

تأثیر تمرین در آب بر سایتوکروم c و بیان p53 در بافت عضله‌ی قلبی موش‌های رت تحت درمان با داکسوروبیسین

حسن درواخ^۱، سعید شاکریان^۲، محمدرضا تابنده^۳، روح‌اله رنجبر^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: داکسوروبیسین (DOX (Doxorubicin یک داروی پرکاربرد در شیمی‌درمانی سرطان است، اما سمیت قلبی آن کاربردهای بالینی آن را محدود می‌کند. ترکیب ورزش با شیمی‌درمانی، یک رویکرد امیدوارکننده برای کاهش عوارض جانبی داروهای شیمی‌درمانی ارائه می‌دهد. اطلاعات محدودی در مورد اثرات تمرین در آب بر مکانیسم‌های مولکولی مرتبط با سمیت قلبی DOX در دسترس است. این مطالعه با هدف بررسی اثر تعدیلی تمرین در آب بر سایتوکروم c و بیان p53 در بافت عضله‌ی قلبی موش‌های رت تحت درمان با DOX انجام شد.

روش‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی، ۳۲ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار (با وزن ۲۲۰-۲۰۰ گرم) به طور تصادفی به ۴ گروه شاهد (C)، DOX (D)؛ (تزریق داخل صفاقی ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم DOX، هفته‌ای یک بار، به مدت ۵ هفته)، تمرین در آب (S) تقسیم شدند. تمرین در آب (S)؛ (به مدت ۶۰ دقیقه در روز، ۵ روز در هفته، به مدت شش هفته) و گروه DOX همراه با تمرین در آب (DS). در پایان مطالعه، بیان قلبی پروتئین‌های P53 و Cyt c به ترتیب با استفاده از روش وسترن بلات و الایزا و تجزیه و تحلیل داده‌ها با آنالیز واریانس یک طرفه انجام شد. سطح معنی‌داری ($P < 0/05$) تعیین گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که تجویز DOX سبب افزایش معنی‌دار میزان سطح بیان متغیر p53 و Cyt c در گروه‌های تحت درمان DOX در مقایسه با گروه شاهد شد ($P < 0/001$). تمرین در آب منجر به کاهش قابل‌توجهی در بیان قلبی پروتئین‌های P53 و Cyt c در گروه تحت درمان با DOX شد ($P < 0/01$ و $P < 0/001$).

نتیجه‌گیری: یافته‌های ما تمرین در آب را به‌عنوان یک استراتژی درمانی برای کاهش آسیب قلبی مرتبط با DOX با تعدیل پروتئین‌های P53 و Cyt c نشان می‌دهد.

واژگان کلیدی: داکسوروبیسین؛ میتوکندری قلب؛ P53؛ سایتوکروم c؛ آپوپتوز

ارجاع: درواخ حسن، شاکریان سعید، تابنده محمدرضا، رنجبر روح‌اله. تأثیر تمرین در آب بر سایتوکروم c و بیان p53 در بافت عضله‌ی قلبی موش‌های رت تحت درمان با داکسوروبیسین. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۳؛ ۴۲ (۷۹۴): ۱۰۶۹-۱۰۷۶.

مقدمه

داکسوروبیسین (DOX (Doxorubicin به‌عنوان یکی از اصلی‌ترین و مؤثرترین داروها در درمان انواع مختلف سرطان‌ها شناخته می‌شود. اما متأسفانه استفاده‌ی بالینی از آن به دلیل اثرات سمی روی بافت‌های غیر هدف نظیر قلب، کبد، عضلات اسکلتی، ریه‌ها، مغز، کلیه، سلول‌های خونی و بیضه‌ها محدود شده است (۱). اصطلاح آپوپتوزیس (Apoptosis) به‌عنوان فرایند ویژه مرگ یا

تجزیه سلولی با یک روش به‌دقت کنترل شده، توصیف می‌شود (۲). آپوپتوز شانس از بین بردن سلول‌ها را بدون هرگونه آسیب به سلول‌های بافت‌های مجاور، فراهم می‌کند. آپوپتوز علاوه بر نقش داشتن در تحول و نوسازی سلولی فیزیولوژیک، در بسیاری از شرایط پاتوفیزیولوژیک مانند پاسخ‌های التهابی و استرس و آسیب سلولی نیز مؤثر است و نقش این فرایند در بافت‌های سوماتیک همچون قلب چشم‌گیرتر می‌باشد (۳).

۱- دانشجوی دکتری گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی علوم ورزشی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۲- استاد، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی علوم ورزشی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۳- دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۴- دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی علوم ورزشی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

نویسنده‌ی مسؤؤل: سعید شاکریان؛ استاد، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی علوم ورزشی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

Email: s.shakeryan@scu.ac.ir

کرده‌اند (۱۱) و از سوی دیگر مطالعات اندکی به بررسی فعالیت در آب بر آپوپتوزیس بافت قلب، پرداخته‌اند؛ از این رو پژوهش حاضر با هدف تأثیر تمرین در آب بر CytC و بیان p53 در بافت عضله قلبی موش‌های تحت درمان با DOX به اجرا درآمد.

روش‌ها

حیوانات و گروه‌ها

در این مطالعه تجربی، ۳۲ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار (۸ هفته، ۲۰۰ تا ۲۲۰ گرم) از مرکز حیوانات دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران تهیه شد. موش‌ها در یک محیط تنظیم شده با دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد، سطوح رطوبت 55 ± 15 درصد و چرخه‌ی نور/تاریکی ۱۲ ساعت نگهداری شدند. دسترسی نامحدود به آب و خوراک استاندارد جوندگان (از شرکت پارسفید ایران) برای آنها فراهم شد. قبل از شروع آزمایش‌ها، به حیوانات اجازه داده شد تا دو هفته با این شرایط آزمایشگاهی سازگار شوند. حیوانات به طور تصادفی به چهار گروه شاهد یا شاهد منفی (C)، DOX (D) (شاهد مثبت)، تمرین در آب (S) و DS (تمرین در آب + DOX) تقسیم شدند.

گروه شاهد، نرمال‌سالین و گروه‌های درمان DOX را به صورت تزریق داخل صفاقی با دوز ۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم یک بار در هفته به مدت ۵ هفته دریافت کردند (۱۴). تزریقات هر هفته پس از ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین هفتگی انجام شد. در طول مطالعه دو حیوان از گروه‌های DOX و DS مردند که درصد بقا $93/75$ درصد بود. انتخاب تعداد نمونه بر اساس منابع موجود مانند فضا، غذا، پرسنل، بودجه و مطالعات قبلی و اصول اخلاق در پژوهش با کد (Ir.scu.rec.1402.068) بر روی حیوانات آزمایشگاهی مبنی بر استفاده از حداقل حیوانات انتخاب گردید و آز آنجایی که عدد ۸ یک عدد گرد و ساده است و محاسبات آماری را آسان‌تر می‌کند و همچنین بسیاری از پژوهشگران بر اساس تجربیات قبلی و نتایج مطالعات دیگر، عدد ۸ را به عنوان یک عدد مناسب برای حجم نمونه انتخاب نمودند، ما نیز در این مطالعه برای هر گروه، ۸ موش نر بالغ نژاد ویستار در نظر گرفتیم.

پروتکل تمرین شنا

تمرین در آب در ظرف شیشه‌ای به طول ۱۰۰ سانتی‌متر، عرض ۵۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۷۰ سانتی‌متر تا ارتفاع ۴۰ سانتی‌متر با دمای آب 35 درجه سانتی‌گراد انجام شد. برنامه‌ی آموزشی فعالیت در آب در دو مرحله آموزش و تمرین برگزار شد. مرحله‌ی آموزش شامل هفته‌ی اول بود، در روز اول، موش‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در یک مخزن استاندارد ($70 \times 50 \times 100$ سانتی‌متر) با دمای آب 35 درجه‌ی

P53 یک پروتئین سرکوبگر تومور شناخته شده است که در تنظیم رشد سلولی و جلوگیری از توسعه سرطان بسیار مهم است. علاوه بر نقش آن در سرکوب تومور، p53 همچنین نقش کلیدی در تنظیم آپوپتوز یا مرگ برنامه ریزی شده سلول ایفا می‌کند. هنگامی که سلول‌ها آسیب می‌بینند یا تحت استرس قرار می‌گیرند، p53 برای شروع آپوپتوز فعال می‌شود و سلول‌های آسیب دیده را از بدن خارج می‌کند (۴).

از سوی دیگر، CytC میتوکندری، پروتئینی است که در غشای داخلی میتوکندری، اندامک‌هایی که مسئول تولید انرژی در سلول‌ها هستند، قرار دارد. در سلول‌های سالم، CytC در داخل میتوکندری جدا می‌شود، اما هنگام استرس، به داخل سیتوپلاسم آزاد می‌شود که با فعال کردن آنزیم‌های کاسپاز، مسیر آپوپتوز را تحریک می‌کند (۵). مطالعات نشان داده‌اند که عملکرد p53 و CytC میتوکندری باهم آپوپتوز را تنظیم می‌کنند و هموستاز سلولی را حفظ می‌کنند. به طور خاص، نشان داده شده است که p53 باعث آزاد شدن CytC از میتوکندری در پاسخ به آسیب DNA می‌شود و مسیر آپوپتوز را فعال می‌کند (۶). اختلال در تنظیم p53 و CytC در ایجاد و پیشرفت بیماری‌های مختلف از جمله سرطان، اختلالات نورودژنراتیو و بیماری‌های قلبی - عروقی نقش دارد (۷).

با این حال، آپوپتوز به عنوان یک فرایند بیولوژیکی می‌تواند توسط مداخلات ژنتیکی، دارویی یا ورزشی تعدیل شود (۸). از این میان، فعالیت بدنی، یکی از مهم‌ترین آنهاست، زیرا ورزش هوازی (70 تا 75 درصد $vo2max$) قلب را در برابر انفارکتوس میوکارد در موش‌های صحرایی مقاوم می‌کند (۹). مطالعات نشان داده‌اند که تمرین ورزشی، آپوپتوزیس را همراه با بهبود ظرفیت ضد اکسایشی، کاهش می‌دهد (۱۰، ۱۱). تمرینات منظم هوازی، عملکرد میتوکندریایی را با کاهش سطح گونه‌های اکسیژن و بهبود بیوژنز میتوکندریایی تقویت می‌کند و باعث افزایش ذخیره‌ی گلیکوژن و ساخت زنجیره‌ی انتقال الکترون می‌شوند (۱۲). در این بین، فعالیت ورزشی تمرین در آب، یکی از درمان‌های غیر دارویی برای تعدیل و بهبود مشکلاتی مانند فشارخون بالا، چاقی و بیماری‌های قلبی - عروقی در نظر گرفته می‌شود؛ چرا که بدون ایجاد فشار اکسایشی، سطح عوامل التهابی را کاهش داده و موجب کاهش تولید ROS و افزایش ظرفیت ضد اکسایشی می‌شوند (۱۳).

از آنجا که نتایج مطالعات در زمینه‌ی تأثیر فعالیت ورزشی در شرایط طبیعی و بیماری، بر سیستم‌های ضد اکسایش درون‌زا متفاوت است (۱۰) و گاهی محققین نقش مخرب فعالیت ورزشی را بر سیستم ضد اکسایشی و افزایش رادیکال‌های آزاد گزارش

فسفات (TPBS؛ PBS و ۰/۱ درصد Tween ۲۰) شسته شد، بیشتر با آنتی‌بادی ثانویه ضد خرگوش IgG (#۷۰۷۷، Cell Signaling Technology, USA) در دمای اتاق انکوبه و سه بار شستشو شد. با TPBS پس از سه بار شستشو، واکنش پذیری پروتئین با استفاده از کیت تشخیص ECL (پارس توس، ایران) مشاهده شد. لکه‌ها با استفاده از سیستم تصویربرداری نورتایی شیمیایی (Fusion X، Vilber، ایالات متحده آمریکا) شناسایی شدند. آنالیز چگالی نوری با استفاده از نرم‌افزار Fusion X انجام شد و به صورت تغییر برابری نسبت به گروه شاهد بیان گردید.

یافته‌ها

تجزیه و تحلیل‌های آماری و طراحی نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Graph Pad Software, Inc., (GraphPad Prism نسخه ۹، San Diego, CA) انجام شد. برای ارزیابی معنی‌داری تفاوت بین گروه‌ها، آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) با آزمون تعقیبی Tukey انجام شد. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان می‌شوند. تفاوت معنی‌دار آماری بین گروه‌های آزمایشی مختلف به صورت زیر نشان داده شد (*: $P < 0/05$ ، **: $P < 0/01$ ، ***: $P < 0/001$ ، ****: $P < 0/0001$).

برای مطالعه‌ی تأثیر تمرین در آب بر CytC و بیان p53 در بافت عضله‌ی قلبی موش‌های تحت درمان با DOX، سطوح بیان p53 و CytC در گروه‌هایی که تعیین شده بودند، مورد ارزیابی قرار گرفت که نشان داد؛ سطوح p53 در گروه موش‌های با تمرین در آب (S) نسبت به گروه شاهد، تفاوت معنی‌داری ندارد. اما میزان سطح بیان متغیر p53 در گروه تحت درمان DOX (D) در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری دارد ($P < 0/0001$). همچنین، مشاهده می‌کنیم که بیان پروتئین p53 در گروه‌های موش‌های تحت درمان با DOX + تمرین در آب (DS) در مقایسه با گروه موش‌هایی که تنها تحت درمان با داروی DOX قرار گرفتند، کاهش معنی‌داری دارد ($P < 0/001$) که در شکل ۱ مقایسه P53 نشان داده شده است.

سطوح CytC در گروه موش‌های با تمرین در آب (S) نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری ندارد. اما میزان سطح بیان متغیر CytC در گروه تحت درمان DOX (D) در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌داری دارد ($P < 0/0001$). همچنین، مشاهده می‌کنیم که بیان پروتئین CytC در گروه‌های موش‌های تحت درمان با DOX + تمرین در آب (DS) در مقایسه با گروه موش‌هایی که تنها تحت درمان با داروی DOX قرار گرفتند، کاهش معنی‌داری دارد ($P < 0/01$) که در شکل ۲ نشان داده شده است.

سانتی‌گراد، در آب تمرین کردند. دوره‌ی فعالیت در آب ۱۰ دقیقه در روز افزایش یافت تا موش‌ها بتوانند ۶۰ دقیقه در آب فعال باشند. سپس مرحله‌ی تمرین در آب به مدت ۶۰ دقیقه در روز و پنج روز در هفته (در مجموع به مدت ۶ هفته) انجام شد (۱۵). به منظور حذف اثر حاد آخرین جلسه تمرین، برنامه‌ی تمرینی ۴۸ ساعت پیش از نمونه‌برداری رت‌ها پایان یافت.

نمونه‌برداری

در پایان آزمایش، موش‌ها با استفاده از کتامین هیدروکلراید (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) بیهوش شدند و نمونه‌های خون با سوراخ کردن قلب جمع‌آوری شد. سپس بافت قلب جدا شده و در فریزر -80°C درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

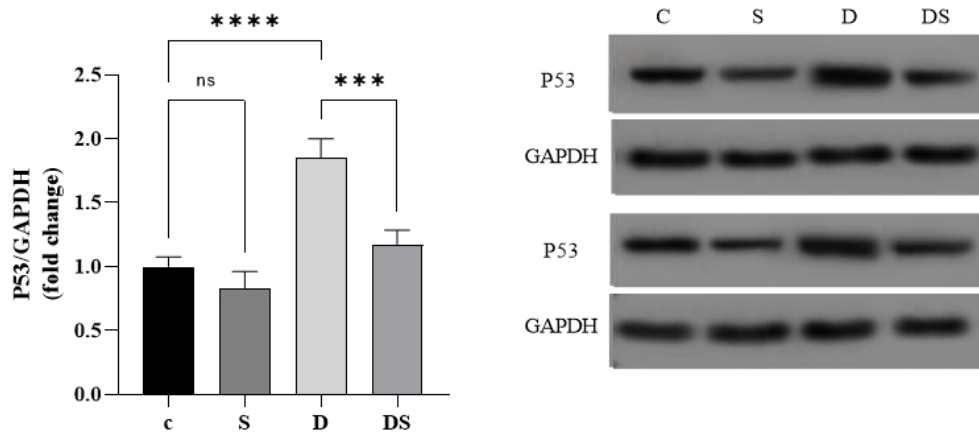
بررسی بیان ژن

اندازه‌گیری غلظت CYT C در بافت قلب سطوح بافتی CytC در هموزن بافت قلب یا استفاده از کیت ELISA مخصوص موش طبق دستورالعمل سازنده (Sunlong Biotech, China) اندازه‌گیری شد و نتایج به صورت پروتئین pg/mg بیان شد.

تجزیه و تحلیل وسترن بلات

از آنالیز وسترن بلات برای تعیین سطح بیان پروتئین p53 استفاده شد. به طور خلاصه، نمونه‌ی بافت قلب در یک بافر لیز RIPA ۲۵۰ میکرولیتری (NaCl)؛ ۱۵۰ میلی‌مولار، SDS ۰/۱ درصد، تریس؛ ۲۵ میلی‌مولار، pH ۷/۴، NaF؛ ۱ میلی‌مولار، فنیل متیل سولفونیل فلوراید ۱ میلی‌مولار، سدیم فلئوئوراز ۱ میلی‌مولار، فلئوئور ۵۰ میلی‌مولار و سدیم فلئوئوراز ۱ میلی‌مولار، فلئوئور ۵۰ میلی‌مولار و سدیم فلئوئوراز ۱ میلی‌مولار همگن شد. (Sigma-USA) با هموزنایزر (Heidolph، آلمان). بافت‌های هموزن با سرعت $10000 \times \text{RPM}$ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای 4°C درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سوپرناتانت‌های شفاف با دقت جمع‌آوری گردید، تقسیم شدند و بلافاصله در دمای -70°C درجه‌ی سانتی‌گراد تا تجزیه و تحلیل ذخیره شدند.

پس از تعیین غلظت پروتئین در لیزه‌های بافتی با روش برادفورد، ۲۰ میکروگرم از نمونه‌ها روی ژل ۱۰ درصد سدیم دودسیل سولفات-پلی‌آکریل آمید (SDS-PAGE) بارگذاری و با الکتروفورز جدا شدند. در نهایت، پروتئین‌ها به غشاهای پلی‌وینیلیدین دی‌فلوراید (آمرشام، ایالات متحده آمریکا) منتقل شدند. غشاهای با ۵ درصد شیر خشک بدون چربی و سپس با آنتی‌بادی اولیه مسدود شد: آنتی‌بادی (IC12) Mouse p53 (Cell Signaling Technology, USA #2524) در دمای 4°C درجه‌ی سانتی‌گراد بررسی شدند. غشاء سه بار با بافر تریس

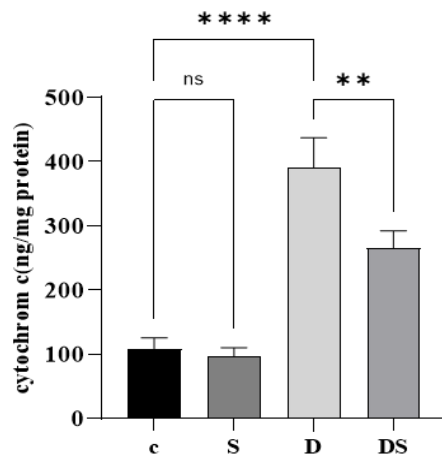


شکل ۱. اثر تمرین در آب بر میزان سطح بیان متغیر p53 قلب موش‌های تحت درمان با DOX (نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شده است). *** و **** نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌داری بین گروه‌های مختلف است. $P < 0/001$ و $P < 0/0001$ گروه شاهد (c)، گروه تمرین در آب (s)، گروه DOX (D)، گروه تمرین در آب + DOX (DS).

می‌شود و نفوذپذیری غشای میتوکندری را از بین می‌برد (۱۹). تعداد زیادی از فاکتورهای پیش آپوپتوز مانند Cytc از میتوکندری وارد سیتوپلاسم می‌شوند، مسیر کاسپاز را فعال می‌کنند، مسیر آپوپتوز درون‌زا را آغاز می‌کنند و در نهایت منجر به مرگ کاردیومیوسیت می‌شوند (۲۰).

مطالعات دیگر همچنین نشان داد که DOX می‌تواند باعث مورفولوژی و ساختار غیر طبیعی میتوکندری، رسوب چربی و آرایش نامنظم میوفیلامنت‌ها شود که با شکستن و انحلال میوفیلامنت همراه است (۱۷، ۲۱). این نشان می‌دهد که عملکرد میتوکندری نقش مهمی در آسیب قلبی ناشی از DOX دارد. Cytc در نتیجه تعاملی که بین سیگنال‌های آپوپتوز و گیرنده‌های سطح سلول رخ می‌دهد، از میتوکندری آزاد می‌شود (۲۲). با کمک برخی از پروتئین‌های سیتوزولی، Cytc آزاد شده در سیتوپلاسم سلول‌های آپوپتوز به آنزیم‌های کاسپاز در فعال کردن تخریب DNA سلولی با عمل اندونوکلازها کمک می‌کند (۲۳).

مطالعات قبلی گزارش کردند که p53 ممکن است نقش محافظتی در مرگ سلول‌های β پانکراس داشته باشد و افزایش بیان p53 به طور قابل توجهی با مرگ آپوپتوز سلول‌های β پانکراس مرتبط است (۲۴). همچنین گزارش شد که p53 مسئول کاهش تنفس میتوکندری از طریق جهش در ژن‌های همولوگ ۲ (SCO2) دارای کمبود سیتوکروم اکسیداز است که تجمع COX (Cytc اکسیداز)، یک جزء حیاتی و محل اصلی استفاده از اکسیژن را سرکوب می‌کند. زنجیره تنفسی، که منجر به نارسایی هوازی تنفسی می‌شود (۲۶) مدارک و شواهد نشان از آن دارد که تمرین ورزشی، اثرات متفاوتی بر آپوپتوز کاردیومیوسیت‌ها می‌گذارد (۲۷).



شکل ۲. اثر تمرین در آب بر سطح پروتئین سیتوکروم c در قلب موش‌های تحت درمان با DOX (نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شده است). * و **** نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌داری بین گروه‌های مختلف است $P < 0/01$ و $P < 0/0001$ گروه شاهد (c)، گروه تمرین در آب (s)، گروه DOX (D)، گروه تمرین در آب + DOX (DS).

بحث

DOX یک آنتی‌بیوتیک ضد تومور آنتراسایکلین است که دارای طیف وسیعی از اثرات ضد تومور می‌باشد. با این حال، کاربرد بالینی آن به دلیل سمیت قلبی وابسته به دوز و زمان آن به طور جدی محدود شده است (۱۶). مطالعات قبلی تأیید کرده‌اند که آپوپتوز کاردیومیوسیت نقش بسیار مهمی در سمیت قلبی ناشی از DOX دارد (۱۷، ۱۸). DOX منجر به تجمع زیاد ROS و اضافه بار کلسیم در سلول‌ها

غشای میتوکندری و به دنبال آن تورم پیشرونده میتوکندری و از بین رفتن اجزای محلول زنجیره تنفسی می‌شود که در نهایت منجر به پارگی غشای خارجی میتوکندری و نشت پروتئین‌ها به میتوکندری، تسریع در بروز آپوپتوز می‌شود (۳۳). مطالعه‌ی حاضر نشان داد تمرین در آب بیان سیتوکروم c را کاهش داد تا از آپوپتوز جلوگیری شود.

نتایج نشان داد که در مقایسه با گروه DOX، تمرین در آب سبب کاهش P53 می‌شود. DOX به‌عنوان عامل مسمومیت زنی، اتصال DNA-P53 را فعال می‌کند، این فرایند واسطه‌ی فعال‌سازی NF-KB می‌شود. NF-KB یک فاکتور رونویسی است که ژن را در رابطه با پاسخ‌های استرسی از قبیل التهاب، استرس اکسایشی و آپوپتوزیس تنظیم می‌کند (۳۴). گزارشات حاکی از آن است که P53 به دلیل آیشار کاسپاز و فعال‌سازی ۲ مسیر: الف) P53 (فعال شده توسط DOX تولید ROS می‌کند. ب) تجمع P53 باعث بیان ژن گیرنده‌ی APO-1/FAS/CD95 باعث مرگ سلول، مرگ غشاء فاکتور نکروزدهنده‌ی توموری (TNF) و فاکتور رشد عصب (NGF) می‌شود. زمانی که CD95L به این گیرنده اتصال می‌یابد، باعث یک سیگنال قوی آپوپتوزیس می‌شود که آیشار کاسپاز را فعال کرده و منجر به مرگ سلولی می‌شود (۳۱). مطالعه‌ی حاضر نشان داد تمرین در آب بیان P53 را کاهش داد تا از آپوپتوز جلوگیری کند.

در نتیجه، مطالعه‌ی حاضر نشان داد که تمرین در آب به طور قابل توجهی سمیت قلبی ناشی از DOX را در موش‌ها کاهش می‌دهد. مطالعه‌ی حاضر گزارش داد که تمرین در آب با تغییر نفوذپذیری میتوکندری، آزادسازی CytC و بیان P53 را کاهش می‌دهد و نقش ضد آپوپتوز را برای دستیابی به حفاظت قلبی ایفا می‌کند.

نتیجه گیری

در نتیجه، مطالعه‌ی ما نشان داد که تمرین مبتنی بر آب می‌تواند با کاهش P53 و مهار آزادسازی CytC، آپوپتوز را سرکوب کند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که تمرین در آب ممکن است یک رویکرد غیر دارویی امیدوارکننده برای کاهش سمیت قلبی ناشی از DOX با سرکوب مسیر آپوپتوز در قلب ارائه دهد. مطالعات بیشتر برای روشن کردن مکانیسم‌های اساسی و کشف کاربردهای بالینی بالقوه مداخلات ورزش در آب در مدیریت سمیت قلبی ناشی از شیمی‌درمانی ضروری است.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از پایان‌نامه‌ی مقطع دکتری رشته‌ی فیزیولوژی ورزشی می‌باشد که در دانشگاه شهید چمران اهواز، تصویب و با حمایت مالی دانشگاه به انجام رسیده است. بدین وسیله از معاونت پژوهشی و گروه فیزیولوژی دانشگاه شهید چمران اهواز تقدیر و تشکر می‌شود.

در مطالعه‌ای که No و همکاران، انجام دادند، به بررسی تأثیر ۸ هفته فعالیت ورزشی استقامتی در آب پرداختند و مشاهده کردند که کاهش نشانگرهای سیگنالینگ آپوپتوتیک، با کاهش کاسپاز-۳ در عضله‌ی قلب رت‌ها همراه است (۲۸).

از طرف دیگر، Qin و همکاران، تأثیر ۷ هفته تمرین شنا (یک تا یک و نیم ساعت در روز، ۵ جلسه در هفته) را بر کاسپاز-۳ بررسی کرده و گزارش کردند که تمرین شنا از طریق کاهش کاسپاز-۳ موجب تعدیل التهاب می‌شود (۲۹). این نتایج با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر همسو بود.

از طرف دیگر، Oláh و همکاران، به بررسی تأثیر ۱۲ هفته فعالیت ورزشی شنای طولانی (به مدت ۲۰۰ دقیقه در روز/۵ روز در هفته) پرداخته و تغییر معنی‌داری در بیان ژن‌های نشانگر بازسازی پاتولوژیک، آپوپتوزیس و التهاب در حیوانات آزمایشگاهی مشاهده نکردند. آن‌ها در مطالعه‌ی خود، افزایش بیان ژن آنزیم‌های ضد اکسایشی را به افزایش تنش اکسایشی نسبت دادند و علت عدم تغییر بیان ژن در رابطه با نشانگرهای بازسازی پاتولوژیک، آپوپتوزیس و پیش‌التهابی را تمرین ورزشی طولانی در هر جلسه و کاهش بیان کانال‌های پتاسیم دانستند؛ در حالی که هیچ پاسخ التهابی یا سودآوری در بافت قلب رت‌ها مشاهده نکردند (۳۰).

تمرینات ورزشی باعث سازگاری‌های پیچیده‌ی سیستم قلبی-عروقی می‌شوند و مطالعات اخیر فراوانی، تغییرات ناشی از ورزش در بافت قلب را وابسته به مدت زمان تمرین و همچنین شدت تمرینات اعمال شده توسط پژوهشگران نسبت می‌دهند؛ چرا که بنظر می‌رسد شدت و نوع تمرین از عوامل مهم اثرگذار بر آپوپتوزیس باشد (۳۱). از این‌رو، تمرینات هوازی منظم می‌توانند در کنترل آپوپتوزیس میتوکندریایی بافت قلبی نقش داشته باشند (۳). در مطالعه‌ی حاضر نیز مشخص گردید که فعالیت تمرین در آب، سبب تأثیر مثبت بر کاهش عوارض DOX در قلب شده است.

نتایج ما نشان داد، در مقایسه با گروه DOX تمرین در آب باعث کاهش سطح CytC شده است که باعث کاهش انتشار CytC میتوکندری در سطح ژن و در نتیجه کاهش وقوع آپوپتوز شده است. CytC نه تنها یک عامل مهم برای میتوکندری برای ترویج آپوپتوز است، بلکه یک عامل کلیدی برای شروع مسیر سیگنال آپوپتوز است (۱۷). پس از آزاد شدن، CytC با Apaf1 و ۹-pre-caspase کمپلکسی تشکیل می‌دهد که کاسپاز-۳/۹ (Caspase-9/3) بریده شده را فعال می‌کند و منجر به مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلولی می‌شود (۳۲). باز شدن mPTP (Mitochondrial permeability transition pore) (منافذ انتقال نفوذپذیری میتوکندری) نقش اصلی را در تنظیم مرگ سلولی ایفا می‌کند، منجر به دیپلیرازسیون میتوکندری و اتلاف پتانسیل

References

- Mattioli R, Ilari A, Colotti B, Mosca L, Fazi F, Colotti G. Doxorubicin and other anthracyclines in cancers: Activity, chemoresistance and its overcoming. *Mol Aspects Med* 2023; 93: 101205.
- Aryamloo P, Asgarian-Omran H, Aslani N, Hossein-Nataj H, Shokohi T, Badali H, et al. Cellular apoptosis: An alternative mechanism of action for caspofungin against *Candida glabrata*. *Curr Med Mycol* 2019; 5(2): 9-15.
- Imani A, Siahkoughian M, Karimi P, Asgharpour-Arshad M, Seyfi-Asgshahr F. The role of 3 months of regular aerobic training on some factors of mitochondrial apoptosis pathway in cardiac tissue of male Wistar rats [in Persian]. *Journal of Practical Studies of Biosciences in Sport* 2021; 9(19): 34-46.
- Hernández Borrero LJ, El-Deiry WS. Tumor suppressor p53: Biology, signaling pathways, and therapeutic targeting. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2021; 1876(1): 188556.
- Eleftheriadis T, Pissas G, Liakopoulos V, Stefanidis I. Cytochrome c as a potentially clinical useful marker of mitochondrial and cellular damage. *Front Immunol* 2016; 7: 279.
- Wang H, Guo M, Wei H, Che Y. Targeting p53 pathways: mechanisms, structures, and advances in therapy. *Signal Transduct Target Ther* 2023; 8(1): 92.
- Luo Q, Sun W, Wang YF, Li J, Li DW. Association of p53 with Neurodegeneration in Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis* 2022; 2022: 6600944.
- Pahlavani HA. Exercise-induced signaling pathways to counteracting cardiac apoptotic processes. *Front Cell Dev Biol* 2022; 10: 950927.
- Alizadeh Pahlavani H, Rajabi H, Nabuini M, Motamedi P, Khaledi N, Tayanloo A. The effect of aerobic exercise with medium and high intensity on the gene expression of Bax (BCL2 associated X) and Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) markers in rat myocard after ischemic-reperfusion [in Persian]. *Sport Physiology* 2020; 12(45): 31-44.
- Meng Q, Su CH. The Impact of Physical Exercise on Oxidative and Nitrosative Stress: Balancing the Benefits and Risks. *Antioxidants (Basel)* 2024; 13(5): 573.
- Clemente-Suárez VJ, Bustamante-Sanchez A, Mielgo-Ayuso J, Martínez-Guardado I, Martín-Rodríguez A, Tornero-Aguilera JF. Antioxidants and Sports performance. *Nutrients* 2023; 15(10): 2371.
- Misrani A, Tabassum S, Yang L. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* 2021; 13: 617588.
- Börzsei D, Kiss V, Nagy A, Hoffmann A, Török S, Almási N, et al. Moderate-Intensity swimming alleviates oxidative injury in ischemic heart. *Appl Sci* 2024; 14(5): 2073.
- Alharbi I, Alharbi H, Almogbel Y, Alalwan A, Alhowail A. Effect of metformin on doxorubicin-induced memory dysfunction. *Brain Sci* 2020; 10(3): 152.
- Poursadeghi S, Kashef M, Shahidi F. The effect of water aerobic exercise on the expression of Apaf-1, cytochrome C and Caspase-9 genes of cardiomyocyte tissue in male rats poisoned with hydrogen peroxide [in Persian]. *Journal of Practical Studies of Biosciences in Sport* 2023; 11(25): 68-77.
- Belger C, Abrahams C, Imamdin A, Lecour S. Doxorubicin-induced cardiotoxicity and risk factors. *Int J Cardiol Heart Vasc* 2024; 50: 101332.
- Wei Y, Zhao J, Xiong J, Chai J, Yang X, Wang J, et al. Wogonin reduces cardiomyocyte apoptosis from mitochondrial release of cytochrome c to improve doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Exp Ther Med* 2022; 23(3): 205.
- Rawat PS, Jaiswal A, Khurana A, Bhatti JS, Navik U. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: An update on the molecular mechanism and novel therapeutic strategies for effective management. *Biomed Pharmacother* 2021; 139: 111708.
- Xiang M, Lu Y, Xin L, Gao J, Shang C, Jiang Z, et al. Role of oxidative stress in reperfusion following myocardial ischemia and its treatments. *Oxid Med Cell Longev* 2021; 2021: 6614009.
- Zhang Y, Ma XY, Zhang T, Qin M, Sun B, Li Q, et al. Protective effects of apocynin against pirarubicin-induced cardiotoxicity. *Am J Chin Med* 2019; 47(5): 1075-97.
- Collins HE, Kane MS, Litovsky SH, Darley-USmar VM, Young ME, Chatham JC, et al. Mitochondrial morphology and mitophagy in heart diseases: qualitative and quantitative analyses using transmission electron microscopy. *Front Aging* 2021; 2: 670267.
- Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* 2006; 13(9): 1423-33.
- Kari S, Subramanian K, Altomonte IA, Murugesan A, Yli-Harja O, Kandhavelu M. Programmed cell death detection methods: a systematic review and a categorical comparison. *Apoptosis* 2022; 27(7-8): 482-508.
- Uhlemeyer C, Müller N, Rieck M, Kuboth J, Schlegel C, Griebel K, et al. Selective ablation of P53 in pancreatic beta cells fails to ameliorate glucose metabolism in genetic, dietary and pharmacological models of diabetes mellitus. *Mol Metab* 2023; 67: 101650.
- Flores-López LA, Enríquez-Flores S, De La Mora-De La Mora I, García-Torres I, López-Velázquez G, Viedma-Rodríguez R, et al. Pancreatic β -cell apoptosis in type 2 diabetes is related to post-translational modifications of p53. *Mol Med Rep* 2024; 30(5): 193.
- Brischigliaro M, Zeviani M. Cytochrome c oxidase deficiency. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 2021; 1862(1): 148335.
- Aengevaeren VL, Baggish AL, Chung EH, George K, Kleiven Ø, Mingels AMA, et al. Exercise-induced cardiac troponin elevations: from underlying mechanisms to clinical relevance. *Circulation* 2021; 144(24): 1955-72.
- No MH, Heo JW, Yoo SZ, Kim CJ, Park DH, Kang JH, et al. Effects of aging and exercise training on

- mitochondrial function and apoptosis in the rat heart. *Pflugers Arch* 2020; 472: 179-93.
29. Qin L, Yao ZQ, Chang Q, Zhao YL, Liu NN, Zhu XS, et al. Swimming attenuates inflammation, oxidative stress, and apoptosis in a rat model of dextran sulfate sodium-induced chronic colitis. *Oncotarget* 2017; 8(5): 7391-404.
 30. Oláh A, Barta BA, Sayour AA, Ruppert M, Virág-Tulassay E, Novák J, et al., Balanced intense exercise training induces atrial oxidative stress counterbalanced by the antioxidant system and atrial hypertrophy that is not associated with pathological remodeling or arrhythmogenicity. *Antioxidants (Basel)* 2021; 10(3): 452.
 31. Hashemi Chashemi S Z, Hojati S S, Dabidiroshan V, Jalali Dehkordi K. The role of exercise in adaptation and body response to doxorubicin-induced cellular toxicity: a narrative review study [in Persian]. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2020; 19(8): 869-88.
 32. Elena-Real CA, Díaz-Quintana A, González-Arzola K, Velázquez-Campoy A, Orzáez M, López-Rivas A, et al. Cytochrome c speeds up caspase cascade activation by blocking 14-3-3ε-dependent Apaf-1 inhibition. *Cell Death Dis* 2018; 9(3): 365.
 33. Chen X, Ji Y, Liu R, Zhu X, Wang K, Yang X, et al. Mitochondrial dysfunction: roles in skeletal muscle atrophy. *J Transl Med* 2023; 21(1): 503.
 34. Guo Y, Tang Y, Lu G, Gu J. p53 at the crossroads between doxorubicin-induced cardiotoxicity and resistance: a nutritional balancing act. *Nutrients* 2023; 15(10): 2259.

The Effect of Water Training on Cytochrome C and P53 Expression in Heart Muscle Tissue of Rats Treated with Doxorubicin

Hasan Darvakh¹, Saied Shakerian², Mohammad Reza Tabandeh³, Rohollah Ranjbar⁴

Original Article

Abstract

Background: Doxorubicin (DOX) is a widely used drug in cancer chemotherapy, but its cardiotoxicity limits its clinical applications. Combining exercise with chemotherapy offers a promising approach to reducing the side effects of chemotherapy drugs. Limited information is available on the effects of water training on the molecular mechanisms involved in DOX cardiotoxicity. This study aimed to investigate the modulating effect of water training on cytochrome c and p53 expression in heart muscle tissue of rats treated with doxorubicin.

Methods: 32 adult male Wistar rats (weight 200-220 g) were randomly divided into four groups: control (C), DOX (D), (intraperitoneal injection of 5 mg/kg DOX, once a week, for 5 weeks), water training (S) were divided water training (S); (for 60 minutes a day, five days a week, for six weeks) and DOX group with water training (DS). At the end of the study, the cardiac expression of p53 and Cyt c proteins were analyzed using western blot and ELISA methods, respectively, and data analysis was done with one-way ANOVA.

Findings: The results showed that the administration of DOX caused a significant increase in the expression level of variable p53 and cytochrome c (Cyt c) in the DOX-treated group compared to the control group ($P < 0.0001$). Water training led to a significant decrease in cardiac expression of p53 and Cyt c proteins in the group treated with DOX ($P < 0.001$, $P < 0.01$).

Conclusion: Our findings suggest water training as a therapeutic strategy to reduce DOX-related cardiac damage by modulating p53 and Cyt c proteins.

Keywords: Doxorubicin; Heart mitochondria; p53; Cytochrome C; Apoptosis

Citation: Darvakh H, Shakerian S, Tabandeh MR, Ranjbar R. **The Effect of Water Training on Cytochrome C and P53 Expression in Heart Muscle Tissue of Rats Treated with Doxorubicin.** J Isfahan Med Sch 2025; 42(794): 1069-76.

1- PhD Student, Department of Sport Physiology, School of Sport Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2- Professor, Department of Sport Physiology, School of Sport Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
3- Associate Professor, Department of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
4- Associate Professor, Department of Sport Physiology, School of Sport Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
Corresponding Author: Saied Shakerian, Professor, Department of Sport Physiology, School of Sport Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran; Email: s.shakeryan@scu.ac.ir