

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 Moradi¹, Saeid Shakerian², Masoud Nikbakht²

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+crocine (10 mg/kg), Dox+HIIT, and Dox+HIIT+crocine. 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

مقدمه

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. دوکسوروبیسین^۱ (Dox)، یکی از داروهای شیمی درمانی است که در درمان رشد غیر طبیعی سلول ها (نتوپلاسم 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 (۳، ۴). داروی Dox با مکانیسم هایی از قبیل تولید گونه های فعال اکسیژن^۲ (ROS) و فعال سازی مسیرهای آپوپتوزی موجب ازهم 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 هموستاز بافتی می باشد که از دو مسیر بیرونی و درونی اتفاق می افتد (۵). هرگونه اختلال در روند آپوپتوز، کاهش یا افزایش نامتعرف مرگ سلولی و در نهایت بیماری را موجب می شود (۶). مشخص شده است که دوکسوروبیسین، 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 پیش برنده آپوپتوز (Bax)، فعال می شود و با افزایش بیان ژن و پروتئین های آنتی آپوپتیک (از جمله BCL-2 و Bcl-XL) متوقف می شود، همچنین پروتئین BCL-2 با جلوگیری از آزادسازی سیتوکروم C از میتوکندری وقوع آپوپتوز را مهار می کند (۷). در حالی که پروتئین Bax با خنثی کردن عمل Bcl-2 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

اندوپلاسمیک، آزادسازی 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 Bcl-2 و Bax 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 نسب 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) موجب بر هم خوردن تعادل اکسیدان ها و آنتی-اکسیدان ها و افزایش استرس اکسیداتیو و برخی موجب کاهش استرس اکسیداتیو می گردند (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 و بهبود شاخص های متابولیکی در محیط های Invivo و Invitro (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 training⁴ Crocin¹Doxorubicin²Reactive oxygen Species

کتامین و زایلازین (به ترتیب ۹۰ و ۱۰ mg/kg) به صورت تزریق صفاقی بیهوش شدند، و پس از شکافتن حفره شکمی، بافت کبد به دقت جدا و پس از شستشو با آب مقطر و توزین، بلافاصله در فریزر با دمای ۷۰- درجه سانتیگراد برای اندازه‌گیری سطوح بیان ژنی متغیرها قرار گرفتند.

پروتکل تمرین

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 موش‌های صحرایی در هفته اول ۲ تکرار ۲ دقیقه‌ای را با شدت بالا (۸۰ درصد) و یک تکرار ۲ دقیقه‌ای 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 دقیقه‌ای 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 انتها 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 دوکسوروبیسین بر عملکرد موش‌های صحرایی، شدت آن تعدیل گردید. کلیه موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی در این تحقیق بر اساس موازین اخلاقی مصوب با استانداردهای اخلاقی در تحقیقات وزارت علوم، و با کد IR.SSRC.REC.1397.005 رعایت گردید.

نحوه مصرف کروسین

برای تهیه کروسین با درجه خلوص ۹۸ درصد از شرکت سیگمای آمریکا با کد اقتصادی 17304-1G خریداری شد. سپس مقدار ۱۰ میلی گرم کروسین حل شده در حجمی معادل ۱۰ ml/kg نرمال سالین حل شد و در ادامه به مدت ۸ هفته به صورت خوراکی

همچنین با توجه به عوارض جانبی جبران‌ناپذیر این دارو انجام مطالعات این چینی 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 کروسین بر بیان ژن Bcl-2 و Bax بافت کبد رت‌های نر تحت القاء مزمن Dox انجام شد.

روش تحقیق

در این مطالعه تجربی ۴۰ سر رت نر ویستار (میانگین سن ۸ هفته و میانگین وزن ۲۲۰-۲۰۰ گرم) خریداری 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، تهویه‌ی مناسب و با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری می‌شدند. همچنین موش‌های صحرایی به مدت ۱۰ جلسه با سرعت ۸ m/min تا ۱۰ در شیب صفر درجه و به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه با هدف آشنایی 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) Dox+تمرین، (۵) Dox+تمرین+کروسین تقسیم شدند. در ادامه گروه‌های ۲ تا ۵ روزانه ۲mg/kg دوکسوروبیسین 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 تناوبی شدید را با شدت ۸۰ تا ۹۰ درصد و ۲ تا ۸ تناوب ۲ دقیقه‌ای انجام دادند (۱۷) و گروه‌های ۳ و ۵ روزانه ۱۰ mg/kg کروسین را به صورت گاوژ دریافت نمودند (۱۸). ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین و پس از ۱۶ ساعت ناشتایی، موش‌های صحرایی با ترکیبی از داروی

(گاواژ) به موش های صحرایی خوراندند. این نکته قابل ذکر است که جهت بررسی اثرات حلال کروسین و القا اثرات گاواژ، گروه های کنترل سالم و بیمار هم به همان میزان نرمال سالین، به صورت گاواژ 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 2 mg/kg دوکسوروبیسین به وسیله سرنگ انسولینی به صورت زیر صفاقی تزریق شد. با توجه به اثرات احتمالی ناشی از تزریق در گروه های دریافت کننده دوکسوروبیسین، به منظور یکسان سازی شرایط برای همه آزمودنی ها و خنثی نمودن اثر تزریق، گروه کنترل سالم نیز به همان میزان سالین (سدیم کلراید $0/9$ درصد) دریافت کرد (۱۶).

روش اندازه گیری متغیرها

روش استخراج RNA

برای استخراج RNA طبق پروتکل شرکت سازنده کیت (کیژن، آلمان) انجام گرفت. بدین منظور ۵۰ میلی گرم بافت از کبد در نیتروژن مایع خشک و پس از کوبیدن در آونگ استریل، درون تیوب $1/5$ قرار دادیم. اولین مرحله برای استخراج RNA از سلول های حیوانی از بین بردن دیواره ی سلول ها با کمک یک بافر لیز کننده (در اینجا -۲۰۰ لاندا کیزول) به نمونه (رسوب سلولی حاصل از سانتریفیوژ) اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت آن را در دمای -80 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 سلول ها 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 ۱ سی سی ایزوپروپانول بر روی RNA شفاف

ریخته شد و به مدت ۱ دقیقه مخلوط گردید. پس از ۲۴ ساعت نمونه ها 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 سمپلر 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 صفحه ی ۶۰ درجه قرار داده شد. برای بررسی درجه خلوص RNA با استفاده از خاصیت جذب نور در طول موج ۲۶۰ نانومتر و با کمک رابطه ی زیر می توان درجه خلوص نمونه ی RNA بررسی گردید

$$C (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A260 \times \epsilon \times d/1000$$

در ادامه RNA استخراج شده تا زمان استفاده در دمای -80 قرار گرفت.

سنتز cDNA

سنتز cDNA بر اساس دستورالعمل موجود در کیت فرمنتاز (Fermentas, USA) و واکنش رونویسی معکوس با استفاده از آنزیم RevertAid™-MuLVReverse transcriptase صورت گرفت. هنگام تهیه cDNA از نمونه تخلیص شده پس از قرائت جذب، حجمی شامل ۱۰۰۰ نانوگرم RNA برداشته، سپس ۰/۵ میکرولیتر RandomHexamers (دئوکسی ریبو نوکلوتید^۱ که به عنوان یک پرایمر برای شروع سنتز cDNA استفاده می شود)، ۰/۵ 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 5XReactionBuffer و $2 \mu\text{l}$ از dNTPMix و $1 \mu\text{l}$ از RiboLockRNaseInhibitor و $1 \mu\text{l}$ از RevertAidRT به ترکیب قبل که برای ۵ دقیقه در دمای ۶۵

¹ Deoxyribonucleotide

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

به جای MasterMix معمولی از MasterMix حاوی سایبرگرین (Takara) استفاده گردید. دمای اتصال برای همه پرایمرها °C ۶۰ 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 تعداد قطعه مورد نظر و میزان نشر فلورسانس با محاسبه $\Delta\Delta C_t$ میزان تغییر در بیان ژن مورد نظر نسبت به GAPDH و حالت کنترل که فاقد محیط‌های تمایزی است، سنجیده شد.

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

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

$$\text{Ratio} = E^{-\{(\Delta C_{\text{case}}) - (\Delta C_{\text{control}})\}} \quad \Delta C_t = C_{\text{target}} - C_{\text{reference}}$$

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

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

و سپس با استفاد از فرمول $2^{-\Delta\Delta C_t}$ میزان بیان آن محاسبه گردید.

روش تهیه لام و رنگ آمیزی تریکروم ماسون

برای رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون^۱، قطعاتی از بافت کبد در فرمالین ۱۰ درصد، به مدت ۴۸ ساعت تثبیت شده و پس از پاساژ بافتی، برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون، توسط میکروتوم دوارمدل Shandon-As 325، تهیه و بر روی لام قرار گرفتند. سپس لام‌ها پس از رنگ‌آمیزی به روش تری کروم ماسون مورد مطالعه هیستولوژی قرار گرفتند. اساس رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون، شناسایی رشته‌های کلاژنی می‌باشد که به رنگ آبی مشاهده می‌شوند. برای به‌دست آوردن فیبروز، از هر نمونه ۵ برش رنگ آمیزی شده، توسط دوربین Deltapix نصب شده روی

1 Trichrome Masson

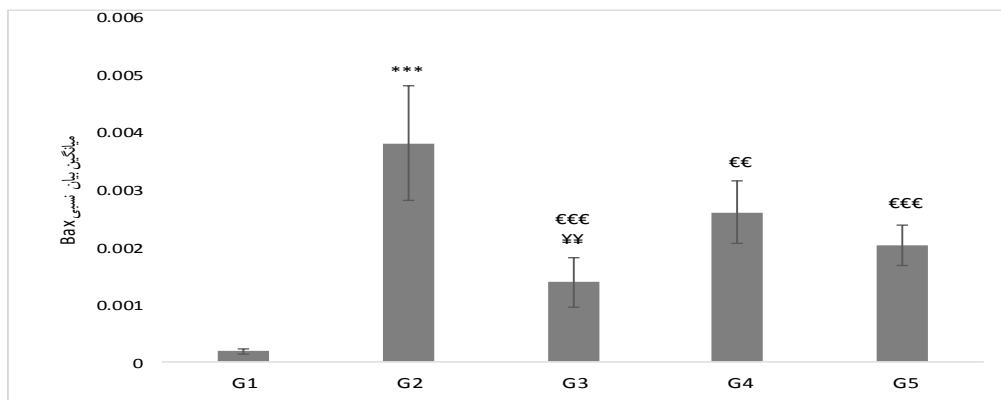
میکروسکوپ Labomed بررسی شدند. تفسیر تصاویر با نرم افزار Image J انجام شد؛ با کمک این نرم افزار، ابتدا طیف رنگ آبی مربوط به نواحی فیبروز انتخاب و سپس سایر پیکسل‌های تصویر حذف و با شمارش پیکسل‌های طیف فیبروز و تقسیم آن به کل پیکسل‌های تصویر، میزان فیبروز محاسبه شد (شکل‌های الف، ب، پ، ج و د).

روش تجزیه و تحلیل آماری

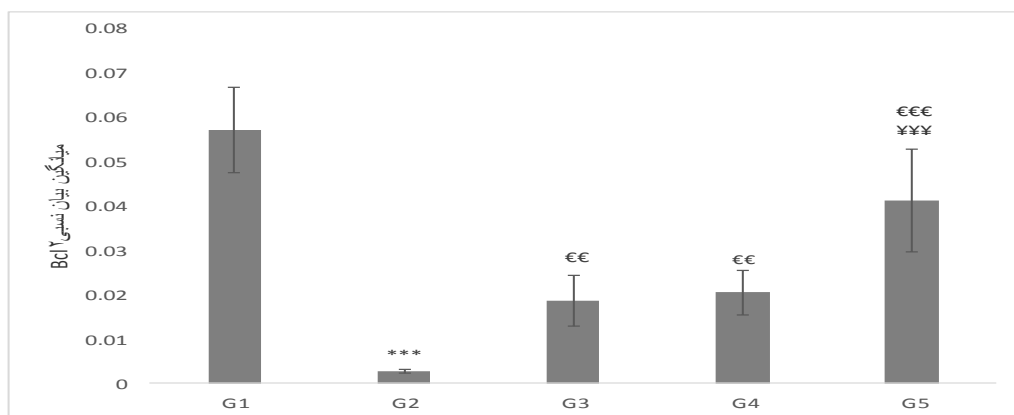
برای بررسی طبیعی بودن داده‌ها و تجانس واریانس گروه‌ها به-ترتیب از آزمون‌های شاپیروویلک و لوین استفاده شد. همچنین برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه همراه با

سطوح نسبت Bax/Bcl-2 در گروه کنترل سالم ($0/0008 \pm 0/032$) به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بیمار ($0/001 \pm 0/49$ و $P=0/001$) بود ولی تفاوت معنی‌داری در سطوح نسبت Bax/Bcl-2 در گروه کنترل سالم در مقایسه با دوکسوروبیسین+کروسین ($0/98 \pm 0/49$ و $P=0/001$) و دوکسوروبیسین+تمرین ($0/90 \pm 0/41$ و $P=0/001$)، دوکسوروبیسین+تمرین+کروسین ($0/99 \pm 0/137$ و $P=0/001$) مشاهده نشد. با این وجود سطوح نسبت Bax/Bcl-2 در گروه کنترل بیمار به طور معنی‌داری بالاتر از گروه‌های دوکسوروبیسین+کروسین ($P=0/001$)، دوکسوروبیسین+تمرین ($P=0/001$) و دوکسوروبیسین+تمرین+کروسین ($P=0/001$) بود. اما تفاوت معنی‌داری در سطوح نسبت Bax/Bcl-2 در گروه دوکسوروبیسین+کروسین نسبت به گروه‌های دوکسوروبیسین+تمرین ($P=0/99$) و دوکسوروبیسین+تمرین+کروسین ($P=0/99$) مشاهده نشد. همچنین تفاوت معنی‌داری در سطوح نسبت Bax/Bcl-2 در گروه دوکسوروبیسین+تمرین در مقایسه با دوکسوروبیسین+تمرین+کروسین مشاهده نشد ($P=0/98$) (نمودار ۳).

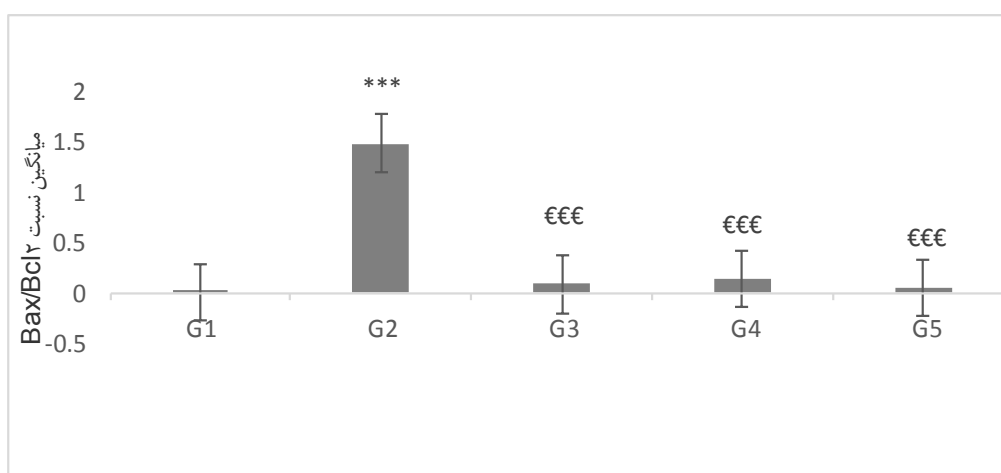
سطوح Bcl-2 در گروه کنترل سالم (0.57 ± 0.09) به طور معنی داری بالاتر از گروه کنترل بیمار ($P=0.01$) و (0.26 ± 0.09) دوکسوروبیسین+کروسین ($P=0.01$) و (0.185 ± 0.004)، دوکسوروبیسین+تمرین ($P=0.01$) و (0.205 ± 0.005) و دوکسوروبیسین+تمرین+کروسین ($P=0.01$) و



نمودار ۱- بیان نسبی Bax در گروه‌های تحقیق: داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شده است. *** (P=0/001) افزایش معنی‌دار نسبت به گروه G1. EE (P=0/001) و EE (P=0/009) کاهش معنی‌دار نسبت به گروه G2. YY (P=0/008) کاهش معنی‌دار نسبت به گروه G3



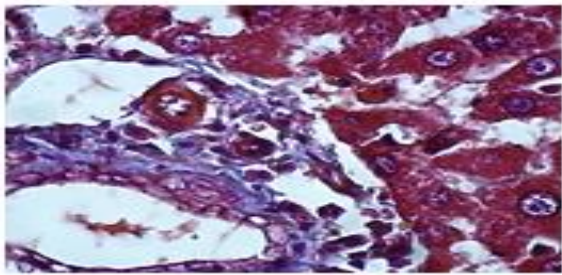
نمودار ۲- بیان نسبی Bcl-2 در گروه‌های تحقیق: داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شده است. *** (P=0/001) کاهش معنی‌دار نسبت به گروه G1. EE (P=0/001) و EE (P=0/009) و (P=0/003) افزایش معنی‌دار نسبت به گروه G2. YY (P=0/001) افزایش معنی‌دار نسبت به گروه G3 و گروه G4



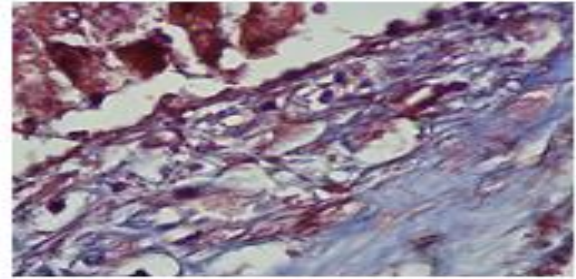
نمودار ۳- بیان Bax/Bcl-2 در گروه‌های تحقیق: داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نشان داده شده است. *** (P=0/001) افزایش معنی‌دار نسبت به گروه G1. EE (P=0/001) کاهش معنی‌دار نسبت به گروه G2

برای مقایسه فیروز کبدی بین گروه‌ها نتایج روش تری کروم‌ماسون نشان داد فیروز در گروه کنترل بیمار ۵۵٪ بالاترین حد می‌باشد (شکل الف)، در گروه تمرین تناوبی شدید+دوکسوروبیسین فیروز ۴۰٪ است (شکل ب) که می‌توان نتیجه گرفت تمرین تناوبی شدید ۱۵٪ از فیروز را کم کرده است، در گروه تمرین تناوبی+دوکسوروبیسین+کروسین فیروز ۳۰٪ می‌باشد (شکل پ) که نشان می‌دهد ترکیب تمرین و کروسین اثرات سمی دارو و فیروز را

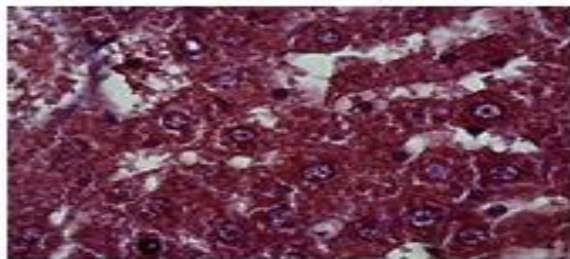
۲۵٪ کم کرده است، میزان فیروز گروه تمرین تناوبی+کروسین (۱۰٪) می‌باشد (شکل ج) و در گروه کنترل سالم میزان فیروز ۲٪ گزارش شد (شکل د). درصد مساحت فیروز بافت کبد رت‌های پژوهش توسط روش تری کروم‌ماسون که در آن کلاژن‌ها به رنگ آبی درآمده‌اند با بزرگنمایی ۴۰۰x در شکل‌های زیر قابل مشاهده می‌باشد.



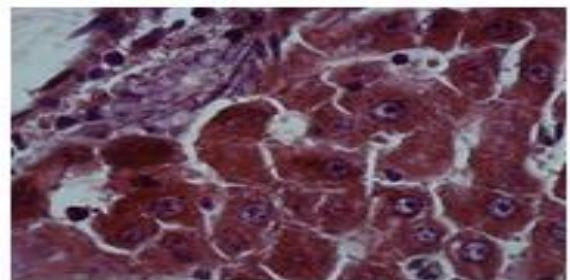
شکل ب- گروه تمرین تناوبی شدید +دوکسوروبیسین



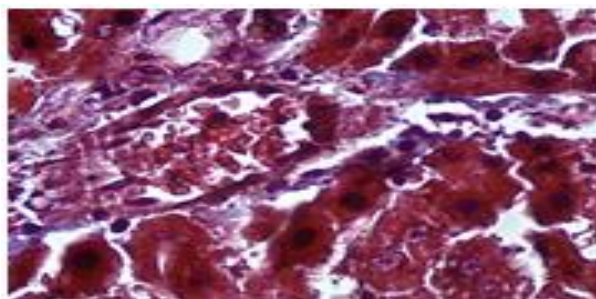
شکل الف- گروه کنترل بیمار



شکل ج- گروه کنترل سالم



شکل پ- گروه تمرین تناوبی +دوکسوروبیسین +کروسین



شکل د- گروه تمرین تناوبی +کروسین

بحث

مهمترین 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-2 القا می‌کند (۲۰). در مطالعات پیشین Dox موجب افزایش سطوح آنزیم‌های کبدی، فیروز کبدی و افزایش نسبت P53 به Bcl-xl در 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 کاسپازها و مهار پروتئین P53، موجب کاهش سطوح t-Bid, Bad, Bak, Bax و افزایش Bcl-2 می‌گردند (۲۲). تمرینات منظم و هوازی موجب پیشگیری از آپوپتوز بافت کبد در رت‌های مبتلا به کبد چرب غیر الکلی گردید، تمرینات ورزشی با کاهش ROS، افزایش گلوکاتایون پراکسیداز و افزایش گیرنده پروکسی زوم گاما^۱ (PPAR-γ) 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 تاثیر تمرین HIIT هنوز مبهم 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)

پراکسیداسیون لیپیدی شده و اسیدهای چرب غیر اشباع موجود در غشا سلول را محافظت می‌کند؛ در واقع مصرف زعفران و کروسین با افزایش آنتی‌اکسیدان‌ها، کاهش استرس اکسیداتیو، بهبود نیمرخ چربی و آنزیم‌های کبدی متابولیسم کبد را بهبود می‌بخشند 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 لیپیدی، مهار کاسپازها، مهار پروتئین P53، کاهش t-Bid, Bad, Bak, Bax، موجب کاهش آپوپتوز بافت کبد می‌گردند (۲۵ و ۲۲). 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 تنهایی، 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.

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 (۲۳). داروی Dox آپوپتوز را از طریق فعال-

سازی کاسپاز - ۸، کاسپاز - ۹، رهایش سیتوکروم-C به درون سیتوپلاسم، فعال سازی پروتئین P53، افزایش Bax و کاهش Bcl-2 القا می کند (۲۰). در مطالعات پیشین Dox موجب افزایش سطوح آنزیم های کبدی، فیروز کبدی و افزایش نسبت P53 به Bcl-xl در سلول های سرطانی کبد موش های آزمایشگاهی گردید (۲۰). از سویی یافته های این مطالعه نشان داد هشت هفته تمرین HIIT موجب کاهش Bax، در کبد رت های مسموم شده با DOX گردید و افزایش سطوح Bcl-2 کبدی متعاقب تمرینات HIIT در رت های مسموم شده با DOX معنی دار نبود، فعالیت بدنی از طریق کاهش ROS و پیشگیری از رهایش سیتوکروم C، مهار فعالیت کاسپازها و مهار پروتئین P53، موجب کاهش سطوح t-Bid, Bad, Bak و Bax و افزایش Bcl-2 می گردند (۲۲). تمرینات منظم و هوازی موجب پیشگیری از آپوپتوز بافت کبد در رت های مبتلا به کبد چرب غیر الکلی گردید، تمرینات ورزشی با کاهش ROS، افزایش گلوکاتایون پراکسیداز و افزایش گیرنده پروکسی زوم گاما موجب بهبود متابولیسم سلول های کبد و پیشگیری از آپوپتوز می گردد (۲۳)؛ اگرچه مشابه با این مطالعه مطالعاتی نشان داده اند که تمرین HIIT اثرات مطلوبی بر آپوپتوز دارد ولی نتایج مطالعات در ارتباط با تأثیر تمرین HIIT هنوز مبهم 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 رت های مسموم شده با DOX گردید. کروسین از طریق کاهش رادیکال های آزاد، کاهش پراکسیداسیون لیپیدی شده و اسیدهای چرب غیر اشباع موجود در غشا سلول را محافظت می کند (۲۵)؛ در واقع مصرف زعفران و کروسین با افزایش آنتی اکسیدان ها، کاهش استرس اکسیداتیو، بهبود نیمرخ چربی و آنزیم های کبدی متابولیسم کبد را بهبود می بخشد و منجر به کاهش آپوپتوز بافت کبد می گردد (۲۶). در این راستا مطالعات نشان دادند مصرف کروسین موجب کاهش سطوح سرمی آنزیم های کبدی گردید (۲۷)؛ ناهمسو با مطالعه حاضر نتایج مطالعه ای نشان داد، مصرف ۱۵ mg/kg زعفران اثر معنی داری بر کاهش آنزیم های کبدی زنان مبتلا به دیابت نوع ۲ نداشت (۲۴). به

نظر می رسد 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 رت های مسموم شده با DOX گردید. به نظر می رسد تمرینات HIIT و کروسین هر دو از مسیرهای مشابه مانند کاهش ROS، پیشگیری از رهایش سیتوکروم C، کاهش پراکسیداسیون لیپیدی، مهار کاسپازها، مهار پروتئین P53، کاهش t-Bid, Bad, Bak، موجب کاهش آپوپتوز بافت کبد می گردند (۲۵ و ۲۲). همچنین تمرینات ورزشی همراه با مصرف کروسین دارای اثرات ضد آپوپتوزی در بافت قلب رت های چاق شده با غذای پرچرب می باشند، همچنین تمرینات HIIT اثر معنی داری بر تغییرات Bcl-2 نداشت (۱۸).

نتیجه گیری

استفاده از مکمل کروسین در کنار تمرینات HIIT، نسبت به انجام تمرینات تناوبی و مصرف کروسین به تنهایی، 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 اندازه گیری سطوح فاکتورهای دیگری همانند کاسپازها و آنزیم های خونی در مطالعه حاضر می باشد. از این رو پیشنهاد می گردد در مطالعات آتی این عوامل اندازه گیری شوند.

تقدیر و تشکر

مقاله حاضر برگرفته از پایان نامه دکتری فیزیولوژی ورزشی دانشگاه آزاد، واحد شوشتر می باشد. نویسندگان 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.

تضاد منافع

پژوهش حاضر وجود ندارد.

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافی 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, Azarbaijani 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, Teitell MA. Mitochondria in human pluripotent stem cell apoptosis. *Semin Cell Dev Biol*. 2016; 52: 76-83. DOI: 10.1016/j.semcdb.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 pemetrexed chemosensitivity 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, Azarbayjani 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, Ebrahimpour 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 *Epinephelus coioides* by intraperitoneal immunization. *Vaccine*. 2014; 32(51): 7014-7020. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.08.039