Journal of Birjand University of Medical Sciences

Birjand University of Medical Sciences

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[1], **Saeid Shakerian**[2], **Masoud Nikbakht**[2]

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, Factuly of Sport Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Corresponding author: Department of Exercise Physiology, Factuly of Sport Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
Tel: +986133333631, Fax: +986133333631 Email: sashakeryan@gmail.com

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2020.27.4.101]

مقاله اصیل پژوهشی

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

مهراز مرادی[1]، سعید شاکریان[2]، مسعود نیکبخت[2]

چکیده

زمینه و هدف: استفاده از دوکسوروبیسین (Dox) در شیمی درمانی، عوارض جبران‌ناپذیری بر بافت کبد دارد. امّا، نقش فعّالیت‌های ورزشی و مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها بر مکانیسم آپوپتوز کبدی ناشی از مصرف Dox هنوز به‌طور 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 تجربی۴۰ سر رت نر نژاد ویستار با محدوده وزنی ۲۰۰-۲۲۰ و محدوده سنی ۸ هفته در گروه‌های ۱: کنترل سالم، ۲: Dox (۲ mg/kg در۷ دوز)، ۳: Dox+کروسین (۱۰mg/kg)، ۴: HIIT+Dox، و ۵: HIIT+Dox+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 ژن های 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<۰/۰۵) بررسی شدند.

یافته‌ها: Dox باعث افزایش معنادار بیان Bax، نسبت Bax/Bcl-2 و کاهش بیان Bcl-2 در بافت کبد گروه‌های بیمار شد (P=۰/۰۰۱). 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=۰/۰۰۱).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد تمرینات تناوبی شدید و مصرف کروسین به‌طور 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 بیرجند. ۱۳۹۹؛ ۲۷(۴): ۳۲۳-۳۳۵.

دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۱۶ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۰۵

[1] گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد شوشتر، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر، ایران

[2] 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- گروه فیزیولوژی ورزشی

تلفن: ۰۶۱۳۳۳۳۳۶۳۱ نمابر: ۰۶۱۳۳۳۳۳۶۳۱ پست الکترونیکی: sashakeryan@gmail.com

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2020.27.4.101]

مقدمه

در حال حاضر بیماری سرطان از بزرگترین مشکلات سلامت جهانی و دومین عامل مرگ و میر در سطح جهان است (۱و۲). امّا؛ میزان بقای افراد پس از تشخیص بیماری افزایش یافته که راهکارهای کاهش عوارض داروهای درمانی، یکی از دلایل آن می‌باشد. دوکسوروبیسین[1](Dox)، یکی از داروهای شیمی درمانی است که در درمان رشد غیر طبیعی سلول‌ها (نئوپلاسم انسانی) مورد استفاده قرار گرفته است؛ امّا استفاده از این دارو، در شیمی درمانی به همراه سمیت وابسته به دوز در بافت‌های غیر هدف مانند کبد محدود شده است (۴، ۳). داروی Dox با مکانیسم‌هایی از قبیل تولید گونه-های فعال اکسیژن[2] (ROS) و فعال‌سازی مسیرهای آپوپتوزی موجب ازهم‌گسیختگی DNA سلول‌های سرطانی می‌شود و در بافت‌های سالمی همچون کبد با اختلال در آنزیم‌های کبدی، تغییرات بافتی و افزایش ROS ها و فعال‌سازی پروتئین‌های آغازگر آپوپتوز مانند Bax و کاهش Bcl-2 موجب سمّیت بافت کبد می-شود (۴). آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، روشی فیزیولوژیک برای ازبین بردن سلولهای آسیب دیده، پیر و هموستاز بافتی می‌باشد 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 می‌شود (۶). مشخص شده است که دوکسوروبیسین، عمدتاً از مسیر داخلی سبب القای آپوپتوز می‌باشد. مسیر داخلی که به مسیر میتوکندریایی نیز شناخته می‌شود، با افزایش بیان ژن و پروتئین پیش برنده آپوپتوز (Bax)، فعال می‌شود و با افزایش بیان ژن و پروتئین‌های آنتی آپوپتیک (از جمله BCL-2 و Bcl-XL) متوقف می‌شود، همچنین پروتئین BCL-2 با جلوگیری از آزادسازی سیتوکروم C از میتوکندری وقوع آپوپتوز را مهار می‌کند (۷). در حالی که پروتئین Bax با خنثی کردن عمل Bcl-2 با ایجاد تغییرات بافتی معیّنی از جمله کاهش یا عدم چسبندگی سلول آپوپتوز به سلول‌های دیگر و ماتریکس خارج سلولی، وقوع تاول ها غشاء پلاسمایی و تراکم هسته‌ای، قطعه قطعه شدن DNA ژنومی، اتساع رتیکلوم اندوپلاسمیک، آزادساز ریبوزوم ها و تجزیه سلول به اجسام آپوپتوز، آپوپتوز و مرگ سلولی را فعال می‌کند (۷). با توجه به این که مسیرهای آپوپتوز در سلول از طریق تغییر در بیان برخی ژن‌ها به ویژه نسبت Bcl-2 /Bax تنظیم می‌شود، مقایسه میزان بیان ژن های Bax و Bcl-2 می‌تواند الگوی آپوپتوز را در سلول ها مشخص نماید (۸). اخیراً پژوهشگران نشان داده‌اند فعّالیت‌های ورزشی منظم راهبردی مناسب برای پیشگیری از عوارض ناشی از مصرف Dox است (۹)، تمرینات ورزشی منظم و طولانی مدّت می‌تواند با تعدیل استرس اکسیداتیو، رویکردی مناسب جهت کاهش سمیت Dox باشد (۳). با این وجود نوع و شدّت تمرین عاملی مهم در نتایج می‌باشد، به گونه‌ای که هشت هفته تمرین شنا سبب افزایش معنی‌داری Bcl-2، کاهش Bax و نسب Bcl-2/Bax بافت کبد موش‌های 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 رت‌های در معرض Dox گردید. از سویی مطالعاتی نیز نشان دادند تمرینات تناوبی شدید (HIIT) [3]موجب بر هم خوردن تعادل اکسیدان‌ها و آنتی-اکسیدان‌ها و افزایش استرس اکسیداتیو و برخی موجب کاهش استرس اکسیداتیو می‌گردند (۱۱). یکی از گیاهان سودمند در این زمینه، زعفران می‌باشد که دارای خواص و کاربردهای دارویی و درمانی متعددی می‌باشد (۱۲)، زعفران و عصاره کروسین [4]در بافت‌های 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 سلول‌های 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 موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع ۲ و بهبود شاخص‌های متابولیکی در محیطهای Invivo و Invitro (۱۵) بود. با این وجود به نظر می‌رسد مطالعات در حیطه تأثیر همزمان مصرف کروسین و تمرینات شدید ورزشی بر استرس اکسیداتیو ناشی از Dox هنوز به‌طورکامل شناخته نشده است،

[1]Doxorubicin
[2]Reactive oxygen Species

[3]High-intensity interval training
[4] Crocin

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2020.27.4.101]

همچنین با توجه به عوارض جانبی جبران‌ناپذیر 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 مکمّل کروسین بر بیان ژن Bcl-2 و Bax بافت کبد رت های 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 مدّت 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 موش های صحرایی به مدت ۱۰ جلسه با سرعت m/min ۸ 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 گروه های 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 دقیقه ای انجام دادند (۱۷) و گروه های ۳ و ۵ روزانه ۱۰ mg/kg کروسین را به صورت گاواژ دریافت نمودند (۱۸). ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین و پس از ۱۶ ساعت ناشتایی، موش‌های صحرایی با ترکیبی از داروی کتامین و زایلازین (به ترتیب ۹۰ و ۱۰ mg/kg) به‌صورت تزریق صفاقی بیهوش شدند، و پس از شکافتن حفره شکمی، بافت کبد به دقّت جدا و پس از شستشو با آب مقطّر 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 مدّت 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 دقیقه‌ای 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 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 دوکسوروبیسن بر عملکرد موش‌های صحرایی، شدّت 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 17304-1Gخریداری شد. سپس مقدار ۱۰ میلی گرم کروسین حل شده در حجمی معادل ۱۰ml/kg نرمال سالین حل شد و در ادامه به مدت ۸ هفته به صورت خوراکی

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2020.27.4.101]

(گاواژ) به موش های صحرایی خورانده شد. 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، به‌صورت 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 mg/kg ۱۴ در نرمال سالین حل شد و سپس روزانه معادل دوز mg/kg ۲ دوکسوروبیسین به وسیله سرنگ انسولینی به صورت زیر صفاقی تزریق شد. با توجه به اثرات احتمالی ناشی از تزریق در گروه‌های دریافت‌کننده دوکسوروبیسین، به‌منظور یکسان‌سازی شرایط برای همه آزمودنی‌ها و خنثی نمودن اثر تزریق، گروه کنترل سالم نیز به همان میزان سالین (سدیم کلراید ۰/۹ درصد) دریافت کرد (۱۶).

روش اندازه‌گیری متغیرها

روش استخراج RNA

برای استخراج RNA طبق پروتکل شرکت سازنده کیت (کیاژن، آلمان) انجام گرفت. بدین منظور۵۰ میلی‌گرم بافت از کبد در نیتروژن مایع خشک و پس از کوبیدن در آونگ استریل، درون تیوب ۱/۵ 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 کیازول) به نمونه (رسوب سلولی حاصل از سانتریفیوژ) اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت آن را در دمای ۸۰– قرار گرفت. سپس پلاک موجود در کرایوتیوب را در حالت نیمه انجماد توسط سرسمپلر 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 به‌آرامی برداشته و در یک میکروتیوب DEPC شده قرار داده شد. سپس ۱ سی سی ایزوپروپانول بر روی RNA شفاف ریخته شد و به مدّت 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 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 سرسمپلر پیپتاژ و به مدت ۵ دقیقه بر روی 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

$$C\ (\mu g/\mu l) = A260\times \varepsilon\times d/1000$$

در ادامه RNA استخراج شده تا زمان استفاده در دمای ۸۰– قرار گرفت.

سنتز cDNA

سنتز cDNA بر اساس دستورالعمل موجود در کیت فرمنتاز (Fermentas, USA) و واکنش رونویسی معکوس با استفاده از آنزیم RevertAid™M-MuLVReversetranscriptas 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[1] که به عنوان یک پرایمر برای شروع سنتز cDNA استفاده می شود)، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر 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 مدّت ۲ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت. در مرحله بعد ۴µl از 5XReactionBuffer و ۲ µl از dNTPMix و ۱µl از RiboLockRNaseInhibitor و ۱ µl از RevertAidRT به ترکیب قبل که برای ۵ دقیقه در دمای ۶۵

[1] Deoxyribonucleotide

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2020.27.4.101]

قرار گرفته بود، اضافه شد. سپس ترکیب ابتدا به مدّت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ قرار گرفت. بعد از آن به مدّت 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 اتّصال برای همه پرایمرها C° ۶۰ می‌باشد. توالی پرایمرهای مورد استفاده نیز در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

پس از اتمام فعّالیت 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′

$$Ratio=E^{-\{(\Delta CT_{case})-(\Delta CT_{control})\}} \qquad \Delta CT= CT_{target}- CT_{reference}$$

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

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

و سپس با استفاد از فرمول $۲^{-\Delta\Delta Ct}$ میزان بیان آن محاسبه گردید.

روش تهیه لام و رنگ آمیزی تریکروم ماسون

برای رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون[1]، قطعاتی از بافت کبد در فرمالین ۱۰ درصد، به مدّت ۴۸ ساعت تثبیت شده و پس از پاساژ بافتی، برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون، توسط میکروتوم دوارمدل *Shandon-As 325*، تهیّه و بر روی لام قرار گرفتند. سپس لام‌ها پس از رنگ‌آمیزی به روش تری‌کروم 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 میکروسکوپ *Labomed*، بررسی شدند. تفسیر تصاویر با نرم افزار *Image j* انجام شد؛ با کمک این نرم افزار، ابتدا طیف رنگ آبی مربوز 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 (شکل های الف، ب، پ، ج و د).

روش تجزیه و تحلیل آماری

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

1 Trichrome Masson

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2020.27.4.101]

مقایسه میانگین‌های توکی در نرم افزار SPSS ویرایش۲۱ استفاده شد (P<۰/۰۵).

یافته‌ها

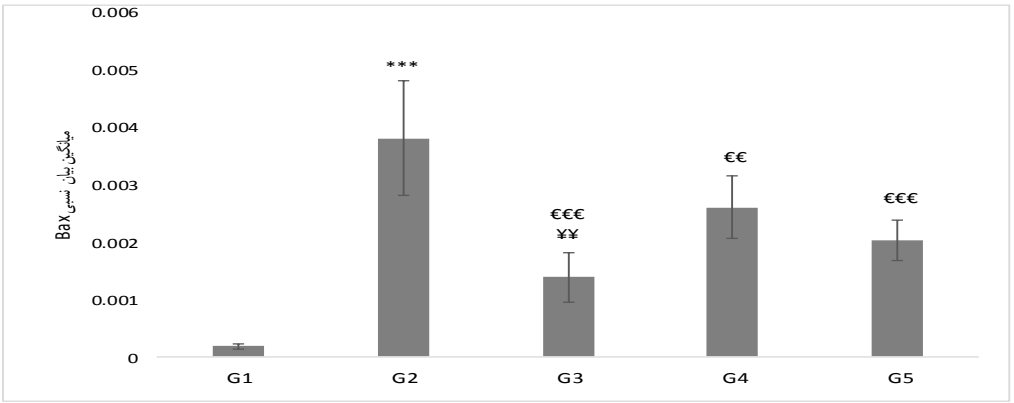
تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که تفاوت معنی‌داری در بیان ژن‌های Bax (P<۰/۰۰۱ و F=۳۳/۹۳۹)، Bcl-2 (P<۰/۰۰۱ و F=۴۷/۸۳۳) و نسبت Bax/Bcl-2 (P<۰/۰۰۱ و F=۳۶/۳۹۷) بافت کبد موش های صحرایی گروه‌های تحقیق وجود دارد.

نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد بیان ژن Bax در گروه کنترل سالم (G1)، (۰/۰۰۰۳۴±۰/۰۰۰۱۸) به طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه‌های کنترل بیمار(G2)، (P=۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۳۸±۰/۰۰۱)، دوکسوروبیسین+کروسین(G3)، (P=۰/۰۰۹ و ۰/۰۰۰۴±۰/۰۰۱۳)، دوکسوروبیسین+تمرین(G4)، (P=۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۵±۰/۰۰۲۶) و دوکسوروبیسین+تمرین+کروسین(G5)، (p=۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۳±۰/۰۰۲) بود. با این وجود سطوح بیان ژنی Bax در گروه کنترل بیمار به طور معنی‌داری بالاتر از گروه دوکسوروبیسین+کروسین (P=۰/۰۰۱)، دوکسوروبیسین+تمرین (P=۰/۰۰۹) و دوکسوروبیسین+تمرین+کروسین (P=۰/۰۰۱) بود. همچنین سطوح بیان ژنی Bax در گروه دوکسوروبیسین+کروسین به طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه دوکسوروبیسین+تمرین بود (P=۰/۰۰۸). اگرچه تفاوت معنی‌داری در گروه دوکسوروبیسین+تمرین+کروسین در مقایسه با گروه‌های دوکسوروبیسین+کروسین (P=۰/۳۲) و دوکسوروبیسین+تمرین (P=۰/۴۰) مشاهده نشد (نمودار ۱).

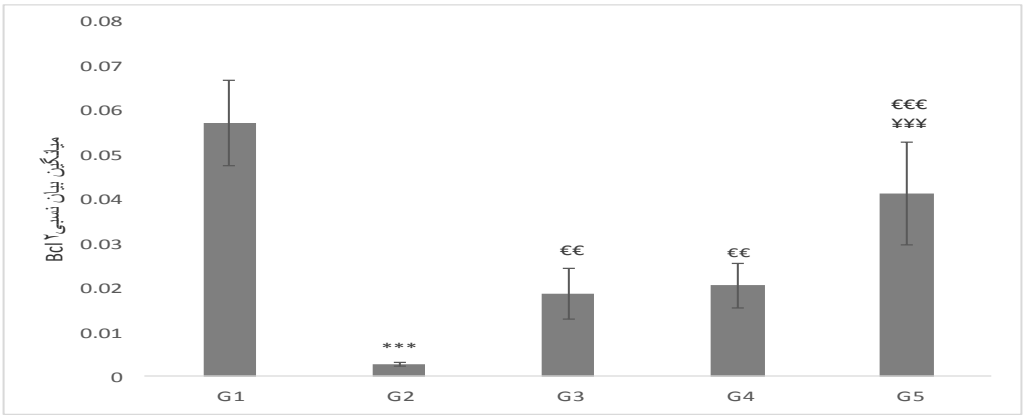
سطوح Bcl-2 در گروه کنترل سالم (۰/۰۰۹۵±۰/۰۵۷۲) به طور معنی‌داری بالاتر از گروه کنترل بیمار (P=۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۲۶±۰/۰۰۹۶) دوکسوروبیسین+کروسین (P=۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۴±۰/۰۱۸۵)، دوکسوروبیسین+تمرین (P=۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۵±۰/۰۲۰۵) و دوکسوروبیسین+تمرین+کروسین (P=۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۱۱±۰/۰۴۱۴) بود. با این وجود سطوح Bcl-2 در گروه کنترل بیمار به طور معنی‌داری پایین تر از گروه های دوکسوروبیسین+کروسین (P=۰/۰۰۹)، دوکسوروبیسین+تمرین (P=۰/۰۰۳) و دوکسوروبیسین+تمرین+کروسین (P=۰/۰۰۱) بود. همچنین سطوح Bcl-2 در گروه های دوکسوروبیسین+کروسین (P=۰/۰۰۱) و دوکسوروبیسین+تمرین (P=۰/۰۰۱) به طور معنی‌داری کمتر از گروه دوکسوروبیسین+تمرین+کروسین بود. با این وجود تفاوت معنی‌داری در سطوح Bcl-2 گروه دوکسوروبیسین+کروسین و دوکسوروبیسین+تمرین مشاهده نشد (P=۰/۹۹) (نمودار ۲).

سطوح نسبت Bax/Bcl-2 در گروه کنترل سالم (۰/۰۰۰۸±۰/۰۰۳۲) به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بیمار (P=۰/۰۰۱ و ۱/۴۹۰±۰/۵۷۵) بود ولی تفاوت معنی داری در سطوح نسبت Bax/Bcl-2 در گروه کنترل سالم در مقایسه با دوکسوروبیسین+کروسین (P=۰/۹۸ و ۰/۰۴۹۰±۰/۰۸۳۹) دوکسوروبیسین+تمرین (P=۰/۹۰ و ۰/۰۴۱۰±۰/۱۳۲)، دوکسوروبیسین+تمرین+کروسین (P=۰/۹۹ و ۰/۰۱۳۷±۰/۰۵۱۴) مشاهده نشد. با این وجود سطوح نسبت Bax/Bcl-2 در گروه کنترل بیمار به طور معنی‌داری بالاتر از گروه های دوکسوروبیسین+کروسین (P=۰/۰۰۱)، دوکسوروبیسین+تمرین (P=۰/۰۰۱) و دوکسوروبیسین+تمرین+کروسین (P=۰/۰۰۱) بود. امّا تفاوت معنی‌داری در سطوح نسبت Bax/Bcl-2 در گروه دوکسوروبیسین+کروسین نسبت به گروه‌های دوکسوروبیسین+تمرین (P=۰/۹۹) و دوکسوروبیسین+تمرین+کروسین (P=۰/۹۹) مشاهده نشد. همچنین تفاوت معنی‌داری در سطوح نسبت Bax/Bcl-2 در گروه دوکسوروبیسین+تمرین در مقایسه با دوکسوروبیسین+تمرین+کروسین مشاهده نشد (P=۰/۹۸) (نمودار ۳).

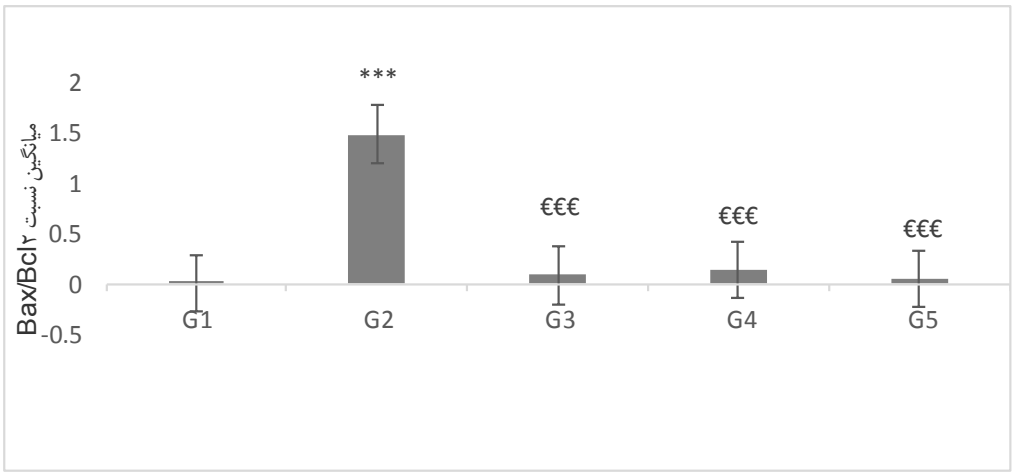
[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2020.27.4.101]



نمودار **۱- بیان نسبی Bax در گروه‌های تحقیق:** داده‌ها به صورت میانگین±انحراف معیار نشان داده شده است.
*** (P=۰/۰۰۱) افزایش معنی‌دار نسبت به گروه G1. €€€ (P=۰/۰۰۱) و €€ (P=۰/۰۰۹) کاهش معنی‌دار نسبت به گروهG2. ¥¥ (P=۰/۰۰۸) کاهش معنی‌دار نسبت به گروهG3



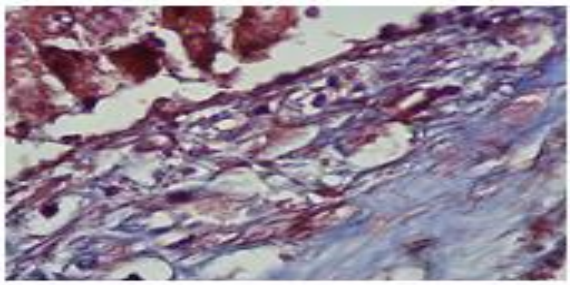
نمودار ۲- بیان نسبیBcl-2 در گروه‌های تحقیق: داده‌ها به صورت میانگین±انحراف معیار نشان داده شده است.
*** (P=۰/۰۰۱) کاهش معنی‌دار نسبت به گروه G1. €€€ (P=۰/۰۰۱) و €€ (P=۰/۰۰۹) و (P=۰/۰۰۳) افزایش معنی‌دار نسبت به گروه G2. ¥¥¥ (P=۰/۰۰۱) افزایش معنی‌دار نسبت به گروه G4 و گروه G3



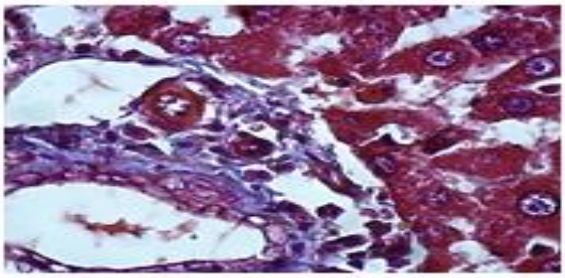
نمودار ۳- بیان Bax/Bcl-2 در گروه‌های تحقیق: داده‌ها به صورت میانگین±انحراف معیار نشان داده شده است.
*** (P=۰/۰۰۱) افزایش معنی‌دار نسبت به گروه G1. €€€ (P=۰/۰۰۱) کاهش معنی‌دار نسبت به گروه G2

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2020.27.4.101]

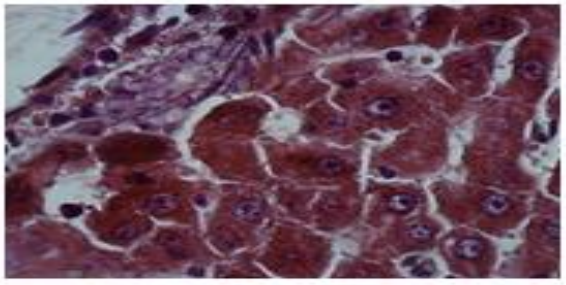
برای مقایسه فیبروز کبدی بین گروه‌ها نتایج روش تری‌کروم‌ماسون نشان داد فیبروز در گروه کنترل بیمار ۵۵٪ بالاترین حد می‌باشد (شکل الف)، در گروه تمرین تناوبی شدید+دوکسوروبیسین فیبروز ۴۰٪ است (شکل ب) که می‌توان نتیجه گرفت تمرین تناوبی شدید ۱۵٪ از فیبروز را کم کرده است، در گروه تمرین تناوبی+دوکسوروبیسین+کروسیین فیبروز۳۰٪ می‌باشد (شکل پ) که نشان می‌دهد ترکیب تمرین وکروسین اثرات سمّی دارو و فیبروز را ۲۵٪ کم کرده است، میزان فیبروز گروه تمرین تناوبی+کروسین(۱۰٪) می‌باشد (شکل ج) و در گروه کنترل سالم میزان فیبروز ۲٪ گزارش شد (شکل د). درصد مساحت فیبروز بافت کبد رت‌های پژوهش توسط روش تری‌کروم‌ماسون که در آن کلاژن‌ها به رنگ آبی در آمده‌اند با بزرگنمایی .400x در شکل‌های زیر قابل مشاهده می‌باشد.



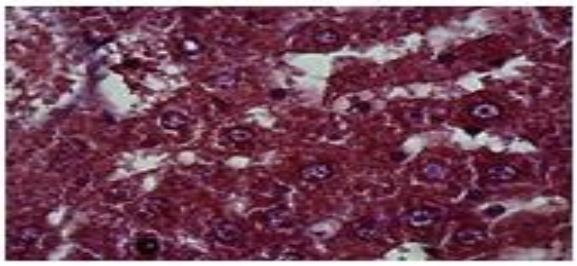
شکل الف-گروه کنترل بیمار



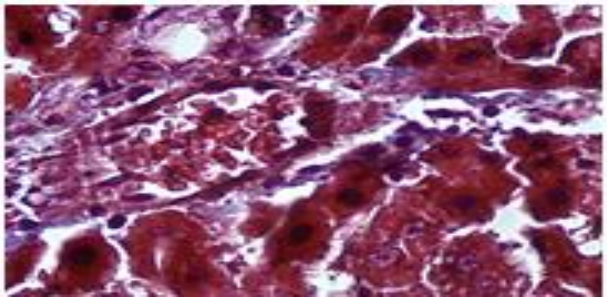
شکل ب-گروه تمرین تناوبی شدید +دوکسوروبیسین



شکل پ-گروه تمرین تناوبی+دوکسوروبیسین+کروسیین



شکل ج-گروه کنترل سالم



شکل د-گروه تمرین تناوبی+کروسین

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2020.27.4.101]

بحث

مهمترین یافته این پژوهش، حاکی از این بود که استفاده از مکمّل 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، افزیش Bax و کاهش Bcl-2 القا می‌کند (۲۰). در مطالعات پیشین Dox موجب افزایش سطوح آنزیم‌های کبدی، فیبروز 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 منظّم و هوازی 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[1] (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 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 (۲۵و 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 وآنزیم های 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 سمّی این دارو بر سلول مرتبط با تولید رادیکال‌های آزاد است (۲۳). داروی Dox آپوپتوز را از طریق فعال-

[1] Peroxisome Gamma (PPAR-γ)

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2020.27.4.101]

سازی کاسپاز – ۸، کاسپاز – ۹، رهایش سیتوکروم-C به درون سیتوپلاسم، فعال‌سازی پروتئین P53، افزیش Bax و کاهش Bcl-2 القا می‌کند (۲۰). در مطالعات پیشین Dox موجب افزایش سطوح آنزیم‌های کبدی، فیبروز کبدی و افزایش نسبت P53 به Bcl-xl در سلول‌های سرطانی کبد موش‌های آزمایشگاهی گردید (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، فعّالیت 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 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 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 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 آنزیم‌های کبدی متابولیسم کبد را بهبود می‌بخشند و منجر به کاهش آپوپتوز بافت کبد می‌گردد (۲۶). در این راستا مطالعات نشان دادند مصرف کروسین موجب کاهش سطوح سرمی آنزیم‌های کبدی گردید (۲۷)؛ 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 (۲۴). 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 Bax ،t-Bid, Bad, Bak، موجب کاهش آپوپتوز بافت کبد می‌گردند (۲۵و 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).

نتیجه‌گیری

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 وآنزیم های 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 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.

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2020.27.4.101]

تضاد منافع پژوهش حاضر وجود ندارد.

نویسندگان 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, 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 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, 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

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2020.27.4.101]

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 Homaee 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

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2020.27.4.101]