

Effect of Continuous Aerobic Exercise on Bax/ Bcl-2 Ratio and Doxorubicin-induced Liver Toxicity in Aging model Rats

Minoo Dadban Shahamat¹,

Valiollah Dabidi Roshan²,

Touraj Farazmandfar³

¹ PhD Student, Department of Physical Education, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran

² Professor, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, Mazandaran University, Babolsar, Iran

³ Assistant Professor, Medical Cellular and Molecular Research Center, Department of Molecular Medicine, Faculty of Advanced Medical Technologies, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

(Received November 19, 2017 ; Accepted June 20, 2018)

Abstract

Background and purpose: One of the main issues in cancer treatment is to reduce the side effects of drugs on healthy tissues. The aim of this study was to investigate the preventative effects of continuous aerobic exercise on apoptosis ratio and liver fibrosis induced by doxorubicin in aging rats.

Materials and methods: In this experimental research, 42 adult Wistar rats were randomly divided into 6 groups (n= 7), including the Young, Aged, Aged+ Saline, Aged+ Dox, Aged+ Exercise+ Saline, and Aged+ Exercise+ Dox. The training groups practiced on treadmill while considering the principle of overload (five sessions per week/ six weeks). On the last 15 days of exercise, doxorubicin or saline solution were injected (1 mg/kg/daily). Then, 48 hours after completing the trainings, liver tissue sampling was performed to evaluate the fibrosis and expression of Bax and Bcl-2 proteins. Data analysis was done using One-way ANOVA at a significant level of $P \leq 0.05$.

Results: Doxorubicin caused a significant increase in liver fibrosis, expression of Bax protein and Bax/Bcl-2 ratio, and a significant reduction in expression of Bcl-2 protein ($p \leq 0.05$). On the other hand, aerobic training significantly reduced the expression of Bax protein, Bax/Bcl-2 ratio and hepatic fibrosis, and significantly increased the expression of Bcl-2 protein ($p \leq 0.05$).

Conclusion: Continuous aerobic exercises, reduce the Bax/Bcl-2 ratio which is an indicator of increase in survival rate and also reduce liver fibrosis against doxorubicin.

Keywords: aerobic training, doxorubicin, liver toxicity, Bax protein, Bcl2 protein, aging

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 28 (165): 36-46 (Persian).

* **Corresponding Author:** Valiollah Dabidi Roshan- Faculty of Physical Education and Sports Sciences, Mazandaran University, Babolsar, Iran (E-mail: v.dabidi@umz.ac.ir)

بررسی تاثیر تمرین هوازی تداومی بر نسبت Bax/Bcl-2 و سمیت کبدی ناشی از دوکسوروبیسین در رت‌های مدل سالمندی

مینو دادبان شهامت^۱ولی اله دیدی روشن^۲تورج فرازمندفر^۳

چکیده

سابقه و هدف: یکی از نکات مهم در درمان سرطان، کاهش عوارض داروهای آن بر بافت‌های سالم بدن می‌باشد؛ بنابراین هدف این پژوهش، بررسی اثرات پیشگیرانه تمرین هوازی تداومی بر میزان آپوپتوز و فیروز کبدی ناشی از القای داروی دوکسوروبیسین در رت‌های مدل سالمندی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۴۲ سر رت نژاد ویستار، به‌طور تصادفی در شش گروه (n=۷) شامل: جوان، سالمند، سالمند+سالین، سالمند+دوکسوروبیسین، سالمند+تمرین+سالین و سالمند+تمرین+دوکسوروبیسین قرار گرفتند. گروه‌های تمرینی، روی نوارگردان با رعایت اصل اضافه بار، پنج جلسه در هفته و به مدت شش هفته تمرین کردند. ۱۵ روز پایانی تمرین، تزریق دوکسوروبیسین یا محلول سالین، با دوز روزانه ۱ میلی گرم/کیلوگرم انجام گرفت. ۴۸ ساعت پس از پایان تمرین، بافت‌برداری از کبد جهت ارزیابی فیروز و بیان پروتئین‌های Bax و Bcl-2 انجام شد. داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه در سطح معنی‌داری (p≤۰/۰۵) آنالیز شدند.

یافته‌ها: تزریق دوکسوروبیسین سبب افزایش معنی‌دار فیروز کبدی، بیان پروتئین Bax و نسبت Bax/Bcl-2 و کاهش معنی‌دار بیان پروتئین Bcl-2 شد (p≤۰/۰۵). هم‌چنین، تمرین هوازی سبب کاهش معنی‌دار بیان پروتئین Bax، نسبت Bax/Bcl-2 و فیروز کبدی و افزایش معنی‌دار بیان پروتئین Bcl-2 شد (p≤۰/۰۵).

استنتاج: تمرین هوازی تداومی، باعث کاهش نسبت Bax/Bcl-2، که شاخصی از افزایش میزان بقا می‌باشد و نیز کاهش فیروز کبدی در مقابل دوکسوروبیسین می‌شود.

واژه‌های کلیدی: تمرین هوازی، دوکسوروبیسین، سمیت کبدی، پروتئین Bax، پروتئین Bcl-2، سالمندی

مقدمه

سرطان، یکی از علل عمده مرگ و میر در جهان است (۱)؛ اما با این حال، میزان بقای افراد پس از تشخیص بیماری افزایش یافته (۲) که راهکارهای کاهش عوارض داروهای درمانی، یکی از دلایل آن می‌باشد. دوکسوروبیسین^۱، یکی از داروهای شیمی درمانی است که برای درمان برخی تومورهای بدخیم مورد استفاده

سرطان، یکی از علل عمده مرگ و میر در جهان است (۱)؛ اما با این حال، میزان بقای افراد پس از تشخیص بیماری افزایش یافته (۲) که راهکارهای کاهش

1. Doxorubicin (DOX)

E-mail: v.dabidi@umz.ac.ir

مؤلف مسئول: ولی اله دیدی روشن - بابلر: پردیس دانشگاه، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی

۱. دانشجوی دکتری، گروه تربیت بدنی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران

۲. استاد، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی، دانشگاه مازندران، بابلر، ایران

۳. استادیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی پزشکی، گروه پزشکی مولکولی، دانشکده فناوری‌های نوین در علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۸/۲۷ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۶/۹/۵ تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۳/۳۰

قرار می‌گیرد (۳، ۴). داروی دوکسوروبیسین نه تنها سلول‌های سرطانی، بلکه سلول‌های سالم را هدف قرار داده و باعث سمیت در بافت کبد (۷-۵) و بافت‌های حساس دیگر می‌شود (۸، ۹). نتایج بسیاری از پژوهش‌ها حاکی از ایجاد سمیت کبدی توسط دوکسوروبیسین از طریق افزایش بیش از حد آنزیم‌های کبدی (۵)، افزایش رادیکال‌های آزاد و القای آپوپتوز (۱۰، ۱۱) و یا مسیرهای دیگر می‌باشد (۷).

آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، روشی فیزیولوژیک برای از بین بردن سلول‌های آسیب دیده یا پیر و هموستاز بافتی می‌باشد که از دو مسیر بیرونی^۲ و درونی^۳ اتفاق می‌افتد (۱۲). مشخص شده است که دوکسوروبیسین، عمدتاً از مسیر داخلی سبب القای آپوپتوز می‌شود (۱۵-۱۳). مسیر داخلی، از طریق سیگنال‌هایی همچون رادیکال‌های آزاد، در درون سلول آغاز شده و به واسطه پروتئین‌های خانواده Bcl-2 موجود در غشای خارجی میتوکندری، اتفاق می‌افتد (۱۲). از دیگر سو، سالمندی می‌تواند سیستم اکسایشی / ضد اکسایشی بدن را تحت تأثیر قرار دهد (۱۶، ۱۷). ازدیاد سن، سبب تغییرات فیزیولوژیکی در بدن می‌شود که منجر به کاهش توانایی فرد در متابولیسم کردن دارو و حذف آن می‌شود. کاهش مایعات کل بدن، حجم بافت عضلانی، حجم کبد و جریان خون کبدی و نیز کاهش عملکرد کبد و کلیه، از جمله برخی از این تغییرات می‌باشد (۱۸). بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که تمرینات منظم هوازی، باعث تعادل اکسایشی / ضد اکسایشی در بافت کبد، پس از بهم خوردن این تعادل در اثر داروی دوکسوروبیسین می‌شوند (۱، ۱۴، ۱۶، ۱۷). نتایج این مطالعات، توجه پژوهشگران را به تمرینات ورزشی به عنوان یک رویکرد درمانی در جهت کاهش سمیت کبدی ناشی از دوکسوروبیسین، معطوف می‌نماید. با توجه به این که انجام تمرینات هوازی در حین شیمی درمانی، با توجه به شرایط جسمی و روحی بیماران مشکل

به نظر می‌رسد، پژوهش‌های بسیاری تأثیر ورزش را پیش از شروع القای دوکسوروبیسین بررسی کرده‌اند که نتایج آن‌ها حاکی از اثرات مثبت حفاظتی در مقابل استرس اکسایشی ناشی از دوکسوروبیسین بوده است (۱، ۱۹، ۲۰). با این حال، اکثر پژوهش‌هایی که تمرینات پیش درمان ارائه کرده‌اند، پروتکل‌های طولانی با بیش از ۱۰ هفته تمرین هوازی داشته‌اند (۲۳-۲۱) که گرچه نتایج رضایت بخشی گرفته‌اند، اما در شرایط واقعی، امکان ورزش طولانی در انسان با توجه به فرصت اندک بین تشخیص و شروع درمان، مورد سوال می‌باشد. هم چنین، در اکثر مطالعاتی که در زمینه اثرات ورزش بر عوارض جانبی دوکسوروبیسین انجام شده است، از رت‌های جوان به عنوان آزمودنی استفاده شده است (۱، ۱۴، ۲۰)؛ در حالی که این واقعیت که آپوپتوز بافت کبدی می‌تواند تحت تأثیر سالمندی قرار گیرد، مورد توجه قرار نگرفته است.

فرضیه پژوهش حاضر این است که ورزش پیش درمان متوسط مدت هوازی می‌تواند اثرات مطلوب‌تری در شاخص‌های آپوپتوزی و فیبروزی بافت کبد در رت‌های مدل سالمندی داشته باشد؛ لذا این پژوهش، به دنبال بررسی اثرات شش هفته تمرین ورزشی هوازی قبل و حین القای دوکسوروبیسین بر بیان پروتئین‌های Bax، Bcl-2 و نسبت Bax/Bcl-2 و فیروز کبدی ناشی از القای دوکسوروبیسین در رت‌های مدل سالمندی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

طراحی تحقیق

پژوهش حاضر از نوع تجربی و به شکل آزمایشگاهی بود. ۴۲ سر رت نژاد ویستار با سن ۱۲ هفته و میانگین وزن 250 ± 23 گرم به طور تصادفی در ۶ گروه (n=۷) شامل: جوان (Y)، سالمند (A)، سالمند+سالین (AS)، سالمند+دوکسوروبیسین (AD)، سالمند+تمرین+سالین (AExS) و سالمند+تمرین+دوکسوروبیسین (AExD)، در دمای محیطی $22 \pm 1/4$ درجه سانتی‌گراد، چرخه تاریکی به روشنایی ۱۲:۱۲ ساعته و رطوبت ۵۵ درصد

1. Apoptosis
2. Extrinsic pathway
3. Intrinsic pathway

قرار گرفتند. غذای استاندارد (پلت) ساخت شرکت بهرپور (ایران)، به میزان ۱۰ گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن حیوان و به طور آزاد در اختیار آن‌ها قرار داده می‌شد (۱۹). کلیه اصول اخلاقی آزمایشات حیوانی براساس رهنمودهای انجمن فیزیولوژی امریکا رعایت و توسط کمیته اخلاق دانشگاه مازندران تأیید و تصویب شده است.

روش مدل سازی سالمندی

پس از یک هفته خوگرفتن حیوانات با محیط آزمایشگاه، مدل سازی سالمندی به مدت ۹ هفته انجام شد. با توجه به اهداف پژوهش، مدل سازی بر روی ۳۵ سر رت انجام گرفت و ۷ سر دیگر بدون ایجاد سالمندی (گروه جوان) باقی ماندند. ایجاد مدل سالمندی، با استفاده از دی گالاکتوز (ساخت شرکت Sigma، آمریکا) محلول در نرمال سالین ۰/۹ درصد، روزانه ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، به روش تزریق درون صفاقی صورت گرفت (۲۴، ۲۵).

برنامه تمرین هوازی

ابتدا حیوانات گروه تمرین هوازی به مدت یک هفته با نحوه فعالیت بر روی نوار گردان آشنا شدند (پنج جلسه راه رفتن و دویدن روی نوار گردان با سرعت ۵-۸ متر در دقیقه در شیب صفر درصد و به مدت ۱۰-۵ دقیقه). برنامه تمرین اصلی شامل، ۵ جلسه در هفته و به طول مدت ۶ هفته بود که از ابتدای هفته چهارم الی نهم، مدل سازی سالمندی اجرا گردید. تمرینات شامل دویدن روی نوار گردان بدون شیب ویژه جوندگان با مدت و شدت فزاینده از شروع تمرینات تا هفته پایانی (از ۲۵ دقیقه به ۵۴ دقیقه و سرعت تمرین نیز از ۱۵ به ۲۰ متر در دقیقه) بود. گرم کردن و سرد کردن رت‌ها هر جلسه انجام می‌شد (۲۰).

روش القای سمیت کبدی

از ابتدای هفته هشتم مدل سازی سالمندی، آزمودنی‌های پژوهش به مدت ۱۵ روز و همزمان با مدل سازی سالمندی و برنامه تمرینات ورزشی، تحت

جمع آوری نمونه

۴۸ ساعت پس از پایان پروتکل پژوهش، آزمودنی‌ها در شرایط استراحت و ناشتا، با کتامین (۵۰ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۵ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شدند (۱۵). پس از تشریح، کبد آن‌ها به طور کامل برداشته و وزن کشتی شد؛ سپس بخشی از آن به عنوان نمونه جدا شد و در نیتروژن مایع قرار گرفت و تا زمان اندازه گیری سطوح پروتئین‌های Bax و Bcl-2، در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

اندازه گیری بیان پروتئین‌های Bax و Bcl-2

جهت آنالیز وسترن بلات، بافت کبد به روش مکانیکی کاملاً هموژنیزه شد و با استفاده از بافر RIPA و مهارکننده پروتئاز، پس از یک ساعت انکوباسیون به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. پس از تعیین غلظت به روش لوری به مقدار یکسان بر روی ژل پلی اکریلامید مدت ۱۵۰ دقیقه در ولتاژ ۹۰ و آمپر ۲۰۰ الکتروفورز شد. سپس، ژل به همراه اسفنج‌ها و کاغذ PVDF، به صورت ساندویچی، داخل تانک بلات (ساخت شرکت Cleaver Scientific، کشور انگلستان) قرار گرفته و با ولتاژ ۸۰ و آمپر ۲۴۰ به مدت ۸۰ دقیقه الکتروفورز شدند. پس از انتقال پروتئین‌ها از ژل به کاغذ PVDF، کاغذ به مدت یک شب در بلاکینگ بافر شیک شد و پس از خالی کردن بلاکینگ، آنتی بادی اولیه روی آن ریخته و به مدت ۲ ساعت شیک داده شد. کاغذ ۳ بار با TBST 1X شسته شده و پس از آن، همراه با آنتی بادی ثانویه رقیق شده به مدت ۱-۲ ساعت دیگر شیک شد؛ سپس، آنتی بادی ثانویه خالی شده و ۳ بار به روش قبل شستشو داده شد. در انتها، DAB به آن اضافه شد تا باندها نمایان شوند و سپس از باندها اسکن گرفته شد.

ارزیابی هیستوپاتولوژیکی بافت کبد

جهت رنگ آمیزی تریکروم ماسون، قطعاتی از بافت کبد در فرمالین ۱۰ درصد (ساخت شرکت Merck، آلمان)، به مدت ۴۸ ساعت تثبیت شده و پس از پاساژ بافتی، برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون، توسط میکروتوم دوار مدل Shandon-As 325، تهیه و بر روی لام قرار گرفتند. سپس لام‌ها پس از رنگ آمیزی به روش تری کروم ماسون^۱ مورد مطالعه هیستولوژی قرار گرفتند. اساس رنگ آمیزی تریکروم ماسون، شناسایی رشته‌های کلاژنی می‌باشد که به رنگ آبی مشاهده می‌شوند. برای به دست آوردن درصد فیروز، از هر نمونه ۵ برش رنگ آمیزی شده، توسط دوربین DeltaPix نصب شده روی میکروسکوپ Labomed، بررسی شدند. تفسیر تصاویر با نرم افزار Image J انجام شد؛ با کمک این نرم‌افزار، ابتدا طیف رنگ آبی مربوط به نواحی فیروز انتخاب و سپس سایر پیکسل‌های تصویر حذف و با شمارش پیکسل‌های طیف فیروز و تقسیم آن به کل پیکسل‌های تصویر، میزان فیروز محاسبه شد.

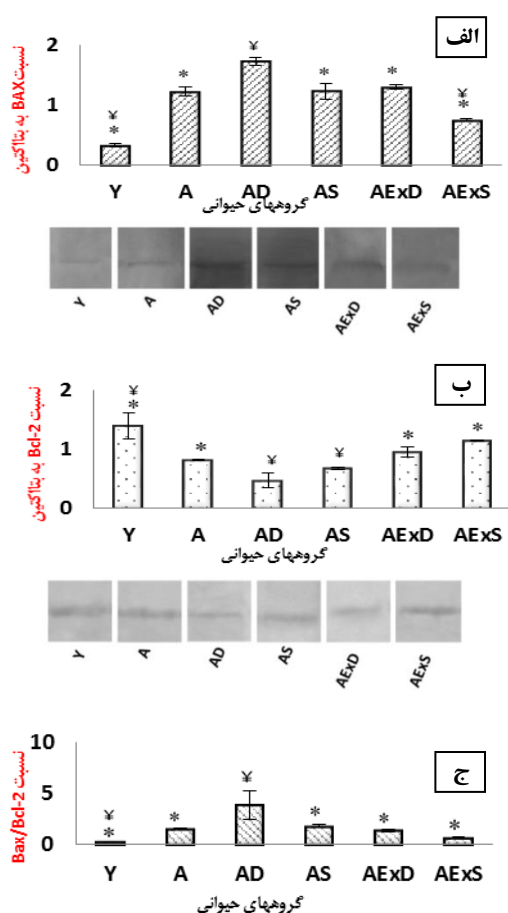
آنالیز آماری داده‌ها

پس از جمع‌آوری داده‌های خام، جهت بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف، برای بررسی تفاوت‌ها در بین گروه‌های مورد مطالعه، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. کلیه محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ و در سطح معنی داری $p < 0.05$ انجام شد.

یافته‌ها

نتایج نشان داد میانگین بیان پروتئین Bax بافت کبدی (تصویر شماره ۱) به‌طور معنی داری در گروه سالمند دریافت کننده دوکسوروبیسین (AD) بالاتر و در گروه جوان (Y) پایین‌تر از تمامی گروه‌ها بود ($p \leq 0.05$). میزان بیان پروتئین Bax در گروه AExD، نسبت به سایر

گروه‌ها تفاوت معنی داری با گروه A و AS تفاوت معنی داری نداشت ($p \leq 0.05$). مقایسه بیان پروتئین Bcl-2 در گروه‌های پژوهش نیز، حاکی از تفاوت معنی داری در گروه Y و AD نسبت به دیگر گروه‌ها بود ($p \leq 0.05$). همچنین، میزان بیان پروتئین Bcl-2 در گروه AExD نسبت به گروه A، AS و AD تفاوت معنی داری نداشت ($p \leq 0.05$). بررسی نسبت بیان Bax/Bcl-2 بین گروه‌های پژوهش، حاکی از پایین بودن معنی داری این نسبت در گروه Y نسبت به تمامی گروه‌ها، به غیر از گروه AExS بود ($p \leq 0.05$). نسبت بیان Bax/Bcl-2 در گروه AD نیز، نسبت به تمامی گروه‌ها تفاوت معنی داری داشت. همچنین، نسبت بیان Bax/Bcl-2 در گروه AExD نسبت به گروه سالیان همتای خود تفاوت معنی داری نداشت ولی با دو گروه Y و AD تفاوت معنی داری داشت ($p \leq 0.05$).



تصویر شماره ۱: میانگین بیان پروتئین‌های Bax، Bcl-2 (برحسب نسبت بتا اکتین) و نسبت Bax/Bcl-2 گروه‌های پژوهش و باند وسترن بلات. (الف) میانگین بیان پروتئین Bax. (ب) میانگین بیان پروتئین

1. Masson-trichrom

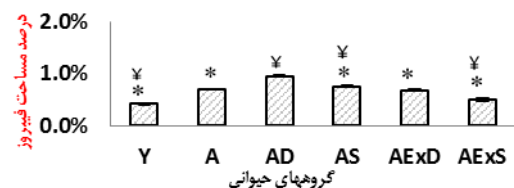
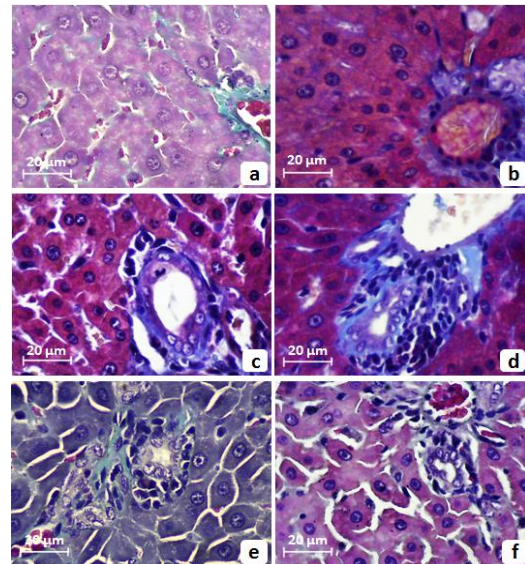
بحث

پژوهش حاضر نشان داد القای دو کسورویسین موجب افزایش بیان پروتئین Bax و نسبت Bax/Bcl-2 و نیز کاهش بیان پروتئین Bcl-2 و فیروز بافت کبدی در گروه‌های پژوهش شده است. نتایج مقایسه گروه‌های تمرینی نسبت به گروه‌های کنترل خود، حاکی از تفاوت معنی‌دار میانگین پروتئین‌های Bax، Bcl-2، Bax/Bcl-2 و فیروز کبدی میان آن‌ها بوده است؛ به‌طوری‌که تمرین ورزشی هوازی قبل و طی درمان با داروی دو کسورویسین در رت‌ها، به‌طور مؤثری سبب پیشگیری از آپوپتوز و فیروز سلول‌های سالم کبدی شده بود. با توجه به این که اندام حیاتی کبد، اولین عضوی است که از طریق ورید باب تمام موادی را که از راه روده جذب می‌شود دریافت می‌کند، بدیهی است اثر سمی اکثر داروها روی کبد، زودتر از بقیه اعضا نمایان شود (۲۷). مطالعات نشان داده‌اند داروی شیمی درمانی دو کسورویسین، با آسیب به غشای میتوکندری باعث افزایش آپوپتوز در سلول‌های سرطانی شده و در این میان سلول‌های سالم برخی بافت‌های حساس، هم چون کبد (۱۴، ۷، ۶، ۱) را نیز درگیر آسیب و آپوپتوز می‌کند. اخیراً نشان داده شده است که مسیرهای میتوکندریایی آپوپتوز، نقش مهمی در تنظیم آپوپتوز توسط دو کسورویسین دارند (۱۵-۱۳)؛ از این میان پروتئین‌های خانواده Bcl-2 که حاوی دو گروه پروآپوپتوتیک^۱ هم چون Bax، Bad، Bak و Bcl-xS و آنتی آپوپتوتیک^۲ هم چون Bcl-2 و Bcl-xL می‌باشند، نقشی فعال در آپوپتوز میتوکندریایی داشته و با آسیب به غشاء میتوکندری و رهایش سیتوکروم C، موجب فعال شدن کاسپازها و در نهایت، مرگ سلول می‌شوند (۱۵، ۲).

پژوهش‌های پیشین نشان داده‌اند که سطوح بالای پروتئین پروآپوپتوتیک Bax نسبت به Bcl-2 که از پروتئین‌های مهار کننده آپوپتوز می‌باشد، سبب افزایش آپوپتوز و کاهش بقا می‌شود (۲۹، ۲۸، ۱۵). نتایج پژوهش نشان داد

Bcl-2. (ج) نسبت Bax/Bcl-2: Y. جوان. A: سالمند. AS: سالمند + سالین. AD: سالمند + دو کسورویسین. AExS: سالمند + تمرین + سالین. AExD: سالمند + تمرین + دو کسورویسین. * معنی‌داری با AD. † معنی‌داری با AExD.

مقایسه میزان فیروز کبدی بین گروه‌ها نشان داد فیروز در گروه Y نسبت به تمامی گروه‌ها به‌طور معنی‌داری پایین‌تر بود (تصویر شماره ۲). هم‌چنین میزان فیروز در گروه AD نسبت به تمامی گروه‌ها تفاوت معنی‌دار داشت ($p \leq 0.05$). میزان بیان فیروز در گروه AExD، نسبت به سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌دار ولی با گروه A تفاوت معنی‌داری نداشت ($p \leq 0.05$).



تصویر شماره ۲: درصد مساحت فیروز بافت کبدی رت‌های پژوهش توسط روش تری کروم ماسون که در آن کلاژن‌ها به رنگ آبی درآمده‌اند، با بزرگنمایی 400X. a: جوان (Y). b: سالمند (A). c: سالمند + سالین (AS). d: سالمند + دو کسورویسین (AD). e: سالمند + تمرین + سالین (AExS). f: گروه سالمند + تمرین + دو کسورویسین (AExD). * معنی‌داری با AD. † معنی‌داری با AExD.

1. Pro-Apoptotic
2. Anti-Apoptotic

بیان پروتئین Bax، متعاقب القای مزمن دوکسورویسین افزایش یافت؛ به طوری که سطح Bax در گروه AD بالاتر از تمامی گروه‌های پژوهش بود (تصویر شماره ۱). پژوهش‌های بسیاری همسو با این پژوهش، حاکی از افزایش پروتئین Bax یا استرس اکسیداتیو، متعاقب تزریق دوکسورویسین بودند (۳۰، ۱۵، ۱۴)؛ این پژوهش‌ها نشان دادند دوکسورویسین سبب اختلال در عملکرد تنفس میتوکندریایی، آسیب اکسیداتیو و ضایعات هیستوپاتولوژیک و راه انداختن آپوپتوز می‌شود. راهکار ورزشی مورد استفاده در این پژوهش شامل، ۵ جلسه تمرین هوازی در هفته روی نوارگردان با رعایت اصل اضافه بار به مدت ۶ هفته بود. بیان پروتئین Bax، در گروه‌های دریافت‌کننده دوکسورویسین که مداخله تمرین ورزشی داشتند نسبت به گروه‌های کنترل خود، به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرده بود. ذوالفقارزاده و همکاران (۲۰۱۳)، دریافتند اثر پیش درمان سه و شش هفته تمرین هوازی قبل از القای دوکسورویسین، سبب کاهش سطوح مالون دی‌آلدئید و افزایش سوپراکساید دیسموتاز می‌شود (۶). احتمال می‌رود مهار اکسیدانت‌ها و تنظیم مثبت آنتی اکسیدان‌ها در بیان پروتئین Bax نقش داشته باشد. تمرین استقامتی با تحریک ظرفیت ضد اکسایشی هر فرد در برابر استرس اکسیداتیو حمایت می‌کند (۳۱). قرار گرفتن مداوم در معرض فشار ناشی از تمرینات استقامتی می‌تواند سازگاری‌های آنزیمی را که مسئولیت کاهش استرس اکسایشی را بر عهده دارند، افزایش دهد (۳۲). نتایج نشان داد بیان پروتئین Bcl-2 در گروه AD نسبت به تمامی گروه‌ها، به‌طور معنی‌داری پایین‌تر بود و ۶ هفته تمرین استقامتی تداومی سبب بیان بالای پروتئین Bcl-2 در گروه AExD نسبت به گروه AD شده بود. این نتایج، همسو با نتایج اشرفی و همکاران (۱۳۹۳) می‌باشد که اثر ۶ هفته تمرین نوارگردان استقامتی را بر مسمومیت بافت کبدی ناشی از القای دوکسورویسین در موش‌های صحرایی جوان بررسی کرده بودند و دریافته بودند این تمرینات باعث تنظیم منفی

شاخص‌های اکسیدانی و تنظیم مثبت فعالیت آنتی اکسیدانی در بافت کبدی متعاقب القای دوکسورویسین می‌شود (۱). مقایسه بین گروه‌ها نشان داد که نسبت Bax/Bcl-2، که شاخصی از میزان مرگ سلولی است، در گروه جوان (Y) نسبت به تمامی گروه‌ها به غیر از گروه AExS، کم‌تر بود که حاکی از آپوپتوز کم‌تر و بقای بیش‌تر در گروه‌های Y و AExS بود. القای دوکسورویسین سبب افزایش نسبت Bax/Bcl-2 در تمامی گروه‌های دریافت‌کننده بود، به طوری که گروه AD بیش‌ترین تغییرات را داشت. این یافته‌ها با پژوهش‌های Kavazis (۲۰۱۰)، Ascensão (۲۰۱۲) و شریفی (۱۳۹۵) که نشان دادند القای دوکسورویسین باعث افزایش پروتئین‌های پرو آپوپتوتیک می‌شود همسو می‌باشد (۳۰، ۱۵، ۱۴). هم‌چنین، نتایج نشان داد نسبت Bax/Bcl-2 در گروه AExD نسبت به گروه همتای بدون تمرین خود (AD)، به طور معنی‌داری پایین‌تر بود و این شاهد خوبی برای توجیه اثرات مثبت ورزش بر کاهش آپوپتوز کبدی می‌باشد. شریفی و همکاران (۱۳۹۵)، در پژوهش خود که اثر پیش درمان تمرین هوازی بر بیان ژن مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده بطن چپ متعاقب القای دوکسورویسین در موش‌های صحرایی مدل سالمندی بررسی کرده بودند، دریافتند که انجام تمرین هوازی قبل و طی القای دوکسورویسین از افزایش نسبت Bax/Bcl-2 و کاهش بیان ژن Bcl-2 ناشی از تزریق دوکسورویسین پیشگیری می‌کند (۱۵). پژوهش‌های پیشین حاکی از تنظیم منفی شاخص‌های اکسیدانی و تنظیم مثبت فعالیت آنتی اکسیدانی پس از ورزش منظم بود (۳۲، ۱۱، ۱۰). بررسی‌های هیستوپاتولوژیک پژوهش حاضر، نشان‌دهنده افزایش میزان فیروز، پس از القای دوکسورویسین در گروه‌های پژوهش بود (تصویر شماره ۲). مطالعات قبلی نشان داده‌اند دوکسورویسین در دوزهای بالا باعث سمیت گسترده کبدی و در دوزهای پایین سبب تغییرات غیرطبیعی، همچون انحطاط پورت کبدی، افزایش آپوپتوز و فیروز پری پرتال می‌شود (۳۳). آسیب کبدی،

منجر به التهاب شده و باعث می شود سلول های ستاره ای کبد از حالت خاموش به حالت فعال تبدیل شده و سبب افزایش فاکتورهای فیروژنیک شده و باعث تنظیم منفی فیروبلات های انقباضی و نیز افزایش تولید پروتئین های ماتریکس خارج سلولی از جمله، کلاژن، الاستین، لامینین و فیرونکتین شده که منجر به تخریب و فیروز می شود (۳۴). فیروز کبدی، در اثر تجمع بیش از حد پروتئین های ماتریکس برون سلولی، به ویژه کلاژن و اغلب به دنبال آسیب های مزمن کبدی ایجاد شده و منجر به تغییر ساختاری کبد، اختلال در عملکرد هپاتوسیت ها و در نتیجه نارسایی کبدی می شود (۳۵).

نتایج پژوهش نشان داد کم ترین میزان فیروز، مربوط به گروه Y و بیش ترین فیروز مربوط به گروه AD بود و تمرین ورزشی در گروه AExD نسبت به گروه بدون تمرین AD، میزان فیروز را به طور معنی داری کاهش داده بود؛ این نتیجه شاهد این مدعا است که ورزش هوازی منظم حتی با وجود تزریق دوکسوروبیسین می تواند میزان فیروز را کاهش دهد. این نتایج همسو با پژوهش های قبلی بود که دریافته بودند تمرین هوازی قبل از القای دوکسوروبیسین، می تواند سمیت کبدی را از طریق کاهش سطوح MDA و افزایش معنی دار در سطوح آنزیم SOD، کاهش دهد (۳۲).

سادات حسینی و دیدی روشن (۲۰۱۷)، در پژوهشی به این نتیجه دست یافتند که تمرینات هوازی روی نوارگردان تا حدودی باعث کاهش اندک MDA و AIF و نیز افزایش اندک SOD و در نتیجه کاهش ناپیزی در سطح سمیت کبدی رت های سالمند در مقابل دوکسوروبیسین می شود (۱۱). با توجه به نتایج پژوهش حاضر به نظر می رسد عوامل آنتی آپوپتوتیک دیگری غیر از عوامل یاد شده در کاهش آپوپتوز و فیروز در حیوانات تمرین

کرده نقش داشته باشند. سلول های ستاره ای فعال شده کبد، از طریق یک مسیر وابسته به NF- κ B منجر به بیان پروتئین آنتی آپوپتوتیک Bcl-2 و Gadd45 β و کاهش آپوپتوز می شوند (۳۷،۳۶). برای شفاف تر شدن مکانیزم های احتمالی، نیاز به پژوهش های بیش تری در این زمینه می باشد تا راهکاری برای پیشگیری از فیروز کبدی که در آن توانایی تکثیر و بازسازی هپاتوسیت های موجود در مقابل دوکسوروبیسین به طور چشمگیری کاهش می یابد، شناسایی شود. به طور خلاصه، نتایج مطالعه حاضر حاکی از آن است که تمرین منظم هوازی پیش درمان، توانست میزان آپوپتوز سلول های سالم کبدی را از طریق کاهش بیان پروتئین Bax و افزایش بیان پروتئین Bcl-2، کاهش دهد. همچنین، در گروه های تمرینی، نسبت Bax/Bcl-2 نیز کاهش یافت که تأیید دیگری در کاهش میزان آپوپتوز و افزایش بقای سلول های سالم کبدی می باشد. کاهش فیروز کبدی نیز در کنار کاهش میزان آپوپتوز پس از القای دوکسوروبیسین در گروه های تمرینی، روزه ای روشن در جهت کاهش عوارض داروی دوکسوروبیسین می باشد. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، می توان به تمرینات هوازی قبل از شروع درمان با دوکسوروبیسین، به عنوان راهکاری غیردارویی در برابر آپوپتوز و فیروز سلول های سالم کبدی ناشی از عوارض دوکسوروبیسین، توجه بیش تری نمود.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه مقطع دکتری می باشد و نویسندگان از فراهم سازی مقدمات اجرای پروتکل مطالعاتی توسط دانشکده علوم ورزشی دانشگاه مازندران و هم چنین مشاوره علمی دکتر احمد پارسایی فر و دکتر زهره مظاهری قدردانی می کنند.

References

1. Ashrafi J, Dabidi Roshan V, Zolfagharzadeh F. Tissue Toxicity Induced By Doxorubicin In Rats: Protective Role Of Aerobic Regular

Exercise. J Urmia Univ Med Sci 2014; 25(4): 353-362 (Persian).

2. Saxton J, Daley A. Exercise and cancer survivorship: Impact on health outcomes and quality of life. New York, Springer-Verlag; 2010.
3. Marques-Aleixo I, Santos-Alves E, Mariani D, Rizo-Roca D, Padrão AI, Rocha-Rodrigues S, et al. Physical exercise prior and during treatment reduces sub-chronic doxorubicin-induced mitochondrial toxicity and oxidative stress. *Mitochondrion* 2015; 20(Suppl C): 22-33.
4. Smuder AJ, Kavazis AN, Min K, Powers SK. Doxorubicin-induced markers of myocardial autophagic signaling in sedentary and exercise trained animals. *J Appl Physiol* 2013; 115(2): 176-185.
5. Salouge I, Ali RB, Saïd DB, Elkadri N, Kourda N, Lakhal M, et al. Means of evaluation and protection from doxorubicin-induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats. *J Cancer Res Ther* 2014; 10(2): 274-278.
6. Zolfagharzadeh F, Roshan VD. Pretreatment hepatoprotective effect of regular aerobic training against hepatic toxicity induced by doxorubicin in rats. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14(5): 2931-2936.
7. Alishahi A, Nasiri S. The Protective Effect of Regular Aerobic Training on Doxorubicin-Induced Hepatotoxicity in Rats: The Insulin-Like Growth Factor System. *ZJRMS* 2014; 16(12): 61-66 (Persian).
8. Alexieva B, Sainova I, Pavlova V, Markova T, Valkova I, Nikolova E. Insights into Mechanisms of Doxorubicin Cardiotoxicity. *J Phys Pharm Adv* 2014; 4(3): 342-348.
9. Rogalska A, Szwed M, Rychlik B. The connection between the toxicity of anthracyclines and their ability to modulate the P-glycoprotein-mediated transport in A549, HepG2, and MCF-7 cells. *Scientific World Journal* 2014; 2014: 819548.
10. Javid AH, Dabidi Roshan V. Effects of Six Weeks of Continuous Training With and Without Nanocurcumin Supplementation on Doxorubicin-induced Hepatotoxicity in an Aging Rat Model. *MJMS* 2017; 19(4): 1-12.
11. Sadat-Hoseini SK, Dabidi Roshan V. Is sub-chronic exercise in Combination with medicinal nanoparticles a protective strategy against Doxorubicin-induced Hepatic oxidative stress and apoptosis in aging model rats? *Nanomedicine Journal* 2017; 4(4): 224-231.
12. Dasgupta A, Nomura M, Shuck R, Yustein J. Cancer's Achilles' heel: apoptosis and necroptosis to the rescue. *Int J Mol Sci* 2016; 18(1): 23 (Persian).
13. Synowiec E, Hoser G, Bialkowska-Warzecha J, Pawlowska E, Skorski T, Blasiak J. Doxorubicin Differentially Induces Apoptosis, Expression of Mitochondrial Apoptosis-Related Genes, and Mitochondrial Potential in BCR-ABL1-Expressing Cells Sensitive and Resistant to Imatinib. *BioMed Research International* 2015; 2015: 9.
14. Ascensão A, Oliveira PJ, Magalhães J. Exercise as a beneficial adjunct therapy during Doxorubicin treatment—Role of mitochondria in cardioprotection. *Int J Cardiol* 2012; 156(1): 4-10.
15. Sharifi F, Roshan V, Mazaheri Z. Effect of Pretreatment of Aerobic Training on Doxorubicin-induced Left Ventricular Apoptosis Gene Expression in Aging Model Rats. *Pathobiology Research* 2016; 19(2): 29-43 (Persian).
16. Fu C, Wang T, Wang Y, Chen X, Jiao J, Ma F, et al. Metabonomics study of the protective effects of green tea polyphenols on aging rats induced by d-galactose. *J Pharm Biomed Anal* 2011; 55(5): 1067-1074.
17. Murali G, Panneerselvam C. Age-associated oxidative macromolecular damages in rat

- brain regions: role of glutathione monoester. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2007; 62(8): 824-830.
18. Mangoni AA, Jackson SH. Age related changes in pharmacokinetics and pharmacodynamics: basic principles and practical applications. *Br J Clin Pharmacol* 2004; 57(1): 6-14.
 19. Ashrafi J, Roshan VD, Mahjoub S. Cardioprotective effects of aerobic regular exercise against doxorubicin-induced oxidative stress in rat. *Afr J Pharm Pharmacol* 2012; 6(31): 2380-2388.
 20. Shirinbayan V, Dabidi Roshan V, Mahjoub S. The therapeutic effect of endurance training on adriamycin-induced cardiac stress in rats. *Iranian Journal of Health and Physical Activity* 2013; 4(2): 8-17 (Persian).
 21. Kim E-J, Hwang S. Effects of aerobic exercise on antioxidants in rat models with cardiomyopathy. *Phys Ther Rehabil Sci* 2015; 4(1): 17-21.
 22. Huang C-C, Chiang W-D, Huang W-C, Huang C-Y, Hsu M-C, Lin W-T. Hepatoprotective effects of swimming exercise against D-galactose-induced senescence rat model. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013; 2013: 275431
 23. Santana ET, Serra AJ, Silva Junior JA, Bocalini DS, Barauna VG, Krieger JE, et al. Aerobic exercise training induces an anti-apoptotic milieu in myocardial tissue. *Motriz: Rev Educ Fís* 2014; 20(2): 233-238.
 24. Kim SY, Lee J. Exercise Training suppresses vascular fibrosis in aging obesity induced rats. *J Exerc Nutrition Biochem* 2014; 18(2): 175-180.
 25. Lee J, Cho J-Y, Kim W-K. Anti-inflammation effect of exercise and Korean red ginseng in aging model rats with diet-induced atherosclerosis. *Nutr Res Pract* 2014; 8(3): 284-291.
 26. Chicco AJ, Hydock DS, Schneider CM, Hayward R. Low-intensity exercise training during doxorubicin treatment protects against cardiotoxicity. *J Appl Physiol* 2006; 100(2): 519-527
 27. Klingelhoeffer C, Kämmerer U, Koospal M, Mühling B, Schneider M, Kapp M, et al. Natural resistance to ascorbic acid induced oxidative stress is mainly mediated by catalase activity in human cancer cells and catalase-silencing sensitizes to oxidative stress. *BMC Complement Altern Med*. 2012; 12-61.
 28. Spierings D, McStay G, Saleh M, Bender C, Chipuk J, Maurer U, et al. Connected to death: the (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis. *Science*. 2005; 310(5745): 66-67.
 29. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281(5381): 1309-1312.
 30. Kavazis AN, Smuder AJ, Min K, Tümer N, Powers SK. Short-term exercise training protects against doxorubicin-induced cardiac mitochondrial damage independent of HSP72. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;299(5):H1515-H24.
 31. Sriram KI, Lakshmi CJ. Endurance exercise-induced alterations in antioxidant enzymes of old albino male rats. *Current Science* 2001; 80(8): 921-923.
 32. Zolfaghazadeh F, Dabidi-Roshan V, Hajizadeh Moghaddam A. Pretreatment effect of three and six weeks aerobic exercise on acute doxorubicin-induced hepatic stress. *Modern Olympic* 2015; 1(2): 117-128 (Persian).
 33. Ammar E-SM, Said SA, Suddek GM, El-Damarawy SL. Amelioration of doxorubicin-induced cardiotoxicity by deferiprone in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2011; 89(4): 269-276.
 34. Petitclerc L, Gilbert G, Nguyen BN, Tang A. Liver Fibrosis Quantification by Magnetic

- Resonance Imaging. Top Magn Reson Imaging 2017; 26(6): 229-241.
35. Cao B-Q, Lin J-Z, Zhong Y-S, Huang S-B, Lin N, Tang Z-F, et al. Contribution of mononuclear bone marrow cells to carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. World J Gastroenterol 2007; 13(12): 1851-1854.
36. Elsharkawy A, Oakley F, Mann D. The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis. Apoptosis 2005; 10(5): 927-939.
37. Mann DA, Marra F. Fibrogenic signalling in hepatic stellate cells. J Hepatol 2010; 52(6): 949-950.