



Original Article

Effect of eight weeks of high intensity interval training and crocin consumption on the apoptotic genes expression in the liver tissue of male rats under chronic doxorubicin induction

Mahraz Moradi^{ID1}, Saeid Shakerian^{ID2}, Masoud Nikbakht^{ID2}

ABSTRACT

Background and Aims: The use of doxorubicin (Dox) in chemotherapy has irreversible effects on liver tissue. The role of physical activities and antioxidants consumption has not yet been fully understood in the mechanism of apoptosis induced by Dox. Therefore, the present study aimed to investigate the effect of High Intensity Interval Training (HIIT) and crocin consumption on liver tissue apoptosis in male rats under chronic Dox induction.

Materials and Methods: In this experimental study, 40 male Wistar rats with mean weight of 200 ± 20 g and mean age of 8 weeks were divided into five groups, including healthy control, Dox (2 mg/kg in 7 doses), Dox+crocin (10 mg/kg), Dox+HIIT, and Dox+HIIT+crocin. The training program included running on the treadmill for 8 weeks, 5 days a week, at 2-minute intervals with an intensity of 80-90% of the maximum speed. Liver biopsy was performed to assess the fibrosis and expression of *Bax* and *Bcl-2* genes using RT-PCR method 48 h after the last training session. The statistical analysis was conducted through one-way ANOVA, and a p-value of ≤ 0.05 was considered statistically significant.

Results: Treatment with Dox significantly increased *Bax* expression, compared to *Bax/Bcl-2*. Moreover, it decreased *Bcl-2* expression in the liver tissue of the patient groups ($P=0.001$). In contrast, crocin and the combination of exercise and crocin decreased *Bax* expression, compared to *Bax/Bcl-2* and increased *Bcl-2* expression in experimental groups, compared to Dox group ($P=0.001$).

Conclusion: The results indicated that the HIIT combined with the consumption of crocin had a significant effect on the decrease of apoptosis in the liver tissue of male rats subjected to chronic doxorubicin injection.

Keywords: Apoptosis, Crocin, Doxorubicin, High-Intensity Interval Trainings, Liver



Citation: Moradi M, Shakerian S, Nikbakht M. [Effect of eight weeks of high intensity interval training and crocin consumption on the apoptotic genes expression in the liver tissue of male rats under chronic doxorubicin induction]. J Birjand Univ Med Sci. 2020; 27(4): 323-335. [Persian]

DOI <http://doi.org/10.32592/JBirjandUnivMedSci.2020.27.4.101>

Received: January 6, 2020

Accepted: April 24, 2020

¹ Department of Sport Physiology, Shoushtar Branch, Islamic azad University, Shoushtar, Iran

² Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Corresponding author: Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Tel: +986133333631,

Fax: +986133333631

Email: sashakeryan@gmail.com

اثر هشت هفته تمرین تناوبی شدید و مصرف کروسین بر بیان ژن‌های آپوپتیک بافت کبد رت‌های نر تحت القاء مزمن دوکسوروبیسین

مهراز مرادی^۱, سعید شاکریان^۲, مسعود نیکبخت^۲

چکیده

زمینه و هدف: استفاده از دوکسوروبیسین (Dox) در شیمی درمانی، عوارض جبران‌نایدیری بر بافت کبد دارد. اما، نقش فعالیتهای ورزشی و مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها بر مکانیسم آپوپتوز کبدی ناشی از مصرف Dox هنوز به طور کامل شناخته نشده است. از این‌رو هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر تمرین تناوبی شدید (HIIT) و مصرف کروسین بر آپوپتوز بافت کبد رت‌های نر تحت القاء مزمن Dox بود.

روش تحقیق: در این مطالعه تجربی ۴۰ سررت نر نژاد ویستار با محدوده وزنی ۲۲۰-۲۰۰ و محدوده سنی ۸ هفته در گروه‌های ۱: کنترل سالم، ۲: Dox (۲ mg/kg دوز)، ۳: Dox+کروسین (۱۰ mg/kg)، ۴: HIIT+Dox و ۵: کروسین قرار گرفتند. گروه‌های تمرینی به مدت ۸ هفته، ۵ روز در هفته، با تناوب‌های ۲ دقیقه‌ای و با شدت ۸۰ تا ۹۰ درصد سرعت بیشینه دویدند. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، بافت برداری از کبد جهت ارزیابی فیبروز و بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 به روش Real (time-PCR) انجام شد. نتایج تجزیه و تحلیل یافته‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه در سطح معناداری ($P<0.05$) بررسی شدند.

یافته‌ها: Dox باعث افزایش معنادار بیان Bax/Bcl-2 نسبت Bax و کاهش بیان Bcl-2 در بافت کبد گروه‌های بیمار شد ($P=0.001$). در مقابل تمرین، کروسین و ترکیب تمرین و کروسین باعث کاهش بیان Bax، نسبت Bax/Bcl-2 و افزایش بیان Bcl-2 در گروه‌های تجربی در مقایسه با گروه Dox شد ($P=0.001$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد تمرینات تناوبی شدید و مصرف کروسین به طور همزمان اثرات معنی‌داری بر کاهش آپوپتوز کبدی موش‌های صحرایی نر تحت القاء مزمن، با تزریق دوکسوروبیسین دارد.

واژه‌های کلیدی: آپوپتوز، کروسین، دوکسوروبیسین، تمرین تناوبی شدید، کبد

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی پیرجنده، ۱۳۹۹: ۳۲۳-۳۳۵.

دربافت: ۱۳۹۸/۱۰/۰۵ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۰۵

^۱ گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد شوستر، دانشگاه آزاد اسلامی، شوستر، ایران

^۲ گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

نویسنده مسئول: گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

آدرس: اهواز - دانشگاه شهید چمران اهواز - دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تلفن: ۰۶۱۳۳۳۳۶۳۱ نامبر: ۰۶۱۳۳۳۳۶۳۱ پست الکترونیکی: sashakeryan@gmail.com

مقدمه

اندپلاسمیک، آزادساز ریبوزوم ها و تجزیه سلول به اجسام آپوپتوز، آپوپتوز و مرگ سلولی را فعال می کند (۷). با توجه به این که مسیرهای آپوپتوز در سلول از طریق تغییر در بیان برخی ژن ها به ویژه نسبت $Bcl-2/Bax$ تنظیم می شود، مقایسه میزان بیان ژن های Bax و $Bcl-2$ می تواند الگوی آپوپتوز را در سلول ها مشخص نماید (۸). اخیراً پژوهشگران نشان داده اند فعالیت های ورزشی منظم راهبردی مناسب برای پیشگیری از عوارض ناشی از مصرف Dox است (۹)، تمرینات ورزشی منظم و طولانی مدت می تواند با تعدیل استرس اکسیداتیو، رویکردی مناسب جهت کاهش سمیت Dox باشد (۳). با این وجود نوع و شدت تمرین عاملی مهم در نتایج می باشد، به گونه ای که هشت هفته تمرین شنا سبب افزایش معنی داری $Bcl-2$ ، کاهش Bax و نسبت $Bcl-2/Bax$ بافت کبد موش های مسن تحت القای Dox شد (۱۰)؛ همچنین نشان داده شده است ۶ هفته تمرین اختیاری در حین شیمی درمانی موجب کاهش پروتئین Bax و نسبت $Bax/Bcl-2$ در رت های در معرض Dox گردید. از سویی مطالعاتی نیز نشان دادند تمرینات تناوبی شدید (HIIT)^۳ موجب بر هم خوردن تعادل اکسیدان ها و آنتی-اکسیدان ها و افزایش استرس اکسیداتیو و برخی موجب کاهش استرس اکسیداتیو می گردد (۱۱). یکی از گیاهان سودمند در این زمینه، زعفران می باشد که دارای خواص و کاربردهای دارویی و درمانی متعددی می باشد (۱۲)، زعفران و عصاره کروسین^۴ در بافت های مختلف بدن چون سیستم عصبی مرکزی، دستگاه گوارش، کبد، کلیه، قلب و عروق مشاهده شده است (۱۳). مصرف کروسین موجب افزایش سطوح $P53$ و کاهش $Bcl-2$ در سلول های سرطانی گردید و سطوح Bax را افزایش داد (۱۴). همچنین تمرینات ورزشی و مصرف زعفران و عصاره کروسین دارای اثرات تعاملی بر کاهش مرگ سلولی در بافت قلب موش های صحرایی مبتلا به دیابت نوع ۲ Invitro و بهبود شخص های متابولیکی در محیط های *In vivo* (۱۵) بود. با این وجود به نظر می رسد مطالعات در حیطه تأثیر همزمان مصرف کروسین و تمرینات شدید ورزشی بر استرس اکسیداتیو ناشی از Dox هنوز به طور کامل شناخته نشده است.

³High-intensity interval training

⁴Crocin

در حال حاضر بیماری سرطان از بزرگترین مشکلات سلامت جهانی و دومین عامل مرگ و میر در سطح جهان است (۱ و ۲). اما؛ میزان بقای افراد پس از تشخیص بیماری افزایش یافته که راهکارهای کاهش عوارض داروهای درمانی، یکی از دلایل آن می باشد. دوکسورو بیسین^۱ (Dox)، یکی از داروهای شیمی درمانی است که در درمان رشد غیر طبیعی سلول ها (نئوپلاسم انسانی) مورد استفاده قرار گرفته است؛ اما استفاده از این دارو، در شیمی درمانی به همراه سمیت وابسته به دوز در بافت های غیر هدف مانند کبد محدود شده است (۴، ۳). داروی Dox با مکانیسم هایی از قبیل تولید گونه های فعال اکسیژن^۲ (ROS) و فعال سازی مسیرهای آپوپتوزی موجب از هم گسیختگی DNA سلول های سرطانی می شود و در بافت های سالمی همچون کبد با اختلال در آنزیم های کبدی، تغییرات بافتی و افزایش ROS ها و فعال سازی پروتئین های آغازگر آپوپتوز مانند Bax و کاهش $Bcl-2$ موجب سمیت بافت کبد می شود (۴). آپوپتوز یا مرگ برنامه ریزی شده سلول، روشی فیزیولوژیک برای از بین بردن سلول های آسیب دیده، پیر و هموستانز بافتی می باشد که از دو مسیر بیرونی و درونی اتفاق می افتد (۵). هرگونه اختلال در روند آپوپتوز، کاهش یا افزایش نامتعارف مرگ سلولی و در نهایت بیماری را موجب می شود (۶). مشخص شده است که دوکسورو بیسین، عمدتاً از مسیر داخلی سبب القای آپوپتوز می باشد. مسیر داخلی که به مسیر میتوکندریایی نیز شناخته می شود، با افزایش بیان ژن و پروتئین های آنتی آپوپتیک (از جمله $BCL-2$ و $BCL-XL$) متوقف می شود، همچنین پروتئین Bax با $BCL-2$ مهار می کند (۷). در حالی که پروتئین Bax با خنثی کردن عمل با ایجاد تغییرات بافتی معینی از جمله کاهش یا عدم چسبندگی سلول آپوپتوز به سلول های دیگر و ماتریکس خارج سلولی، وقوع تاول ها غشاء پلاسمایی و تراکم هسته ای، قطعه قطعه شدن DNA ژنومی، اتساع رتیکلوم

¹Doxorubicin

²Reactive oxygen Species

کتابتین و زایلارزین (به ترتیب ۹۰ و ۱۰ mg/kg) به صورت تزریق صفاقی بیهوش شدند، و پس از شکافتن حفره شکمی، بافت کبد به دقّت جدا و پس از شستشو با آب مقطّر و توزین، بلا فاصله در فریزر با دمای -۷۰ درجه سانتیگراد برای اندازه‌گیری سطوح بیان ثنی مغایرها قرار گرفتند.

پروتکل تمرين

جهت انجام تمرینات ورزشی گروههای تمرین به مدت هشت هفته، پنج جلسه در هفته تمرینات تناوبی را انجام دادند. تمرینات تناوبی شدید(درصد از سرعت بیشینه) در این تحقیق بدین صورت بود که موش های صحرایی در هفته اول ۲ تکرار ۲ دقیقه ای را با شدت بالا (۸۰ درصد) و یک تکرار ۲ دقیقه ای با شدت پایین (۴۰ تا ۵۰ درصد)، هفته دوم ۴ تکرار تناوبی با شدت بالا (۸۵ درصد) و ۳ تکرار تناوبی با شدت پایین (۴۰ تا ۵۰ درصد)، هفته سوم ۶ تکرار تناوبی با شدت بالا (۹۰ درصد) و ۵ تکرار با شدت پایین (۴۰ تا ۵۰ درصد)، هفته چهارم به بعد ۸ تکرار ۲ دقیقه ای با شدت بالا (۹۰ درصد) و ۷ تکرار با شدت پایین (۴۰ تا ۵۰ درصد) را انجام دادند. همچنین در ابتدای هر جلسه تمرین ۵ دقیقه گرم کردن و در انتهای ۵ دقیقه سرد کردن با شدت ۴۰ تا ۵۰ درصد انجام شد. این نکته قابل ذکر است که زمان کل تمرینات در هفته اول از ۱۶ دقیقه شروع و در هفته آخر ۴۰ دقیقه بود (۱۷). با توجه به اثرات و عوارض داروی دوکسوروپیسین بر عملکرد موش های صحرایی، شدت آن تعديل گردید. کلیه موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی در این تحقیق بر اساس موازین اخلاقی مصوب با استانداردهای اخلاقی در IR.SSRC.REC.1397.005 تحقیقات وزارت علوم، و با کد رعایت گردید.

نحوه مصرف کروسین

برای تهییه کروسین با درجه خلوص ۹۸ درصد از شرکت سیگمای آمریکا با کد اقتصادی ۱G-17304 خریداری شد. سپس مقدار ۱۰ میلی گرم کروسین حل شده در حجمی معادل ۱۰ ml/kg نیمای سالین حل شد و در ادامه به مدت ۸ هفته به صورت خوارکه،

همچنین با توجه به عوارض جانبی جبران ناپذیر این دارو انجام مطالعات این چنینی می‌تواند پایه و اساس مطالعات کاربردی در راستای کاهش هزینه‌های سنگین اقتصادی این بیماران باشد. از این رو مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر هشت هفته تمرین تناوبی شدید و مکمل کروسوین بر بیان Zn^{+2} -Bcl-2 و Bax بافت کبد رت های نر تحت القاء مزمون Dox انجام شد.

روش تحقیق

در این مطالعه تجربی ۴۰ سر رت نر ویستار (میانگین سن ۸ هفته و میانگین وزن ۲۰۰-۲۲۰ گرم) خردباری و به آزمایشگاه آزمایشگاه حیوانی جندی شاپور اهواز منتقل شدند. موش‌های صحرایی به مدت دو هفته جهت سازگاری در محیط آزمایشگاه نگهداری شدند و در این مدت هر دو روز یک بار قفس موش‌های صحرایی تعویض، شست و شو و از براده چوب استریل جهت جذب رطوبت و ادرار کف قفس استفاده می‌شد. این نکته قابل ذکر است که در تمام دوره تحقیق موش‌های صحرایی در شرایط استاندارد چرخه روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعته و دمای ۱۹ تا ۲۳ درجه سانتیگراد و رطوبت هوای ۵۵ تا ۶۵ درصد، تهیه‌ی مناسب و با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری می‌شدند. همچنین موش‌های صحرایی به مدت ۱۰ جلسه با سرعت 8 m/min در شب صفر درجه و به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه با هدف آشنازی با نوارگردان دویدند. در ادامه موش‌های صحرایی به روش تصادفی در ۵ گروه (n=۸)، (۱) کنترل سالم (سالین)، (۲) کنترل بیمار Dox ۲ mg/kg در ۷ دوز، (۳) Dox+کروسین (۲mg/kg)، (۴) تمرین، (۵) تمرین+Dox+کروسین (۳) در ۷ دوز، (۶) تمرین+کروسین را به صورت تزریق زیر صفاقی دریافت نمودند (۱۵)؛ گروه‌های ۴ و ۵ به مدت هشت هفته، پنج جلسه در هفته و هر جلسه ۱۶ تا ۴۰ دقیقه تمرینات تنابوی شدید را با شدت ۸۰ تا ۹۰ درصد و ۲ تا ۸ تنابو ۲ دقیقه ای انجام دادند (۱۷) و گروه‌های ۳ و ۶ روزانه ۱۰ mg/kg کروسین را به صورت گواژ دریافت نمودند (۱۸). ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین و پیش از ۱۶ ساعت ناشتاپی، موش‌های صحرایی با ترکیب از داروی

ریخته شد و به مدت ۱ دقیقه مخلوط گردید. پس از ۲۴ ساعت نمونه‌ها در سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. پس از خارج کردن از سانتریفیوژ مایع رویی تخلیه و روی آن ۱ سی سی الکل ۷۰ اضافه گردید. پس از Vortex کردن، مخلوط در سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۷۵۰۰ قرار گرفت. سپس مایع رویی با سرمپلر تخلیه گردید و سپس پلاک در داخل میکروتیوب خشک شد. به منظور حل کردن RNA به میزان ۲۰ لاندا آب مقطر ۶۰ درجه بر روی پلاک داخل میکروتیوب ریخته شد. سپس کمی با سرمپلر پیپتاژ و به مدت ۵ دقیقه بر روی RNA صفحه‌ی ۶۰ درجه قرار داده شد. برای بررسی درجه خلوص RNA با استفاده از خاصیت جذب نور در طول موج ۲۶۰ نانومتر و با کمک رابطه‌ی زیر می‌توان درجه خلوص نمونه‌ی RNA بررسی گردید $C(\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} \times \epsilon \times d/1000$

در ادامه RNA استخراج شده تا زمان استفاده در دمای -۸۰°C گرفت.

(گاواز) به موش‌های صحرایی خورانده شد. این نکته قابل ذکر است که جهت بررسی اثرات حلال کروسین و القا اثرات گاواز، گروه‌های کنترل سالم و بیمار هم به همان میزان نرمال سالین، به صورت گاواز دریافت کردند (۱۸).

تزریق دوکسوروبیسین

برای تزریق داروی دوکسوروبیسین این دارو از شرکت بلژیکی Ebeve تهیه شد. در ادامه برای آماده سازی دوکسوروبیسین برای ۷ روز 14 mg/kg در نرمال سالین حل شد و سپس روزانه معادل دوز 2 mg/kg دوکسوروبیسین به وسیله سرنگ انسولینی به صورت زیر صفاقی تزریق شد. با توجه به اثرات احتمالی ناشی از تزریق در گروه‌های دریافت‌کننده دوکسوروبیسین، به منظور یکسان‌سازی شرایط برای همه آزمودنی‌ها و ختنی نمودن اثر تزریق، گروه کنترل سالم نیز به همان میزان سالین (0.9 mg/kg) درصد) دریافت کرد (۱۶).

روش اندازه‌گیری متغیرها روش استخراج RNA

سترن cDNA^۱ بر اساس دستورالعمل موجود در کیت فرممتاز (Fermentas, USA) و واکنش رونویسی معکوس با استفاده از RevertAidTMM-MuLVReverse transcriptase آنزیم از cDNA تهیه گرفت. هنگام تهیه cDNA نمونه تخلیص شده پس از قرائت جذب، حجمی شامل ۱۰۰۰ نانوگرم RNA برداشته، سپس $0.5 \mu\text{l}$ میکرولیتر RandomHexamers (دئوكسی‌ریبو‌نوکلوتید^۱ که به عنوان یک پرایمر برای شروع سترن cDNA استفاده می‌شود)، $0.5 \mu\text{l}$ میکرولیتر oligodT و سپس تا حجم ۱۲ میکرولیتر آب موجود در کیت اضافه گردید و به دمای ۶۵ درجه به مدت ۵ دقیقه منتقل گردید و سپس به مدت ۲ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت. در مرحله بعد $4 \mu\text{l}$ از ۵XReactionBuffer و $2 \mu\text{l}$ dNTPMix از $1 \mu\text{l}$ RiboLockRNaseInhibitor و $1 \mu\text{l}$ RevertAidRT به ترکیب قبل که برای ۵ دقیقه در دمای ۶۵

RNA طبق پروتکل شرکت سازنده کیت (کیاژن، آلمان) انجام گرفت. بدین منظور $50 \mu\text{l}$ میلی‌گرم بافت از کبد در نیتروژن مایع خشک و پس از کوبیدن در آونگ استریل، درون $1/5$ قرار دادیم. اولین مرحله برای استخراج RNA از سلول-های حیوانی از بین بردن دیواره‌ی سلول‌ها با کمک یک بافر لیز کننده (در اینجا -۲۰۰ لاندا کیاژن) به نمونه (رسوب سلولی حاصل از سانتریفیوژ) اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت آن را در دمای -۸۰°C قرار گرفت. سپس پلاک موجود در کرایو‌تیوب را در حالت نیمه انجماد توسط سرمپلر خرد کرده، کمی آن را پیپتاژ کردیم. سپس به نمونه حدود ۱۰۰ لاندا کلروفرم اضافه شد تا سلول‌ها لیز شود. پس از ۱ دقیقه محلول را با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در ادامه مایع شفاف قسمت بالایی لوله که حاوی RNA بود به آرامی برداشته و در یک میکروتیوب DEPC شده قرار داده شد. سپس $1 \text{ \mu\text{l}}$ ایزوپروپانول بر روی RNA شفاف

¹ Deoxyribonucleotide

به جای MasterMix معمولی از MasterMix حاوی سایبرگرین (Takara) استفاده گردید. دمای اتصال برای همه پرایمرها 60°C می‌باشد. توالی پرایمرهای مورد استفاده نیز در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

پس از اتمام فعالیت دستگاه و مشاهده نمودارها مبنی بر افزایش $\Delta\Delta\text{C}_t$ تعداد قطعه مورد نظر و میزان نشر فلورسانس با محاسبه $\Delta\Delta\text{C}_t$ میزان تغییر در بیان ژن مورد نظر نسبت به GAPDH و حالت کنترل که فاقد محیط‌های تمایزی است، سنجیده شد.

قرار گرفته بود، اضافه شد. سپس ترکیب ابتدا به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵°C قرار گرفت. بعد از آن به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲°C قرار گرفت. در آخر به منظور از کار افتادن آنزیم RT، تیوب‌های واکنش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰°C درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. cDNA آماده شده جهت انجام RT-PCR مورد استفاده قرار گرفت یا جهت نگهداری به فریزر -60°C منتقل گردید. پس از بهینه‌سازی واکنش، cDNA مربوط به گروه‌های مورد آزمایش مطابق جدول زمانی ۷–۲ تحت واکنش RT-PCR قرار گرفتند. اصول انجام PCR مشابه RT-PCR معمولی بود با این تفاوت که

جدول ۱ - توالی پرایمرهای رفت و برگشت ژن‌های مورد نظر برای واکنش Real-time PCR

ژن	Forward پرایمر	Reverse پرایمر
GAPDH	5'-ACCCAGAAGACTGTGGATGG-3'	5'-TTCTAGACGGCAGGTCAGGT-3'
Bax	5'- GCTGGACATTGGACTTCCTC-3'	5'- ACCACTGTGACCTGCTCCA-3'
Bcl-2	5'-GCTGGACATTGGACTTCCTC-3'	5'- GCTGGACATTGGACTTCCTC-3'

$$\text{Ratio} = E^{-\{(\Delta CT_{\text{case}}) - (\Delta CT_{\text{control}})\}}$$

$$\Delta CT = CT_{\text{target}} - CT_{\text{reference}}$$

اگر بازده PCR را کامل در نظر بگیریم فرمول زیر قابل استفاده است:

$$\text{Ratio} = 2^{-\{(\Delta CT_{\text{case}}) - (\Delta CT_{\text{control}})\}}$$

و سپس با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta\text{C}_t}$ میزان بیان آن محاسبه گردید.

میکروسکوپ *Labomed*, بررسی شدند. تقسیم تصاویر با نرم افزار *j Image* انجام شد؛ با کمک این نرم افزار، ابتدا طیف رنگ آبی مربوز 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 (شکل‌های الف، ب، پ، ج و د).

روش تجزیه و تحلیل آماری

برای بررسی طبیعی بودن داده‌ها و تجانس واریانس گروه‌ها به ترتیب از آزمون‌های شاپیروویک و لوین استفاده شد. همچنین برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه همراه با

روش تهیه لام و رنگ آمیزی تریکروم ماسون

برای رنگ آمیزی تری کروم ماسون¹، قطعاتی از بافت کبد در فرمالین ۱۰ درصد، به مدت ۴۸ ساعت تثبیت شده و پس از پاساز بافتی، برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون، توسط میکروتوم دوارمده *Shandon-As 325* تهیی و بر روی لام قرار گرفتند. سپس لام‌ها پس از رنگ آمیزی به روش تری کروم ماسون مورد مطالعه هیستولوژی قرار گرفتند. اساس رنگ آمیزی تری کروم ماسون، شناسایی رشته‌های کلاژنی می‌باشد که به رنگ آبی مشاهده می‌شوند. برای به دست آوردن فیروز، از هر نمونه ۵ برش رنگ آمیزی شده، توسط دوربین *Deltapix* نصب شده روی

1 Trichrome Masson

بیمار به طور معنی‌داری پایین تر از گروه های دوکسوروپیسین+کروسین ($P=0.009$) و دوکسوروپیسین+تمرين ($P=0.001$) بود. با این وجود سطوح Bcl-2 در گروه کنترل همچنان سطوح گروه های دوکسوروپیسین+کروسین ($P=0.001$) و دوکسوروپیسین+تمرين ($P=0.001$) بود. معنی‌داری کمتر از گروه دوکسوروپیسین+تمرين+کروسین بود. با این وجود تفاوت معنی‌داری در سطوح Bcl-2 گروه دوکسوروپیسین+کروسین و دوکسوروپیسین+تمرين مشاهده نشد ($P=0.99$). (نمودار ۲)

سطوح نسبت Bax/Bcl-2 در گروه کنترل سالم ($P=0.0008$) به طور معنی داری کمتر از گروه کنترل بیمار (0.0032 ± 0.0004) بود ولی تفاوت معنی داری در سطوح ($P=0.075$) و (0.049 ± 0.001) بود. نسبت Bax/Bcl-2 در گروه کنترل سالم در مقایسه با دوکسوروپیسین+کروسین ($P=0.049 \pm 0.0041$) و دوکسوروپیسین+تمرین ($P=0.041 \pm 0.0132$)، دوکسوروپیسین+تمرین+کروسین ($P=0.0137 \pm 0.00514$) و دوکسوروپیسین+تمرین+کروسین ($P=0.011$) مشاهده نشد. با این وجود سطوح نسبت Bax/Bcl-2 در گروه کنترل بیمار به طور معنی داری بالاتر از گروه های دوکسوروپیسین+کروسین ($P=0.001$)، دوکسوروپیسین+تمرین ($P=0.001$) و دوکسوروپیسین+تمرین+کروسین ($P=0.001$) بود. اما تفاوت معنی داری در سطوح نسبت Bax/Bcl-2 در گروه های دوکسوروپیسین+کروسین ($P=0.099$) و دوکسوروپیسین+تمرین ($P=0.099$) مشاهده نشد. همچنین تفاوت معنی داری در سطوح نسبت Bax/Bcl-2 در گروه دوکسوروپیسین+تمرین+کروسین ($P=0.099$) مشاهده نشد. نمودار ($P=0.08$) مقایسه در با دوکسوروپیسین+تمرین+کروسین مشاهده نشد.

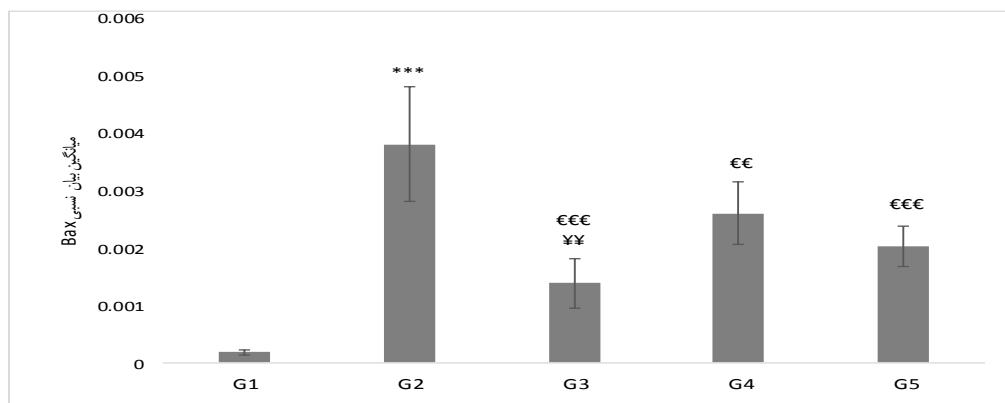
مقایسه میانگین‌های توکی در نرم افزار SPSS ویرایش ۲۱ استفاده شد. $(P < .05)$

ما فته ها

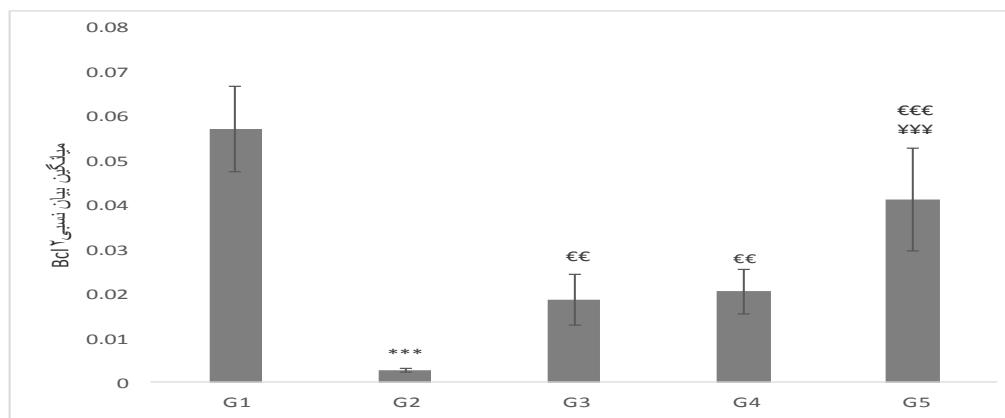
تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که تفاوت معنی‌داری در بیان ژن‌های Bax (F=۳۳/۹۳۹ P<0.001) و Bcl-2 (F=۳۶/۳۹۷ P<0.001) و نسبت Bax/Bcl-2 (F=۴۷/۸۳۳ P=0.001) بافت کبد موش‌های صحرابی گروه‌های تحقیق وجود دارد.

نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد بیان ژن Bax در گروه کنترل سالم (G1)، ($P=0.00018\pm0.0000034$) به طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه‌های کنترل بیمار (G2)، ($P=0.001$) و (G3)، ($P=0.009$)، دوکسوروبیسین+کروسین (G4)، ($P=0.004$) و (G5)، ($P=0.005$) و دوکسوروبیسین+تمرين (G6)، ($P=0.003$) بود. با این وجود سطوح بیان ژنی $p=0.001$ در گروه کنترل بیمار به طور معنی‌داری بالاتر از گروه Bax دوکسوروبیسین+کروسین ($P=0.001$)، دوکسوروبیسین+تمرين ($P=0.009$) و دوکسوروبیسین+کروسین ($P=0.001$) بود. همچنین سطوح بیان ژنی Bax در گروه دوکسوروبیسین+کروسین به طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه دوکسوروبیسین+تمرين بود ($P=0.008$). اگرچه تفاوت معنی‌داری در گروه دوکسوروبیسین+تمرين+کروسین در مقایسه با گروه‌های دوکسوروبیسین+کروسین ($P=0.032$) و دوکسوروبیسین+تمرين ($P=0.001$) مشاهده نشد (نمودار ۱).

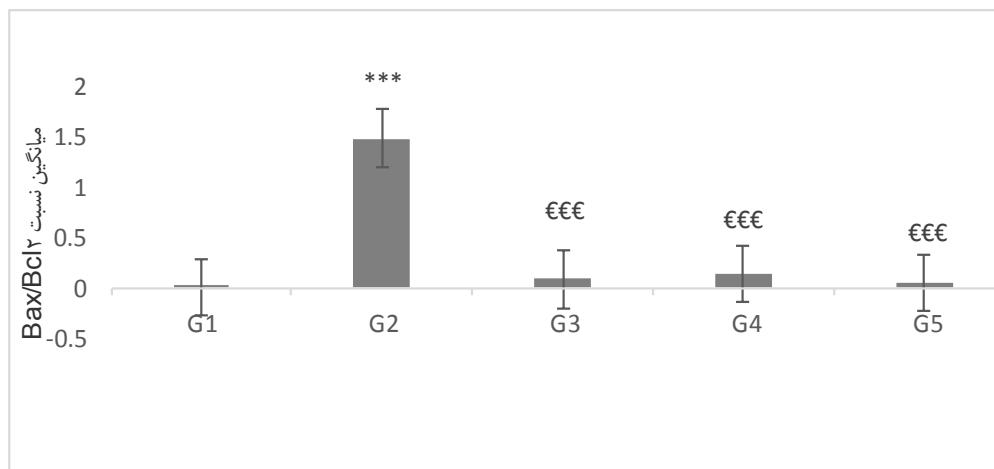
سطوح Bcl-2 در گروه کنترل سالم (0.0577 ± 0.0095) به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بیمار (0.01) و دوکسوروپیسین+کروسین (0.0026 ± 0.0096) و دوکسوروپیسین+تمرین (0.0185 ± 0.004) و دوکسوروپیسین+تمرین+کروسین (0.0205 ± 0.005) و



نمودار ۱- بیان نسبی Bax در گروه‌های تحقیق: داده‌ها به صورت میانگین±انحراف معیار نشان داده شده است.
G1 افزایش معنی‌دار نسبت به گروه G2 (P=۰/۰۰۸) و G3 (P=۰/۰۰۹) کاهش معنی‌دار نسبت به گروه G4 (P=۰/۰۰۱) ***
G3 افزایش معنی‌دار نسبت به گروه G4 (P=۰/۰۰۱) ***

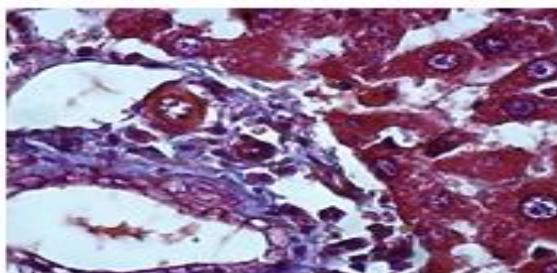


نمودار ۲- بیان نسبی Bcl-2 در گروه‌های تحقیق: داده‌ها به صورت میانگین±انحراف معیار نشان داده شده است.
G1 افزایش معنی‌دار نسبت به گروه G2 (P=۰/۰۰۳) و G3 (P=۰/۰۰۹) ***
G2 کاهش معنی‌دار نسبت به گروه G1 (P=۰/۰۰۱) ***
G3 افزایش معنی‌دار نسبت به گروه G4 (P=۰/۰۰۱) ***
G4 و گروه G5 کاهش معنی‌دار نسبت به گروه G2 (P=۰/۰۰۱) ***

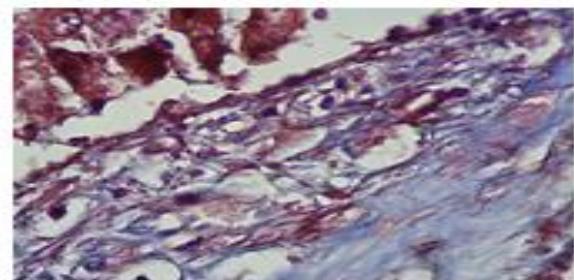


نمودار ۳- بیان نسبی Bax/Bcl-2 در گروه‌های تحقیق: داده‌ها به صورت میانگین±انحراف معیار نشان داده شده است.
G1 افزایش معنی‌دار نسبت به گروه G2 (P=۰/۰۰۱) ***
G2 کاهش معنی‌دار نسبت به گروه G1 (P=۰/۰۰۱) ***

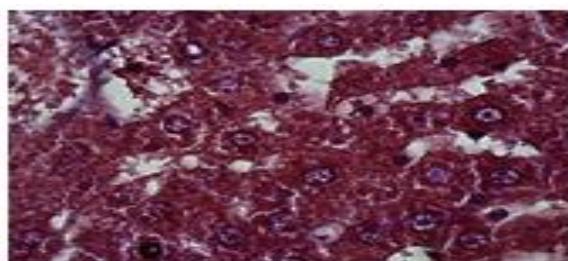
برای مقایسه فیروز کبدی بین گروه‌ها نتایج روش تریکروماسون نشان داد فیروز در گروه کنترل بیمار 55% بالاترین حد می‌باشد (شکل الف)، در گروه تمرین تناوبی شدید+دوکسوروپیسین فیروز 40% است (شکل ب) که می‌توان نتیجه گرفت تمرین تناوبی شدید 15% از فیروز را کم کرده است، در گروه تمرین تناوبی+دوکسوروپیسین+کروسین فیروز 30% می‌باشد (شکل پ) که نشان می‌دهد ترکیب تمرین و کروسین اثرات سمی دارو و فیروز را زیر قابل مشاهده می‌باشد.



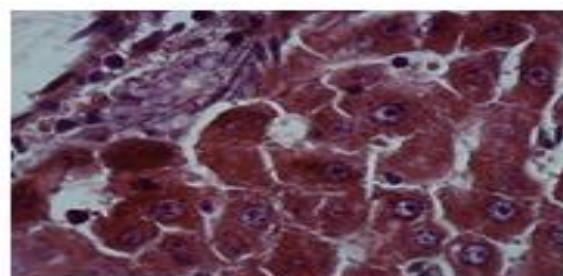
شکل ب- گروه تمرین تناوبی شدید + دوکسوروپیسین



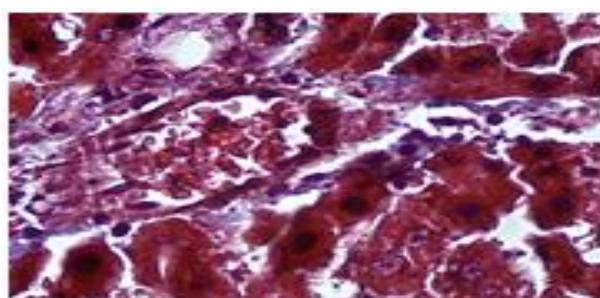
شکل الف- گروه کنترل بیمار



شکل ج- گروه کنترل سالم



شکل پ- گروه تمرین تناوبی+دوکسوروپیسین+کروسین



شکل د- گروه تمرین تناوبی+کروسین

پراکسیداسیون لیپیدی شده و اسیدهای چرب غیر اشبع موجود در غشا سلول را محافظت می‌کند؛ در واقع مصرف زعفران و کروسین با افزایش آتنی اکسیدان‌ها، کاهش استرس اکسیداتیو، بهبود نیمرخ چربی و آنزیم‌های کبدی متabolیسم کبد را بهبود می‌بخشد و منجر به کاهش آپوپتوز بافت کبد می‌گردد (۲۵). در این راستا مطالعات نشان دادند مصرف کروسین موجب کاهش سطوح سرمی آنزیم‌های کبدی گردید (۲۶)؛ ناهمسو با مطالعه حاضر نتایج مطالعه‌ای نشان داد، مصرف ۱۵ mg/kg زعفران اثر معنی‌داری بر کاهش آنزیم‌های کبدی زنان مبتلا به دیابت نوع ۲ نداشت (۲۵). به نظر می‌رسد دوز مصرفی و طول دوره مصرف عاملی حائز اهمیت در اثرگذاری این گیاه دارویی باشد، نتایج مطالعه حاضر نشان داد تمرین HIIT و مصرف کروسین دارای اثر تعاملی در کاهش Bax و افزایش Bcl-2 در بافت کبد رت‌های مسموم شده با DOX گردید. به نظر می‌رسد تمرینات HIIT و کروسین هر دو از مسیرهای مشابه مانند کاهش ROS، پیشگیری از رهایش سیتوکروم C، کاهش پراکسیداسیون t-Bid، Bad، Bak، Bax، موجب کاهش آپوپتوز بافت کبد می‌گردد (۲۵ و ۲۶).

همچنین تمرینات ورزشی همراه با مصرف کروسین دارای اثرات ضد آپوپتوزی در بافت قلب رت‌های چاق شده با غذای پرچرب می‌باشند، همچنین تمرینات HIIT اثر معنی‌داری بر تغییرات Bcl-2 نداشت (۱۸). این یافته، نشان می‌دهند استفاده از مکمل کروسین در کنار تمرینات HIIT، نسبت به انجام تمرینات تناوبی و مصرف کروسین به تهایی، اثرات بهتری بر پیشگیری و کاهش عوارض کبدی ناشی Bcl-2 از درمان به وسیله DOX دارد. با توجه به افزایش سطوح Bcl-2 به عواملی چون استرس اکسیداتیو وابسته است و تمرینات مطالعه حاضر از نوع HIIT بود، عدم اندازه‌گیری سطوح فاکتورهای دیگری همانند کاسپیازها و آنزیم‌های خونی در مطالعه حاضر می‌باشد. از این رو پیشنهاد می‌گردد در مطالعات آتنی این عوامل اندازه‌گیری شوند.

نتایج تحقیقات نشان داده است، Dox موجب کاهش بیان Bcl-2 و افزایش Bax در بافت کبد رت‌ها می‌گردد. مطالعات نشان داده‌اند که دارویی Dox اثرات سمی این دارو بر سلول مرتبط با تولید رادیکال‌های آزاد است (۱۹). داروی Dox آپوپتوز را از طریق فعال‌سازی کاسپاز -۸، کاسپاز -۹، رهایش سیتوکروم-C به درون سیتوپلاسم، فعال‌سازی پروتئین P53، افزایش Bax و کاهش Bcl-xl ۲ القا می‌کند (۲۰). در مطالعات پیشین Dox موجب افزایش سطوح Bcl-xl آنزیم‌های کبدی، فیبروز کبدی و افزایش نسبت P53 به درون سلول‌های سرطانی کبد موش‌های آزمایشگاهی گردید (۲۱). از سویی یافته‌های این مطالعه نشان داد هشت هفته تمرین HIIT موجب کاهش Bax در کبد رت‌های مسموم شده با DOX گردید و افزایش سطوح Bcl-2 کبدی متعاقب تمرینات HIIT در رت‌های مسموم شده با DOX معنی‌دار نبود، فعالیت بدنی از طریق کاهش ROS و پیشگیری از رهایش سیتوکروم C، مهار فعالیت کاسپیازها و t-Bid، Bad، Bak، Bax، موجب کاهش سطوح Bax و افزایش Bcl-2 می‌گردد (۲۲). تمرینات منظم و هوایی مهار پروتئین P53، موجب کاهش سطوح t-Bid، Bad، Bak، Bax، و افزایش Bax می‌گردند (۲۳). اگرچه مشابه با این مطالعه مطالعاتی نشان داده‌اند که تمرین HIIT اثرات مطلوبی بر آپوپتوز دارد ولی نتایج مطالعات در ارتباط با تاثیر تمرین HIIT هنوز مهم است و این عوامل به نوع، شدت، طول دوره تمرین و سطوح اولیه عوامل پیش‌برنده آپوپتوز مانند استرس اکسیداتیو و التهاب دارد (۲۴). مصرف کروسین موجب افزایش Bcl-2 و کاهش Bax در بافت کبد رت‌های مسموم شده با DOX گردید. کروسین از طریق کاهش رادیکال‌های آزاد، کاهش

بحث

مهمنتین یافته این پژوهش، حاکی از این بود که استفاده از مکمل کروسین در کنار تمرینات HIIT، اثرات بهتری بر پیشگیری و کاهش عوارض کبدی ناشی از درمان به وسیله DOX دارد. نتایج تحقیقات نشان داده است، Dox موجب کاهش بیان Bcl-2 و افزایش Bax در بافت کبد رت‌ها می‌گردد. مطالعات نشان داده‌اند که داروی Dox اثرات سمی این دارو بر سلول مرتبط با تولید رادیکال‌های آزاد است (۱۹). داروی Dox آپوپتوز را از طریق فعال‌سازی کاسپاز -۸، کاسپاز -۹، رهایش سیتوکروم-C به درون سیتوپلاسم، فعال‌سازی پروتئین P53، افزایش Bax و کاهش Bcl-xl آنزیم‌های کبدی، فیبروز کبدی و افزایش نسبت P53 به درون سلول‌های سرطانی کبد موش‌های آزمایشگاهی گردید (۲۱). از سویی یافته‌های این مطالعه نشان داد هشت هفته تمرین HIIT موجب کاهش Bax در کبد رت‌های مسموم شده با DOX گردید و افزایش سطوح Bcl-2 کبدی متعاقب تمرینات HIIT در رت‌های مسموم شده با DOX معنی‌دار نبود، فعالیت بدنی از طریق کاهش ROS و پیشگیری از رهایش سیتوکروم C، مهار فعالیت کاسپیازها و t-Bid، Bad، Bak، Bax، و افزایش Bax می‌گردد (۲۲). تمرینات منظم و هوایی مهار پروتئین P53، موجب کاهش سطوح t-Bid، Bad، Bak، Bax، و افزایش Bax می‌گردند (۲۳). اگرچه مشابه با این مطالعه مطالعاتی نشان داده‌اند که تمرین HIIT اثرات مطلوبی بر آپوپتوز دارد ولی نتایج مطالعات در ارتباط با تاثیر تمرین HIIT هنوز مهم است و این عوامل به نوع، شدت، طول دوره تمرین و سطوح اولیه عوامل پیش‌برنده آپوپتوز مانند استرس اکسیداتیو و التهاب دارد (۲۴). مصرف کروسین موجب افزایش Bcl-2 و کاهش Bax در بافت کبد رت‌های مسموم شده با DOX گردید. کروسین از طریق کاهش رادیکال‌های آزاد، کاهش

¹ Peroxisome Gamma (PPAR- γ)

نظر می‌رسد دوز مصرفی و طول دوره مصرف عاملی حائز اهمیت در اثرگذاری این گیاه دارویی باشد، نتایج مطالعه حاضر نشان داد تمرین HIIT و مصرف کروسین دارای اثر تعاملی در کاهش Bax و Bcl-2 در بافت کبد رت‌های مسموم شده با DOX گردید. افزایش ROS، پیشگیری از رهایش سیتوکروم C، کاهش پراکسیداسیون لیپیدی، مهار کاسپازها، مهار پروتئین P53، کاهش t-Bid، Bad، Bak گردند (۲۵ و ۲۶). همچنین تمرینات ورزشی همراه با مصرف کروسین دارای اثرات ضد آپوپتوزی در بافت قلب رت‌های چاق شده با غذای پرچرب می‌باشند، همچنین تمرینات HIIT اثر معنی‌داری بر تغییرات Bcl-2 نداشت (۱۸).

نتیجه‌گیری

استفاده از مکمل کروسین در کنار تمرینات HIIT، نسبت به انجام تمرینات تناوبی و مصرف کروسین به تنها‌یابی، اثرات بهتری بر پیشگیری و کاهش عوارض کبدی ناشی از درمان به وسیله DOX دارد. با توجه به افزایش سطوح Bcl-2 به عواملی چون استرس اکسیداتیو وابسته است و تمرینات مطالعه حاضر از نوع HIIT بود، عدم اندازه‌گیری سطوح فاکتورهای دیگری همانند کاسپازها و آنزیمهای خونی در مطالعه حاضر می‌باشد. از این رو پیشنهاد می‌گردد در مطالعات آتی این عوامل اندازه‌گیری شوند.

تقدیر و تشکر

مقاله حاضر برگرفته از پایان نامه دکتری فیزیولوژی ورزشی دانشگاه آزاد، واحد شوشتر می‌باشد. نویسنده‌گان از تمامی کارکنان گروه علوم تشریح دانشگاه جندی شاپور اهواز و نیز گروه فیزیولوژی جانوری دانشکده علوم دانشگاه شهید چمران اهواز که در انجام این پژوهش زحمت فراوانی را تقبل فرمودند کمال تشکر و قدردانی را دارند.

سازی کاسپاز - ۸، کاسپاز - ۹، رهایش سیتوکروم C به درون سیتوپلاسم، فعال‌سازی پروتئین P53، افزایش Bax و کاهش Bcl-xl (۲۰). در مطالعات پیشین Dox موجب افزایش سطوح آنزیمه‌های کبدی، فیبروز کبدی و افزایش نسبت P53 به Bcl-xl (۲۰). از سویی یافته‌های این مطالعه نشان داد هشت هفته تمرین HIIT موجب کاهش Bax، در کبد رت‌های مسموم شده با DOX گردید و افزایش سطوح Bcl-2 کبدی متعاقب تمرینات HIIT در رت‌های مسموم شده با DOX معنی‌دار نبود، فعالیت بدنی از طریق کاهش ROS و پیشگیری از رهایش سیتوکروم C، مهار فعالیت کاسپازها و t-Bid، Bad، Bak، P53، موجب کاهش سطوح Bax و افزایش Bcl-2 می‌گردد (۲۲). تمرینات منظم و هوایی موجب پیشگیری از آپوپتوز بافت کبد در رت‌های مبتلا به کبد چرب غیر الکلی گردید، تمرینات ورزشی با کاهش ROS، افزایش گلوتاتیون پراکسیداز و افزایش گیرنده پروکسی زوم گاما موجب بهبود متابولیسم سلول‌های کبد و پیشگیری از آپوپتوز می‌گردد (۲۳)؛ اگرچه مشابه با این مطالعه مطالعاتی نشان داده‌اند که تمرین HIIT اثرات مطلوبی بر آپوپتوز دارد ولی نتایج مطالعات در ارتباط با تأثیر تمرین HIIT هنوز میهم است و این عوامل به نوع، شدت، طول دوره تمرین و سطوح اولیه عوامل پیشبرنده آپوپتوز مانند استرس اکسیداتیو و التهاب دارد (۲۴). مصرف کروسین موجب افزایش Bcl-2 و کاهش Bax در بافت کبد رت‌های مسموم شده با DOX گردید. کروسین از طریق کاهش رادیکال‌های آزاد، کاهش پراکسیداسیون لیپیدی شده و اسیدهای چرب غیر اشباع موجود در غشا سلول را محافظت می‌کند (۲۵)؛ در واقع مصرف زعفران و کروسین با افزایش آنتی‌اکسیدان‌ها، کاهش استرس اکسیداتیو، بهبود نیمرخ چربی و آنزیمه‌های کبدی متابولیسم کبد را بهبود می‌بخشد و منجر به کاهش آپوپتوز بافت کبد می‌گردد (۲۶)؛ در این راستا مطالعات نشان دادند مصرف کروسین موجب کاهش سطوح سرمی آنزیمه‌های کبدی گردید (۲۷)؛ ناهمسو با مطالعه حاضر نتایج مطالعه‌ای نشان داد، مصرف ۱۵ mg/kg زعفران اثر معنی‌داری بر کاهش آنزیمه‌های کبدی زنان مبتلا به دیابت نوع ۲ نداشت (۲۸)؛ به

پژوهش حاضر وجود ندارد.

تضاد منافع

نویسنده‌گان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافعی در

منابع:

- 1- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. CA Cancer J Clin. 2015; 65(1): 5-29 DOI: 10.3322/caac.21254
- 2- Li M, Xiong Z-G. Ion channels as targets for cancer therapy. Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol. 2011; 3(2): 156-162.
- 3- Dadban Shahamat M, Dabidi Roshan V, Farazmandfar T. Effect of Continuous Aerobic Exercise on Bax/ Bcl-2 Ratio and Doxorubicin-induced Liver Toxicity in Aging model Rats. J Mazandaran Univ Med Sci. 2018; 28 (165): 36-46. [Persian]
- 4- Rahmani F, Najafizadeh 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): 1-8.
- 5- 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. Respir. Environ. Exerc. Physiol. 1978; 45(6): 927–932. DOI: 10.1152/jappl.1978.45.6.927.
- 6- Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of Apoptosis in disease. Aging (Albany NY). 2012 May 31; 4(5): 330-49. DOI: 10.18632/aging.100459
- 7- Laulier C, Lopez BS. The secret life of Bcl-2: Apoptosis-independent inhibition of DNA repair by Bcl-2 family members. Mutat Res. 2012; 751(2): 247-57. DOI: 10.1016/j.mrrev.2012.05.002
- 8- Ghahremani M, Azarbajani M, Piri M, Raoufi A. Effect of Frequency Aerobic Exercise on Expression of Bcl-2 and Bax Gene in Mice With Myocardial Infarction. Armaghane-danesh. 2018; 22 (6): 781-791. [Persian]
- 9- TeSlaa T, Setoguchi K, Teitel MA. Mitochondria in human pluripotent stem cell apoptosis. Semin Cell Dev Biol. 2016; 52: 76-83. DOI: 10.1016/j.semcd.2016.01.027
- 10- Sadat-Hoseini S K, Dabidi Roshan V. The effect of six weeks of voluntary wheel running exercise on hepatic superoxide dismutase levels and apoptosis-inducing factor after doxorubicin administration in aging model rats. Feyz. 2018; 22 (3): 267-273. [Persian]
- 11- Farzanegi P, Habibian M, Alinejad H. The Combined Effect of Regular Aerobic Exercise with Garlic Extract on Renal Apoptosis Regulatory Factors in Aged rats with Chronic Kidney Disease. J Arak Univ Med Sci. 2016; 19 (3): 62-70. [Persian]
- 12- Dadban-Shahamat, M, Dabidi-Roshan, V, &Farazmandfar, T. The protective effect of 6 weeks of voluntary training on liver apoptosis induced by doxorubicin in aging model rats. J Isfahan Med Sch, 2018; 36(465): 14-21. [Persian]
- 13- Razavi BM, Hosseinzadeh H, Movassaghi AR, Imenshahidi M, Abnous K. Protective effect of crocin on diazinon induced cardiotoxicity in rats in subchronic exposure. Chem Biol Interact, 2013; 203(3): 547-55. DOI: 10.1016/j.cbi.2013.03.010
- 14- Srivastava R, Ahmed H, Dixit R, Saraf S. Crocus sativus L.: a comprehensive review. Pharmacogn Rev. 2010; 4(8): 200-208. DOI: 10.4103/0973-7847.70919
- 15- Chen S, Zhao S, Wang X, Zhang L, Jiang E, Gu Y, et al. Crocin inhibits cell proliferation and enhances cisplatin and pemetrexedchemosensitivity in lung cancer cells. Tlcr, Transl Lung Cancer Res, 2015; 4(6): 775–783. DOI: 10.3978/j.issn.2218-6751.2015.11.03
- 16- Hassanpour G, Nikbakht H, Azarbajani M, Shakeri N, Abednazari H. The Effect of Interval and Continued Trainings with Crocin on Apoptotic Markers in the Heart Tissue of High-Fat Diet and Streptozotocin Induced Type 2 Diabetic Rats. Rep Health Care, 2017; 3(3): 58-70

- 17- Rezaei R, Nurshahi M, Bigdeli M. R, Khodagoli F, A H. Effect of eight weeks of continuous and periodic aerobic training on VEGF-A and VEGFR-2 levels of male brain Wistar rats. *J Sports Exerc Psychol.* 2015; 16: 1213-1221.
- 18- Elsherbiny NM, Salama MF, Said E, El-Sherbiny M, Al-Gayyar MM. Crocin protects against doxorubicin-induced myocardial toxicity in rats through down-regulation of inflammatory and apoptic pathways. *Chem Biol Interact.* 2016; 247: 39-48 DOI: 10.1016/j.cbi.2016.01.014
- 19- Chicco AJ, Hydock DS, Schneider CM, Hayward R. Low intensity exercise training during doxorubicin treatment protects against cardiotoxicity. *J ApplPhysiol* (1985). 2006; 100(2): 519-27. DOI: 10.1152/japplphysiol.00148.2005
- 20- Wang G, Zhang J, Liu L, Sharma S, Dong Q. Quercetin potentiates doxorubicin mediated antitumor effects against liver cancer through p53/Bcl-xl. *PloS one.* 2012; 7(12): e51764. DOI: 10.1371/journal.pone.0051764
- 21- Szántó M, Rutkai I, Hegedus C, Czikora A, Rózsahegyi M. Poly (ADP-ribose) polymerase-2 depletion reduces doxorubicin-induced damage through SIRT1 induction. *Cardiovasc Res.* 2011; 92: 430–438. DOI: 10.1093/cvr/cvr246
- 22- Llambi F, Green DR. Apoptosis and oncogenesis: give and take in the BCL-2 family. *Curr Opin Genet Dev.* 2011; 21(1): 12–20. DOI: 10.1016/j.gde.2010.12.001
- 23- Razavi Majd Z, Matin Homaei H, Azarbayjani M A, Farzanegi P. Effects of Concurrent Regular Aerobic Training and Garlic Extract on Cardiac Tissue Apoptosis Markers in Aged Rats with Chronic Kidney Disease. *J Med Plant Res.* 2017; 2(62): 46-54. [Persian]
- 24- Farzanegi P, Dana A, Ebrahimpoor Z, Asadi M, Azarbayjani M A. Mechanisms of beneficial effects of exercise training on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): Roles of oxidative stress and inflammation. *Eur J Sport Sci.* 2019; 19(7): 994-1003. DOI: 10.1080/17461391.2019.1571114.
- 25- Barra N G, Fan I Y, Gillen J B, Chew M, Marcinko K, Steinberg G R, et al. High intensity interval training increases natural killer cell number and function in obese breast cancer-challenged mice and obese women. *J Cancer Prev.* 2017; 22(4), 260. DOI: 10.15430/JCP.2017.22.4.260.
- 26- Milajerdi A, Jazayeri S, Hashemzadeh N, Shirzadi E, Derakhshan Z, Djazayeri A, et al. The effect of saffron (*Crocus sativus* L.) hydroalcoholic extract on metabolic control in type 2 diabetes mellitus: A triple-blinded randomized clinical trial. *J Res Med Sci.* 2018; 23: 16. DOI: 10.4103/jrms.JRMS_286_17
- 27- Huang H Y, Chen Y C, Wang P C, Tsai M A, Yeh S C, Liang H J, et al. Efficacy of a formalin-inactivated vaccine against *Streptococcus iniae* infection in the farmed grouper *Epinepheluscoioides* by intraperitoneal immunization. *Vaccine.* 2014; 32(51): 7014-7020. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.08.039