۶۲/۵ و ۱۰۱ میکروگرم/میلی‌لیتر

Fig 10. Changes in *Nkx2-5* gene expression under the influence of treatment with different concentrations, 62.5 and 101 μ g/ml

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که غلظت‌های پایین‌تر این عصاره به طور معنی‌داری بیان ژن‌های کلیدی *Nkx2-5*، *Tbx5* و *ApoE* را افزایش می‌دهد (۲۱). *Nkx2-5* و *Tbx5* از مهم‌ترین فاکتورهای رونویسی در تکوین قلب هستند؛ افزایش بیان آن‌ها احتمالاً بیانگر تحریک روند تمایز کاردیومیوست‌ها و پیشبرد شکل‌گیری ساختارهای قلبی است (۲۲). به علاوه، *ApoE* نیز که در متابولیسم لیپید و انتقال چربی‌ها نقش دارد، در حضور عصاره افزایش بیان نشان داد. افزایش *ApoE* می‌تواند حاکی از بهبود توان انتقال لیپید از زرده به رویان و تنظیم بهتر متابولیسم چربی طی رشد باشد (۲۳). تأمین مناسب لیپید و کلسترول برای رشد قلبی عروقی مهم است و شاید در برخی موارد از تغییرات نامطلوب جلوگیری کند. برعکس، قبلاً نشان داده شده است که بیان پایین *Nkx2-5* با ناهنجاری‌های قلبی عروقی همراه است (۲۴)؛ بنابراین، مشاهده افزایش بیان این ژن‌ها در حضور عصاره *E. amoenum*، نشان‌دهنده تأثیر حمایتی و تقویت‌کننده بر رشد طبیعی قلب است. در مقابل، اثر عصاره به غلظت عصاره بستگی داشت و در غلظت‌های بالا (بیشتر از ۶۲/۵ میکروگرم/میلی‌لیتر)، افزایشی در بیان مشاهده نشد و بیان ژن‌ها همراه با وقوع ناهنجاری‌های مورفولوژیکی و مرگ و میر بیشتر جنین کاهش یافت. این داده‌ها نشان می‌دهد که محدوده دوز مؤثر و اثر دوجهی (هورمیک) عصاره، بین ۰ تا ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر است. آزمایشات نشان داد که دوزهایی که کم در نظر گرفته می‌شوند، ظاهراً فعالیت تحریکی و مفید دارند، درحالی‌که دوزهای بالا ظاهراً اثر مهاری یا سمی بر رشد قلب دارند. با این حال، در نوزاد گورخرماهی که با دوز ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر، که معادل LD₅₀ (حدود ۱۰۱ میکروگرم/میلی‌لیتر) است، دوز داده شده بود، هم سمیت قلبی تأیید نشد و هم بافت‌شناسی هیچ تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل

نشان نداد. تنها تغییر جزئی در این غلظت، واکوئله شدن برخی سلول‌ها بود که می‌تواند نشانگر آغاز استرس سلولی در دوزهای بالا باشد. روی هم رفته، عدم مرگ بافت قلبی در دو دوز متوسط نشان می‌دهد که عصاره *E. amoenum* می‌تواند اثرات مطلوب خود را تا حدی بدون ایجاد سمیت ساختاری اعمال کند. با این وجود، در دوزهای بالاتر باید احتیاط شود. گزارش شده است که مقادیر زیاد این گیاه باعث عوارض جانبی (مانند سمیت خونی و آسیب گلبول‌های قرمز) می‌شود (۲۵). پیکروزید (ترکیبات فنلی) و عملکرد آنتی‌اکسیدانی معمولاً به سطوح بالای آنتوسیانین‌های این گیاه (یعنی سیانیدین و دلفینیدین) نسبت داده می‌شود (۵). اکسیداسیون بیش از حد، رشد قلب را مختل کرده و باعث آسیب بافتی می‌شود. بنابراین، در دسترس بودن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در محیط جنینی احتمالاً از، از دست دادن بیان ژن‌های حیاتی جلوگیری کرده و پارامترهای مناسب‌تری را برای فعالیت مسیرهای سیگنالینگ رشد ایجاد می‌کند. پیش تیمار سلول‌های اندوتلیال با عصاره غنی از آنتوسیانین *E. amoenum* به طور قابل توجهی پراکسیدهای داخل سلولی و خارج سلولی را کاهش می‌دهد، درحالی‌که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (FRAP) را نیز بهبود می‌بخشد (۵). مواد مؤثر این گیاه می‌توانند وضعیت اکسیداتیو سلول‌ها را به نفع ترمیم فیزیولوژیکی و پسرقت مرگ سلولی تعدیل کنند. عصاره این گیاه بیان آنزیم‌های التهابی *iNOS* و *COX-2* و همچنین سیتوکین‌های پیش‌التهابی مانند $TNF-\alpha$ ، $IL-1\beta$ و $IL-6$ را در ماکروفاژهای تحریک شده مهار می‌کند (۲۶). مهار التهاب در محیط جنینی می‌تواند آسیب التهابی به بافت‌های در حال رشد را کاهش داده و روند طبیعی رشد قلب را حفظ کند. بنابراین، افزایش بیان ژن‌های *Nkx2-5* و *Tbx5* توسط عصاره ممکن است از طریق کاهش سیگنال‌های مهاری

ناشی از استرس اکسیداتیو/التهابی که به طور معمول این ژن‌ها را مهار می‌کنند، ایجاد شود. جدا از خواص آنتی اکسیدانی مستقیم، عصاره *E. amoenum* احتمالاً بر مسیرهای مولکولی که واسطه رشد قلب هستند، تأثیر می‌گذارد. به عنوان مثال، ترکیب پلی فنولی رسوراترول با فعال کردن مسیر دفاعی آنتی اکسیدانی Nrf2 و در عین حال مهار مسیرهای سمی، از نقص های قلبی ناشی از سم در جنین‌های گورخرماهی محافظت می‌کند (۲۷). آنتوسیانین‌های موجود در گل گاوزبان نیز ممکن است مسیرهای مشابهی را آغاز کنند. به عبارت دیگر، این ترکیبات می‌توانند با تحریک فاکتورهای رونویسی تقویت‌کننده بقای سلولی (مانند Nrf2) بیان ژن‌های محافظ قلب را افزایش دهند و همزمان مسیرهای مضر مانند فعالیت بیش از حد فاکتورهای التهابی را مهار کنند. نتیجه نهایی این تنظیم دو مرحله‌ای، هم تقویت برنامه ژنتیکی رشد قلب و هم افزایش یکپارچگی ساختاری-عملکردی قلب جنین است. نتایج این مطالعه با مطالعات قبلی در مورد پیامدهای قلبی عروقی عصاره‌های گیاهی غنی از آنتی اکسیدان مطابقت دارد. از دیرباز گل گاوزبان برای بیماری‌های قلبی و اختلالات گردش خون مورد استفاده قرار گرفته است و از آن زمان تاکنون برخی از تحقیقات فراتر از توصیف خواص آن پرداخته‌اند (۲۶). به عنوان مثال، آنتوسیانین‌های موجود در انواع توت‌ها (مانند زغال‌اخته) از طریق مدل‌های حیوانی و با تعدیل بیان ژن‌های دخیل در استرس اکسیداتیو، التهاب و رگ‌زایی، اثرات ضد تصلب شرایین را نشان داده‌اند (۲۸). در موش‌های فاقد ژن *ApoE*، مکمل آنتوسیانین زغال‌اخته توانست بیان صدها ژن را در آنورت تعدیل کرده و پیشرفت تصلب شرایین را کند نماید (۲۸). این تغییرات شامل کاهش بیان آنزیم‌های اکسیداتیو (مانند *Aox1*، *Cyp2e1*) و چسبندگی سلولی (مانند Jam-A) و افزایش بیان ژن‌های اتصال بین سلولی بود که همگی نشان دهنده

تشکیل یک محیط ضد التهابی و عاری از استرس اکسیداتیو در دیواره رگ بودند (۲۸). اگرچه مدل ما ممکن است متفاوت باشد (یعنی رشد جنینی)، افزایش بیان ژن‌های *Nkx2-5*، *Tbx5* و *ApoE* با عصاره گل گاوزبان ممکن است بخشی از همان پاسخ محافظتی قلبی عروقی مرتبط با فعالیت ترکیبات آنتی اکسیدانی/ضد التهابی باشد. برعکس، نتایج ما از این واقعیت پشتیبانی می‌کند که عصاره‌های غنی از پلی فنول نه تنها در پیشگیری از بیماری‌های قلبی در بزرگسالان مفید هستند، بلکه می‌توانند نقش مثبتی در مسیرهای رشد قلبی در مراحل جنینی داشته باشند. مطالعه لی و همکاران (۲۹) نشان داد که ترکیبات غیراساسی اسطوخودوس در مدل آلزایمر گورخرماهی باعث بهبود علائم از طریق مسیرهای التهابی و متابولیکی شدند. مطالعه حاضر اثرات عصاره *Echium amoenum* را بر تکامل قلب جنین بررسی کرد. هر دو مطالعه کارایی مدل زبرا را در غربالگری دارویی و نقش دوزمحور ترکیبات طبیعی در بهبود عملکرد اندام‌ها تأیید می‌کنند. عصاره جینکو بیلوبا در دوزهای پایین برای جنین‌های گورخرماهی بی‌خطر بود، اما دوز عصاره مضر بود و منجر به کاهش بقا و رشد شد. دوزهای پایین/متوسط رشد را افزایش می‌دهند، سپس با دوزهای بالا رشد کاهش می‌یابد (۳۰). هم شیائویان و همکارانش و هم مطالعه ما تأیید کردند که اثربخشی و سمیت عصاره‌های گیاهی هر دو به دوز و میلی-گرم/لیتر مواد مؤثر اولیه عصاره‌ها وابسته هستند. در مطالعه حاضر، عصاره‌های غلیظ شده با دوزهای پایین گل گاوزبان، بیان قلبی را افزایش داده و از بافت محافظت کردند، در حالی که غلظت‌های بالای عصاره اثر معکوس داشتند و باعث آسیب و کاهش بیان ژن شدند. این امر منجر به این نتیجه می‌شود که برای به دست آوردن فواید درمانی یک عصاره گیاهی، باید دوز و میلی‌گرم/لیتر بهینه از مواد مؤثر نیز تعریف شود.

Need for Scalable and Sustainable Frameworks. *Glob Heart*. 2022;17(1):48.

3. Jin J, Boersch M, Nagarajan A, Davey AK, Zunk M. Antioxidant Properties and Reported Ethnomedicinal Use of the Genus *Echium* (Boraginaceae). *Antioxidants* (Basel). 2020;9(8):722.

4. Liu C, Huang Y. Chinese Herbal Medicine on Cardiovascular Diseases and the Mechanisms of Action. *Front Pharmacol*. 2016;7:469.

5. Safaeian L, Haghjoo Javanmard S, Ghanadian M, Seifabadi S. Cytoprotective and antioxidant effects of *Echium amoenum* anthocyanin-rich extract in human endothelial cells (HUVECs). *Avicenna J Phytomed*. 2015;5(2):157-66.

6. Jafari H, Mokaberinejad R, Raeis-Abdollahi E. *Echium amoenum* from viewpoint of Avicenna: a brief review. *Journal of Contemporary Medical Sciences*. 2018;4(4):187-90.

7. Pena-Martinez EG, Pomales-Matos DA, Rivera-Madera A, Messon-Bird JL, Medina-Feliciano JG, Sanabria-Alberto L, et al. Prioritizing cardiovascular disease-associated variants altering NKX2-5 and TBX5 binding through an integrative computational approach. *J Biol Chem*. 2023;299(12):105423.

8. Colombo S, de Sena-Tomas C, George V, Werdich AA, Kapur S, MacRae CA, et al. Nkx genes establish second heart field cardiomyocyte progenitors at the arterial pole and pattern the venous pole through Isl1 repression. *Development*. 2018;145(3).

9. De Sena-Tomas C, Aleman AG, Ford C, Varshney A, Yao D, Harrington JK, et al. Activation of Nkx2.5 transcriptional program is required for adult myocardial repair. *Nat Commun*. 2022;13(1):2970.

10. Alagarsamy J, Jaeschke A, Hui DY. Apolipoprotein E in Cardiometabolic and Neurological Health and Diseases. *Int J Mol Sci*. 2022;23(17).

11. Islam S, Noorani A, Sun Y, Michikawa M, Zou K. Multi-functional role of apolipoprotein E in neurodegenerative diseases. *Front Aging Neurosci*. 2025;17:1535280.

12. Ismail AB, Balcioglu O, Ozcem B, Ergoren MC. APOE Gene Variation's Impact on

نتیجه‌گیری

عصاره گل گاوزبان در دوزهای کم تا متوسط (۷/۸-۶۲/۵ میکروگرم/میلی‌لیتر) اثرات مثبتی بر رشد قلبی عروقی جنین‌های گورخرماهی دارد. تعیین توالی رونوشت‌ها نشان داد که تجزیه و تحلیل PCR افزایش قابل توجهی در بیان *Tbx5* و *ApoE*، *Nkx2-5* گروه‌های تحت درمان در مقایسه با گروه کنترل نشان داد. *Tbx5* و *ApoE*، *Nkx2-5* تنظیم‌کننده‌های رونویسی برای تمایز کاردیومیوسیت‌ها، حفرات قلب و متابولیسم لیپید هستند که نشان می‌دهد این عصاره مسیرهای مولکولی لازم برای رشد قلب را تحریک می‌کند. در دوزهای زیر کشنده، بافت قلب هیچ آسیب ساختاری آشکاری نشان نداد و معماری طبیعی خود را حفظ کرد. اگرچه عصاره گل گاوزبان اثرات مفید و رشدی را در غلظت‌های پایین نشان می‌دهد، اما این رشد احتمالاً در نتیجه استرس اکسیداتیو و اختلال در متابولیسم دوزهای بالاتر به اوج خود می‌رسد و به چیزی کشنده تبدیل شود. مدل جنین گورخرماهی به دلیل اندازه کوچک، ماهیت شفاف، رشد سریع و توانایی انجام ژنوتیپینگ و ارزیابی‌های بافت‌شناسی، مدل بسیار خوبی برای غربال‌گری محصولات طبیعی است.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از دانشکده علوم دارویی دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران که امکان انجام این پژوهش را فراهم کرده‌است (کد رهگیری پایان‌نامه: ۱۶۲۸۱۰۷۱۳)، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs). 2021 [Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))] (Accessed 2 July 2025).

2. Mendis S, Graham I, Narula J. Addressing the Global Burden of Cardiovascular Diseases;

- GATA4, and TBX5 in congenital heart disease: multiple heterozygosity and novel mutations. *Congenit Heart Dis*. 2012;7(2):151-9.
23. Otis JP, Zeituni EM, Thierer JH, Anderson JL, Brown AC, Boehm ED, et al. Zebrafish as a model for apolipoprotein biology: comprehensive expression analysis and a role for ApoA-IV in regulating food intake. *Dis Model Mech*. 2015;8(3):295-309.
24. Li S, Li X, Zhao R, Jiang T, Ou Q, Huang H, et al. Esketamine induces embryonic and cardiac malformation through regulating the *nkx2.5* and *gata4* in zebrafish. *Sci Rep*. 2025;15(1):7187.
25. Sadighara P, Araghi A, Tajdar-Oranj B, Peivasteh-roudsari L, Mohajer A, Behzadi R. The Effect of Borage (*Echium amoenum*) on the Mouse Heart and Hematology Parameters. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2019;19(2):154-9.
26. Naseri N, Kalantar K, Amirghofran Z. Anti-inflammatory activity of *Echium amoenum* extract on macrophages mediated by inhibition of inflammatory mediators and cytokines expression. *Res Pharm Sci*. 2018;13(1):73-81.
27. Huang Y, Xia Y, Tao Y, Jin H, Ji C, Aniagu S, et al. Protective effects of resveratrol against the cardiac developmental toxicity of trichloroethylene in zebrafish embryos. *Toxicology*. 2021;452:152697.
28. Mauray A, Felgines C, Morand C, Mazur A, Scalbert A, Milenkovic D. Bilberry anthocyanin-rich extract alters expression of genes related to atherosclerosis development in aorta of apo E-deficient mice. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2012;22(1):72-80.
29. Li M, Cao X, Yan H, Wang M, Tashibolati A, Maiwulanjiang M. Integrating Zebrafish Model to Screen Active Ingredients and Network Pharmacology Methods to Explore the Mechanism of *Lavandula angustifolia* Therapy for Alzheimer's Disease. *ChemistrySelect*. 2022;7(28):e202201364.
30. Xiaoyan L, Li C, Liu T, Ke H, Gong X, Wang Q, et al. Chemical analysis, pharmacological activity and process optimization of the proportion of bilobalide and ginkgolides in *Ginkgo biloba* extract. *J Pharm Biomed Anal*. 2018;160:46-54.
- Cardiovascular Health: A Case-Control Study. *Biomedicines*. 2024;12(3):695.
13. Mahley RW. Apolipoprotein E: from cardiovascular disease to neurodegenerative disorders. *J Mol Med (Berl)*. 2016;94(7):739-46.
14. Li Y, Du J, Deng S, Liu B, Jing X, Yan Y, et al. The molecular mechanisms of cardiac development and related diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2024;9(1):368.
15. Pezhouman A, Nguyen NB, Serce AJ, Nguyen TL, Daraei A, Sabri S, et al. Transcriptional, Electrophysiological, and Metabolic Characterizations of hESC-Derived First and Second Heart Fields Demonstrate a Potential Role of TBX5 in Cardiomyocyte Maturation. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:787684.
16. Siatra P, Vatsellas G, Chatzianastasiou A, Balafas E, Manolakou T, Papapetropoulos A, et al. Return of the *Tbx5*; lineage-tracing reveals ventricular cardiomyocyte-like precursors in the injured adult mammalian heart. *NPJ Regen Med*. 2023;8(1):13.
17. Garcia-Flores E, Rodriguez-Perez JM, Borgonio-Cuadra VM, Vargas-Alarcon G, Calderon-Colmenero J, Sandoval JP, et al. DNA Methylation Levels of the TBX5 Gene Promoter Are Associated with Congenital Septal Defects in Mexican Paediatric Patients. *Biology (Basel)*. 2022;11(1):96.
18. McElhinney DB, Geiger E, Blinder J, Benson DW, Goldmuntz E. NKX2.5 mutations in patients with congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42(9):1650-5.
19. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*. 1995;203(3):253-310.
20. Westerfield M. *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio Rerio)*: University of Oregon Press; 2000.
21. Chahardehi AM, Arsad H, Lim V. Zebrafish as a Successful Animal Model for Screening Toxicity of Medicinal Plants. *Plants (Basel)*. 2020;9(10).
22. Granados-Riveron JT, Pope M, Bu'lock FA, Thornborough C, Eason J, Setchfield K, et al. Combined mutation screening of NKX2-5,