

## اثر حفاظتی ۶ هفته تمرین اختیاری بر آپوپتوز کبدی ناشی از دوکسوروبیسین در Rat های مدل سالمندی

مینو دادبان شهامت<sup>۱</sup>، ولی‌اله دبیدی روشن<sup>۲</sup>، تورج فرازمنذر<sup>۳</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** روش‌های تمرینی مختلفی جهت کاهش عوارض داروی دوکسوروبیسین ارائه شده‌اند که به نظر می‌رسد با توجه به شرایط بیماران، زمان شروع تمرینات، طول دوره و استرس تمرینی باید مورد توجه بیشتری قرار بگیرند. از این رو، هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر حفاظتی تمرین اختیاری بر آپوپتوز کبدی ناشی از دوکسوروبیسین در Rat های مدل سالمندی بود.

**روش‌ها:** ۴۲ سر Rat بالغ نژاد Wistar، در ۶ گروه (n = 7) شامل جوان، سالمند، سالمند + سالی، سالمند + دوکسوروبیسین، سالمند + دوکسوروبیسین + تمرین اختیاری و سالمند + سالی + تمرین اختیاری قرار گرفتند. تمرین اختیاری، در قفس‌های مجهز به چرخ دوار و شمارشگر مسافت، به مدت ۶ هفته به صورت انفرادی و آزادانه انجام شد. هم‌زمان با ۱۵ روز پایانی تمرین، دوکسوروبیسین یا محلول سالی با دز روزانه ۱ میلی‌گرم/کیلوگرم (دز تجمعی ۱۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) تزریق شد. ۴۸ ساعت پس از اتمام تمرین، بافت‌برداری از کبد برای ارزیابی بیان پروتئین‌های Bax و B-cell leukemia 2 (Bcl-2) جهت بررسی آپوپتوز به روش Western blot انجام شد.

**یافته‌ها:** آزمون One-way ANOVA نشان داد در گروه‌های تمرینی نسبت به سایر گروه‌ها، میزان بیان پروتئین Bax و نسبت Bax/Bcl-2 کاهش معنی‌دار و بیان پروتئین Bcl-2، افزایش معنی‌داری یافته بود.

**نتیجه‌گیری:** تمرین اختیاری قبل و حین شیمی‌درمانی، ممکن است بتواند از طریق کاهش پروتئین Bax و نسبت Bax/Bcl-2، باعث کاهش آپوپتوز و افزایش بقا در هیپاتوسیت‌های سالم سالمندان و در نتیجه، کاهش عوارض دوکسوروبیسین شود.

**واژگان کلیدی:** تمرین، آپوپتوز، دوکسوروبیسین، سالمندی، پروتئین Bax، پروتئین B-cell leukemia 2

**ارجاع:** دادبان شهامت مینو، دبیدی روشن ولی‌اله، فرازمنذر تورج. اثر حفاظتی ۶ هفته تمرین اختیاری بر آپوپتوز کبدی ناشی از دوکسوروبیسین در

Rat های مدل سالمندی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۷؛ ۳۶ (۴۶۵): ۲۱-۱۴

### مقدمه

دوکسوروبیسین (Doxorubicin یا DOX)، یک آنتی‌بیوتیک آنتراسایکلین قارچی و یکی از داروهای شیمی‌درمانی است که برای درمان بسیاری از تومورها مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱-۲) و اثر درمانی خود را از طریق اختلال در تکثیر سلول سرطانی، با مهار آنزیم توپوایزومراز II و ایجاد فرصتی برای ترمیم ژنوم به انجام می‌رساند و اگر ترمیم با شکست روبه‌رو شود، با تولید رادیکال‌های آزاد، باعث القای آپوپتوز (Apoptosis) سلول می‌شود (۲).

آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده، روشی طبیعی در سلول‌ها می‌باشد که در هموستاز بافتی و حذف سلول‌های آسیب دیده یا پیر،

نقش حیاتی دارد و از دو مسیر بیرونی (Extrinsic pathway) و درونی (Intrinsic pathway) رخ می‌دهد. مسیر خارجی، با تحریک گیرنده‌های مرگ که در غشای خارجی اغلب سلول‌ها وجود دارد، آغاز می‌شود و منجر به فعال‌سازی کاسپازها و القای مرگ سلولی می‌گردد و مسیر داخلی نیز، از طریق سیگنال‌هایی مانند رادیکال‌های آزاد (Free radicals) در درون سلول آغاز می‌شود و به واسطه پروتئین‌های خانواده‌ی Bcl-2 (B-cell leukemia 2 family proteins) موجود در غشای خارجی میتوکندری، با آسیب به غشای میتوکندری و رهایش سیتوکروم C، موجب فعال شدن کاسپازها و در نهایت، مرگ سلول می‌شود (۳).

۱- دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزش، گروه تربیت بدنی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران

۲- استاد، گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده‌ی علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، بابل، ایران

۳- استادیار، گروه پزشکی مولکولی، دانشکده‌ی فن‌آوری‌های نوین در علوم پزشکی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

Email: v.dabidi@umz.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: ولی‌اله دبیدی روشن

اختیاری پیش درمان قبل و حین القای دوکسوروبیسین بر بیان پروتئین‌های Bax، Bcl-2 و نسبت Bax / Bcl-2 بافت کبدی Rat های مدل سالمندی انجام شد.

### روش‌ها

**طرح پژوهش و محیط آزمایشگاه:** این پژوهش به روش تجربی و بر روی ۴۲ سر Rat نژاد Wistar با سن ۱۲ هفته و میانگین وزن  $230 \pm 25$  گرم، در محیطی با میانگین دمای  $22/0 \pm 1/4$  درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت ۵۵ درصد و چرخه‌ی روشنایی- تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت، در قفس‌های پلی‌کربنات شفاف و با دسترسی آزاد به آب و غذای استاندارد پلت (۱۲) و با رعایت اصول اخلاقی منطبق با منشور حقوق حیوانات انجام گردید.

**مدل‌سازی سالمندی:** پس از یک هفته آشناسازی با محیط آزمایشگاه، مدل‌سازی سالمندی به مدت ۹ هفته بر روی ۳۵ سر از Rat ها اجرا شد. برای ایجاد مدل سالمندی، از دی‌گالاکتوز (Sigma, USA) محلول در سالیان (سدیم کلراید ۰/۹ درصد) استفاده شد که روزانه ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و به صورت درون صفاقی تزریق می‌شد (۲۰). Rat ها ۴ هفته پس از مدل‌سازی در ۶ گروه ۷ تایی شامل گروه جوان، گروه سالمند، گروه سالمند + سالیان، گروه سالمند + دوکسوروبیسین، گروه سالمند + تمرین اختیاری + سالیان و گروه سالمند + تمرین اختیاری + دوکسوروبیسین قرار گرفتند.

**تمرین اختیاری:** حیوانات گروه تمرینی پس از یک هفته آشنایی با نحوه‌ی فعالیت روی چرخ گردان، از ابتدای هفته‌ی چهارم و به مدت ۶ هفته در قفس‌های مجهز به چرخ دوار و شمارشگر مسافت به صورت انفرادی قرار گرفتند. مسافت‌ها هر روز صبح ثبت می‌شد.

**القای دوکسوروبیسین:** آزمودنی‌ها از هفته‌ی هشتم مدل‌سازی سالمندی، به مدت ۱۵ روز در معرض تزریق درون صفاقی دوکسوروبیسین و یا محلول سالیان NaCl ۰/۹ درصد، با دز روزانه‌ی ۱ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن با هدف رسیدن به دز تجمع‌ی ۱۵ میلی‌گرم/کیلوگرم قرار گرفتند (۲۱).

**نمونه‌برداری:** ۴۸ ساعت پس از آخرین تزریق، آزمودنی‌ها در شرایط ناشتایی، با کتامین و زایلازین با نسبت ۵ به ۲ بیهوش شدند و پس از جراحی، قطعاتی از بافت کبد در نیتروژن مایع منجمد و در دمای  $-80^{\circ}\text{C}$  درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد.

### سنجش بیان پروتئین‌های Bax و Bcl-2 به روش

**Western blot.** بافت کبد به روش مکانیکی کوبیده و توسط بافر Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) به همراه پروتاز، با دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت حاصل به

پروتئین‌های خانواده‌ی Bcl-2، حاوی دو گروه پیش‌برنده‌ی آپوپتوز (Pro-Apoptotic) مانند Bax، Bcl-2، Bcl-2-associated death promoter (Bad)، B-cell lymphoma-extra short (Bcl-xS) و B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xL) (Anti-Apoptotic) نظیر Bcl-2 و مهارکننده‌ی آپوپتوز (Bcl-xL) می‌باشند که نقش مهمی در فرایند آپوپتوز میتوکندریایی دارند (۴). از این رو، از پروتئین‌هایی هستند که تحت تأثیر دوکسوروبیسین قرار می‌گیرند.

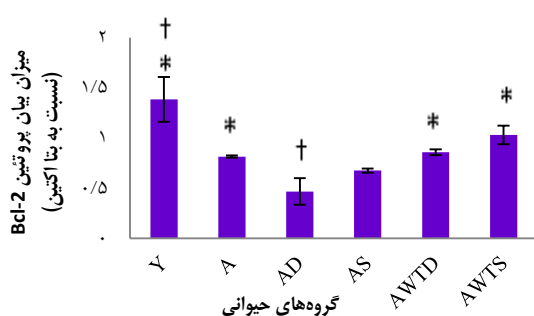
علاوه بر خواص درمانی دوکسوروبیسین، این دارو با عبور از میان غشاهای سلولی و تجمع در بیشتر سلول‌ها (۲)، دارای عوارض جانبی غیر قابل برگشتی (۱) همچون، سمیت در بافت‌های سالم و حساس (۵) به خصوص بافت کبد (۸-۶) می‌باشد. از طرفی، افزایش سن نیز با تغییرات فیزیولوژیکی در افراد همراه است که توانایی متابولیزه نمودن و حذف داروها را کاهش می‌دهد. میزان آپوپتوز و روند ترمیم ژنوم در سلول‌ها و اعضای پیر، دچار اختلال می‌شود که شانس ابتلای جمعیت پیر به بیماری سرطان را افزایش می‌دهد و بنابراین، توجه به درمان و کاهش عوارض درمان، در این افراد ضروری به نظر می‌رسد (۱۰-۹).

پژوهش‌های بسیاری، روش‌های تمرینی، دزهای مختلف دارو و مصرف مکمل‌های غذایی را جهت کاهش عوارض دوکسوروبیسین آزموده‌اند. بسیاری از این مطالعات، نشان داده‌اند که تمرینات منظم هوازی، باعث بهبود تعادل اکسیدانی/آنتی‌اکسیدانی ناشی از دوکسوروبیسین در بافت کبد شده است (۸-۷). به نظر می‌رسد راه‌کارهای تمرین ورزشی در حین شیمی‌درمانی (۱۳-۱۲، ۱) و نیز شیوه‌نامه‌های پیش درمان طولانی با بیش از ۱۲ هفته (۱۶-۱۴)، با وجود اثرات مثبت در مقابل استرس اکسایشی ناشی از دارو، با توجه به شرایط جسمی و روحی بیماران و امکان ورزش طولانی در انسان، با توجه به فاصله‌ی کوتاه بین تشخیص و شروع درمان، مورد سؤال است. همچنین، بیشتر مطالعات، به اثر ورزش اجباری بر عوارض ناشی از دوکسوروبیسین پرداخته‌اند (۱۷، ۱۱). در حالی که به نظر می‌رسد، این شیوه‌نامه‌ی ورزشی، خود با استرس اکسایشی همراه است و ممکن است پیامدهای فیزیولوژیک، برای بیماران داشته باشد (۱۸).

پارسایی فر و همکاران، در پژوهشی دریافته‌اند که فعالیت بدنی اختیاری، ابزاری مؤثر در کاهش اثرات سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین در افراد سالمند می‌باشد (۱۹). همچنین، در بسیاری از پژوهش‌های ورزشی و عوارض القای دوکسوروبیسین، از Rat های جوان به عنوان آزمودنی استفاده شده است (۱۳، ۱۱)؛ در حالی که سازگاری آپوپتوزی به ورزش و القای دوکسوروبیسین، می‌تواند تحت تأثیر سالمندی قرار گیرد (۱۰).

از این رو، مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی اثر حفاظتی تمرین

همچنین، مقایسه‌ی بین گروه‌ها نشان داد میزان بیان پروتئین Bax در گروه سالمند + تمرین اختیاری + دوکسوروبیسین نسبت به گروه‌های شاهد خود، تفاوت معنی‌داری داشت و با دو گروه سالمند و سالمند + سالین، تفاوت معنی‌داری نداشت ( $P < 0/05$ ). با توجه به شکل ۲، مقایسه‌ی میزان بیان پروتئین Bcl-2 در گروه‌های پژوهش نیز حاکی از تفاوت معنی‌دار گروه سالمند + تمرین اختیاری + دوکسوروبیسین نسبت به گروه جوان و گروه سالمند + دوکسوروبیسین و عدم معنی‌داری تفاوت با سایر گروه‌ها بود ( $P < 0/05$ ).



شکل ۲. میانگین بیان پروتئین B-cell leukemia 2 (Bcl-2) در گروه‌های پژوهش

Y: جوان، A: سالمند، AD: سالمند + دوکسوروبیسین، AS: سالمند + سالین،

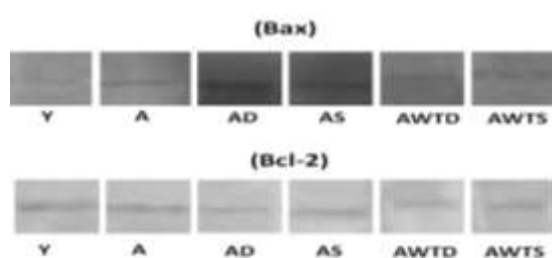
AWTd: سالمند + دوکسوروبیسین + تمرین اختیاری و

AWTs: سالمند + سالین + تمرین اختیاری

\* اختلاف معنی‌دار با گروه سالمند + دوکسوروبیسین

† اختلاف معنی‌دار با گروه سالمند + تمرین اختیاری + دوکسوروبیسین ( $P < 0/05$ ).

نمایش باند Western blot در شکل ۳ نیز حاکی از بیان پایین پروتئین Bax و بیان بالای پروتئین Bcl-2 در گروه‌های تمرینی در مقایسه با گروه‌های شاهد بود.



شکل ۳. باند Western blot پروتئین‌های BCL2-associated X protein (Bax) و B-cell leukemia 2 (Bcl-2) استخراج شده از بافت کبدی

گروه‌های پژوهش

Y: جوان، A: سالمند، AD: سالمند + دوکسوروبیسین، AS: سالمند + سالین،

AWTd: سالمند + دوکسوروبیسین + تمرین اختیاری و

AWTs: سالمند + سالین + تمرین اختیاری

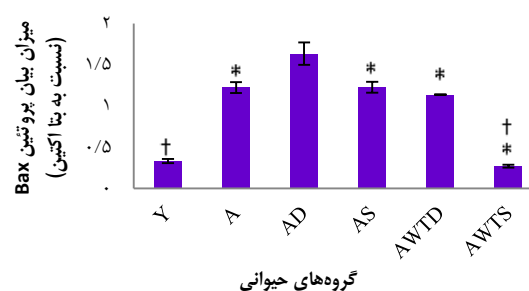
مقدار مساوی (۴۰ میکروگرم در هر چاهک) روی ژل پلی‌آکریل‌آمید قرار داده شد و به مدت ۲-۳ ساعت در ولتاژ ۱۰۰ آمپر الکتروفورز شدند. سپس، ژل به همراه کاغذ Polyvinylidene fluoride (PVDF)، اسفنج‌ها و پدهای دستگاه به صورت ساندریجی، داخل تانک (Cleaver scientific, UK) قرار گرفت و با ۳۵۰ آمپر، الکتروفورز شد. پس از انتقال، کاغذ PVDF، یک ساعت در Blocking buffer گذاشته و Shake داده شد.

بعد از خالی کردن Blocking buffer، آنتی‌بادی اولیه (BioLegend, Canada) روی آن ریخته و Overnight shake داده شدند. روز بعد، کاغذ با Tris buffered saline1X (TBS1X) شسته شد و بار دیگر، به مدت ۵ دقیقه Shake شد. سپس، آنتی‌بادی ثانویه رقیق شده روی آن ریخته شد تا به مدت ۲-۱ ساعت Shake شود. پس از آن، آنتی‌بادی ثانویه خالی شد و ۳ بار به روش قبل شستشو داده شد. در پایان، 3, 3' Diaminobenzidine (DAB) (Sigma, USA) به آن اضافه گردید تا باند قابل مشاهده شود و سپس، از باند اسکن گرفته شد.

**تجزیه و تحلیل داده‌ها:** تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ (IBM Corporation, Armonk, NY) و آزمون One-way ANOVA و مقایسه‌ی آزمون تعقیبی Tukey و در سطح معنی‌داری  $P < 0/05$  انجام شد.

### یافته‌ها

همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، میانگین میزان بیان پروتئین Bax بافت کبدی در گروه سالمند + دوکسوروبیسین، به طور معنی‌داری بالاتر از همه‌ی گروه‌ها بود ( $P < 0/05$ ).



شکل ۱. میانگین بیان پروتئین BCL2-associated X protein (Bax) در گروه‌های پژوهش

Y: جوان، A: سالمند، AD: سالمند + دوکسوروبیسین، AS: سالمند + سالین،

AWTd: سالمند + دوکسوروبیسین + تمرین اختیاری و

AWTs: سالمند + سالین + تمرین اختیاری

\* اختلاف معنی‌دار با گروه سالمند + دوکسوروبیسین

† اختلاف معنی‌دار با گروه سالمند + تمرین اختیاری + دوکسوروبیسین ( $P < 0/05$ ).

کننده‌ی آپوپتوز در سلول‌های سالم کبدی می‌شود. برخی پژوهش‌ها نشان داده‌اند که استرس اکسایشی ناشی از دوکسوروبیسین به علت عدم تعادل عوامل اکسایشی نظیر مالون دی‌آلدئید و عوامل ضد اکسایشی، همانند سوپراکساید دیسموتاز می‌باشد (۷).

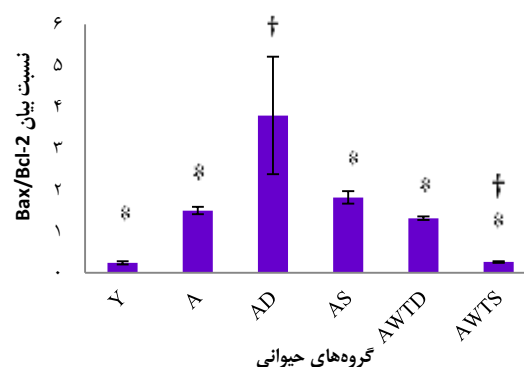
فعالیت بدنی، اگر چه به عنوان یک راه‌کار کمکی جهت کاهش عوارض دوکسوروبیسین در پژوهش‌های بسیاری مورد تأیید قرار گرفته است، اما برخی از پژوهش‌ها نشان داده‌اند که ورزش‌های اجباری (Forced Exercise) با اعمال شوک الکتریکی به حیوان، می‌تواند باعث کاهش بیان آنزیم‌های ضد اکسایشی و افزایش بیان پروتئین‌های اکسایشی شود (۲۱-۲۲).

پس از ورزش‌های شدید، آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد به طور مستقیم و آسیب‌های اکسایشی ناشی از آن به طور غیر مستقیم، همچون پراکسیداسیون لیپیدی، آسیب‌های اکسایشی پروتئین‌ها و ساختارهای ژنومی، در بسیاری از پژوهش‌ها گزارش شده است (۲۱، ۳). Zhenjun و همکاران، در پژوهشی به این نتیجه رسیدند که تمرینات خسته کننده، منجر به افزایش بیان پروتئین Bax و کاهش بیان پروتئین Bcl-2 می‌شود (۲۰). راه‌کار ورزشی مورد استفاده در این پژوهش، شامل ۶ هفته تمرین اختیاری بر روی چرخ دوار، ۴ هفته قبل از القای دوکسوروبیسین و ۲ هفته هم‌زمان با القای آن بود. فعالیت بدنی اختیاری، روش پیشنهادی این پژوهش بود که در آن آزمودنی‌ها بدون اجبار و آزادانه، فعالیت بدنی متناسب با توانایی خود را انجام می‌دادند. این روش تمرینی، با توجه به شرایط بدنی آزمودنی‌ها که تحت تأثیر سالمندی و القای دوکسوروبیسین بودند، انتخاب شده بود. همچنین، بر خلاف مطالعات پیشین که بر روی Rat‌های جوان انجام شده بود (۱۳-۱۱)، در این پژوهش از Rat مدل سالمندی و با تزریق دز تجمعی دوکسوروبیسین که احتمال می‌رفت اثرات سمیت متفاوتی نسبت به دزهای حاد داشته باشد، استفاده گردید.

نتایج پژوهش نشان داد در گروه‌های دریافت کننده‌ی دوکسوروبیسین، بیان پروتئین Bax به طور معنی‌داری نسبت به گروه‌های شاهد خود افزایش پیدا کرده بود. پژوهش‌های دیگری نیز همسو با این پژوهش، حاکی از افزایش بیان پروتئین Bax، به دنبال تزریق دوکسوروبیسین بودند (۲۳-۲۴).

همچنین، پژوهشگران بسیاری نشان دادند که دوکسوروبیسین باعث اختلال عملکرد تنفس میتوکندریایی، آسیب اکسیداتیو و ضایعات هیستوپاتولوژیک و راه انداختن مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده می‌شود (۱۹، ۱۱-۱۲). مقایسه‌ی میزان بیان پروتئین Bax در گروه‌های پژوهش نشان داد که بیان پروتئین Bax در گروه جوان نسبت به گروه‌های سالمند به طور معنی‌داری پایین‌تر بود. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که افزایش سن، با

همچنین، یافته‌ها نشان داد نسبت بیان Bax/Bcl-2 در گروه سالمند + تمرین اختیاری + دوکسوروبیسین با سه گروه جوان، سالمند + دوکسوروبیسین و سالمند + تمرین اختیاری + سالین تفاوت معنی‌داری داشت و نسبت به سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۴) ( $P < 0/05$ ).



شکل ۴. نسبت بیان B-cell leukemia 2/BCL2-associated X protein

در گروه‌های پژوهش

Y: جوان، A: سالمند، AD: سالمند + دوکسوروبیسین، AS: سالمند + سالین،

AWTD: سالمند + دوکسوروبیسین + تمرین اختیاری و

AWTS: سالمند + سالین + تمرین اختیاری

\* اختلاف معنی‌دار با گروه سالمند + دوکسوروبیسین.

† اختلاف معنی‌دار با گروه سالمند + تمرین اختیاری + دوکسوروبیسین ( $P < 0/05$ )

## بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که تمرینات اختیاری قبل و طی درمان با دوکسوروبیسین، می‌تواند از مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول‌های سالم کبدی ناشی از القای دوکسوروبیسین در Rat‌های نر مدل سالمندی پیش‌گیری کند. یکی از مکانیزم‌های اثر دوکسوروبیسین در صورت شکست ترمیم ژنوم، تولید رادیکال‌های آزاد و القای آپوپتوز می‌باشد (۲). رادیکال‌های آزاد، از طریق پروتئین‌های خانواده‌ی Bcl-2 که حاوی دو گروه پیش‌برنده و مهارکننده‌ی آپوپتوز هستند، با آسیب به غشای میتوکندری و رهایش سیتوکروم C، سبب فعال شدن کاسپازها و در نهایت، آپوپتوز سلول‌های آسیب دیده می‌شود (۳) که در این میان، سلول‌های سالم نیز درگیر آسیب و آپوپتوز می‌شوند و این از عوارض این دارو می‌باشد. نتایج پژوهش‌های مختلف، حاکی از افزایش آپوپتوز در بافت‌های حساس سالم، همچون کبد (۸-۶)، به دنبال القای دوکسوروبیسین می‌باشد.

پژوهش حاضر نیز هم‌راستا با این پژوهش‌ها، نشان داد که القای دوکسوروبیسین، باعث افزایش بیان Bax، یکی از پروتئین‌های پیش‌برنده‌ی آپوپتوز و کاهش بیان Bcl-2، از پروتئین‌های مهار

بر خلاف پروتئین Bax که از سیتوپلاسم به غشای میتوکندری انتقال می‌یابد و با تغییراتی در نفوذپذیری غشای خارجی آن سلول‌های آسیب دیده را به سمت آپوپتوز هدایت می‌کند، پروتئین Bcl-2، از طریق اتصال به کانال‌های موجود بر روی میتوکندری موجب حفظ یکپارچگی این غشا می‌شود (۲).

یکی از نتایج قابل توجه این پژوهش، عدم معنی‌داری میزان بیان پروتئین Bcl-2 در گروه سالمند + تمرین اختیاری + دوکسوروبیسین نسبت به گروه سالمند سالم می‌باشد که نشانه‌ی خوبی برای اثرات ورزش اختیاری می‌باشد. همچنین، مقایسه‌ی میزان بیان پروتئین Bcl-2 در گروه‌های پژوهش نشان داد، بیان پروتئین Bcl-2 در گروه جوان نسبت به گروه‌های سالمند به طور معنی‌دار بالاتر بود که نشان می‌دهد بافت جوان فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به بافت سالمند دارد. پژوهش‌های قبلی نشان داده‌اند که تمرین ورزشی در سالمندی، سطوح کاسپاز ۹ و نسبت Bax/Bcl-2 را از طریق کاهش بیان پروتئین Bax و افزایش سطوح Bcl-2، کاهش می‌دهد (۲۹، ۱۱).

Kavazis و همکاران، در پژوهشی نشان دادند تمرین ورزشی باعث افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و پروتئین شوک گرمایی-۷۲ (Heat shock protein 72 یا HSP72) بافت قلب می‌شود و از میوسیت‌ها در مقابل آسیب میتوکندریایی ناشی از دوکسوروبیسین، فعال‌سازی پروتئاز و مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده محافظت می‌کند (۱۷). نسبت Bax/Bcl-2، شاخصی است که نشان دهنده‌ی میزان واقعی آپوپتوز است و مطالعات نشان داده‌اند سطوح بالای پروتئین‌های مهار کننده‌ی آپوپتوز نسبت به پروتئین‌های پیش‌برنده‌ی آپوپتوز، بقا را افزایش می‌دهد؛ در حالی که نسبت معکوس آن منجر به آپوپتوز می‌شود (۲۳-۲۲). یافته‌های پژوهش نشان داد، نسبت Bax/Bcl-2 در گروه‌های دریافت کننده‌ی دوکسوروبیسین بالاتر بود که حاکی از بالا رفتن آپوپتوز در این گروه بعد از القای دوکسوروبیسین می‌باشد. این یافته‌ها، با یافته‌های بسیاری از پژوهش‌ها که نشان دادند القای دوکسوروبیسین باعث افزایش پروتئین‌های پیش‌برنده‌ی آپوپتوز می‌شوند، همسو می‌باشد (۳۳، ۱۷، ۱۱).

همچنین، نسبت Bax/Bcl-2 در گروه سالمند + تمرین اختیاری + دوکسوروبیسین نسبت به گروه سالمند + دوکسوروبیسین تفاوت معنی‌دار داشت و با گروه سالمند سالم تفاوت معنی‌داری نداشت. این یافته، نشان دهنده‌ی افزایش بقا و کاهش آپوپتوز در اثر تمرین ورزشی اختیاری در هیپاتوسیت‌های سالم کبدی ناشی از القای دوکسوروبیسین بود. در معرض فعالیت ورزشی بودن، می‌تواند با افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش استرس اکسیداتیو، باعث کاهش فعالیت پروتئین Bax و مهار آزادسازی سیتوکروم c از میتوکندری و در نتیجه، مانع فعال شدن کاسپاز ۹ و ۳ و مهار آپوپتوز شود (۳۰-۲۹، ۱۱).

اختلال آپوپتوز سلول‌های پیر و آسیب دیده و نیز کاهش توانایی بدن در متابولیسم نمودن و حذف داروها همراه می‌باشد (۹-۱۰)؛ به طوری که میزان صدمه‌ی اکسیداتیو در DNA هسته‌ای و میتوکندریایی موش جوان ۲۴ هزار و در موش‌های پیر، ۶۶ هزار نوکلئوتید در هر سلول می‌باشد (۲۵) و به نظر می‌رسد این عوامل می‌توانند بر اثرات داروی دوکسوروبیسین و پاسخ بدن تغییراتی ایجاد کند.

همچنین، یافته‌های پژوهش نشان داد در گروه‌های دریافت کننده‌ی دوکسوروبیسین که دارای تمرین ورزشی اختیاری به عنوان تیمار بودند، بیان پروتئین Bax به طور معنی‌داری نسبت به گروه‌های شاهد خود کاهش پیدا کرده بود. نتایج برخی پژوهش‌ها، همسو با پژوهش حاضر، حاکی از کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از دوکسوروبیسین در نتیجه‌ی فعالیت بدنی اختیاری در Rat‌ها می‌باشد (۱۹-۱۸). در حالی که پژوهش‌هایی نیز حاکی از بی‌تأثیر بودن تمرین ورزش اختیاری بر روی چرخ گردان بر آسیب‌های بافتی ناشی از دوکسوروبیسین می‌باشد (۲۶).

پس از فعالیت ورزشی، تولید رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن اجتناب ناپذیر است و بدن با طراحی مکانیسم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی، اثرات زیان‌بار آن‌ها را تا حدودی خنثی می‌نماید. اگر چه در صورت افزایش تولید رادیکال‌های آزاد، صدمات ناشی از آن یا استرس اکسیداتیو افزایش می‌یابد؛ اما آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند با مکانیسم‌های مختلفی همچون برداشت اکسیژن یا کاهش غلظت موضعی اکسیژن، برداشت یون‌های فلزی کاتالیتیک مانند  $\text{Cu}^{2+}$  و  $\text{Fe}^{2+}$  برداشت گونه‌های فعال اکسیژن مانند سوپراکساید و هیدروژن پراکساید، اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد را کاهش دهند (۲۷).

تنظیم آپوپتوز بسیار پیچیده است و پروتئین‌های زیادی در مسیرهای فعال شدن آن دخیل هستند. اگر چه در این پژوهش، اتفاقات آپوپتوزی در مسیرهای قبل از فعال شدن Bax بررسی نگردیده است که از محدودیت‌های این مطالعه می‌باشد، اما بسیاری از مطالعات قبلی، حاکی از اثرات مثبت فعالیت بدنی بر ضد اکسایش‌های آنزیمی همچون سوپراکساید دیسموتاز (Superoxide dismutase یا SOD)، کاتالاز (Catalase یا CAT) و پارا اکسوناز-۱ (Paraoxonase یا PON1) و ضد اکسایش‌های غیر آنزیمی همچون گلووتاتیون (Glutathione یا GSH)، اسید اوریک، بیلی‌روبین و یویکینون می‌باشند که در نهایت، منجر به افزایش برداشت رادیکال‌های آزاد توسط آن‌ها (۲۹-۲۸، ۱۳، ۷، ۳) و کاهش احتمالی فعالیت آپوپتوزی می‌شود. به نظر می‌رسد قرار گرفتن مداوم در معرض تمرینات بدنی، می‌تواند سازگاری‌های آنزیمی را که مسئولیت کاهش استرس اکسایشی را بر عهده دارند، افزایش دهد. احتمال می‌رود مهار اکسیدان‌ها و تنظیم مثبت آنتی‌اکسیدان‌ها در بیان پروتئین Bax نقش داشته باشد (۲۵، ۲۳).

دوکسوروبیسین، بتواند میزان آپوپتوز سلول‌های سالم کبدی را کاهش و بقای آن‌ها را افزایش دهد که می‌تواند راه‌کاری سالم، جهت کاهش عوارض داروی دوکسوروبیسین باشد.

با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، می‌توان به تمرینات اختیاری قبل از شروع درمان با داروی شیمی‌درمانی دوکسوروبیسین به خصوص برای افراد مسن و با توجه به توانایی بدن آن‌ها، به عنوان راه‌کاری غیر دارویی، بی‌خطر و کم هزینه در برابر استرس اکسایشی ناشی از دارو، توجه بیشتری نمود.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه‌ی مقطع دکتری می‌باشد که با هزینه‌ی شخصی اجرا شده است. پژوهشگران از دانشکده‌ی علوم ورزشی دانشگاه مازندران جهت فراهم‌سازی مقدمات اجرای مطالعه‌ی حاضر سپاسگزاری می‌نمایند.

پژوهش‌ها نشان دادند فعالیت بدنی، افزایش پروتئین کربونیل، مالون دی‌آلدئید، Bax، نسبت Bax/Bcl-2 ناشی از القای دوکسوروبیسین را تعدیل می‌کند (۱۷، ۱۱). احتمال می‌رود فعالیت بدنی با تنظیم مثبت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی همچون افزایش بیان پروتئین شوک گرمایی، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز و دیگر آنتی‌اکسیدان‌ها از آسیب‌های بافتی در مقابل دوکسوروبیسین محافظت کند (۲۹-۲۸، ۱۷، ۳).

به طور خلاصه، نتایج مطالعه‌ی حاضر، حاکی از آن است که ۶ هفته تمرین اختیاری، ۴ هفته قبل و ۲ هفته در حین درمان با دوکسوروبیسین، توانست میزان آپوپتوز سلول‌های سالم کبدی را از طریق کاهش پروتئین Bax و افزایش پروتئین Bcl-2 کاهش دهد. همچنین، در گروه‌های تمرینی، نسبت Bax/Bcl-2 کاهش یافت که تأییدی دیگر در کاهش میزان آپوپتوز و افزایش بقای سلول‌های سالم کبدی می‌باشد. به نظر می‌رسد، تمرینات اختیاری قبل و حین درمان با

### References

- Smuder AJ, Kavazis AN, Min K, Powers SK. Doxorubicin-induced markers of myocardial autophagic signaling in sedentary and exercise trained animals. *J Appl Physiol* (1985) 2013; 115(2): 176-85.
- Pecorino L. Molecular biology of cancer: Mechanisms, targets, and therapeutics. Oxford, UK: Oxford University Press; 2008. p. 71-9.
- Afzalpour ME, Taheri Chadorneshin H. Physical activity and oxidative pressure. Tehran, Iran: Bamdad Ketab; 2014. p. 23-95. [In Persian].
- Dadban-Shahamat M. Cellular and molecular mechanisms of the effects of physical activity on cancer. Proceedings of the 5<sup>th</sup> National Conference on Applied Science in Sport; 2016 Dec 23; Ali Abad Katoul, Iran.
- Alexieva B, Sainova IV, Pavlova VG, Markova T, Nikolova EB. Insights into mechanisms of doxorubicin cardiotoxicity. *J Phys Pharm Adv* 2014; 4(3): 342-8.
- Salouge I, Ben AR, Ben SD, Elkadri N, Kourda N, Lakhali M, et al. Means of evaluation and protection from doxorubicin-induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats. *J Cancer Res Ther* 2014; 10(2): 274-8.
- Zolfagharzadeh F, Roshan VD. Pretreatment hepatoprotective effect of regular aerobic training against hepatic toxicity induced by Doxorubicin in rats. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14(5): 2931-6.
- Alishahi A, Nasiri S. The protective effect of regular aerobic training on doxorubicin-induced hepatotoxicity in rats: the insulin-like growth factor system. *Zahedan J Res Med Sci* 2014; 16(12): 59-64.
- Mangoni AA, Jackson SH. Age-related changes in pharmacokinetics and pharmacodynamics: basic principles and practical applications. *Br J Clin Pharmacol* 2004; 57(1): 6-14.
- Lu B, Chen H, Hong-Guang H. The relationship between apoptosis and aging. *Adv Biosci Biotechnol* 2012; 3(6):705-711.
- Ascensao A, Magalhaes J, Soares JM, Ferreira R, Neuparth MJ, Marques F, et al. Moderate endurance training prevents doxorubicin-induced in vivo mitochondriopathy and reduces the development of cardiac apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289(2): H722-H731.
- Ashrafi J, Dabidi Roshan V, Mahjoub S. Cardioprotective effects of aerobic regular exercise against doxorubicin-induced oxidative stress in rat. *Afr J Pharm Pharmacol* 2012; 6(31): 2380-8.
- Shirinbayan V, Dabidi-Roshan V, Mahjoub S. The therapeutic effect of endurance training on adriamycin-induced cardiac stress in rats. *Journal of Health and Physical Activity* 2013; 7(4): 8-17.
- Kim EJ, Hwang S. Effects of aerobic exercise on antioxidants in rat models with cardiomyopathy. *Phys Ther Rehabil Sci* 2015; 4(1):17-21.
- Huang CC, Chiang WD, Huang WC, Huang CY, Hsu MC, Lin WT. Hepatoprotective effects of swimming exercise against D-galactose-induced senescence rat model. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013; 2013: 275431.
- Santana ET, Serra AJ, Silva Junior JA, Bocalini DS, Barauna VJG, Krieger JJE, et al. Aerobic exercise training induces an anti-apoptotic milieu in myocardial tissue. *Motriz Revista de Educacao Fisica* 2014; 20(2): 233-8.
- Kavazis AN, Smuder AJ, Min K, Tumer N, Powers SK. Short-term exercise training protects against doxorubicin-induced cardiac mitochondrial damage independent of HSP72. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010; 299(5): H1515-H1524.
- Chicco AJ, Schneider CM, Hayward R. Voluntary

- exercise protects against acute doxorubicin cardiotoxicity in the isolated perfused rat heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 289(2): R424-R431.
19. Parsaeifar A, Dabidi Roshan V, Mazaheri Z. cardioprotective effect of voluntary physical activity on changes of doxorubicin-induced cardiac myosin heavy chain expression in aging model rats. *J Urmia Univ Med Sci* 2017; 27(10): 893-901. [In Persian].
  20. Kim SY, Lee J. Exercise training suppresses vascular fibrosis in aging obesity induced rats. *J Exerc Nutrition Biochem* 2014; 18(2): 175-80.
  21. Zhenjun T, Weixin X, Linong D. Effect of exercise training on expression of NOS, Bcl-2 and Bax in liver tissue of rats. *Journal of Chengdu Sport University* 2006; (5): 100-3.
  22. Chicco AJ, Hydock DS, Schneider CM, Hayward R. Low-intensity exercise training during doxorubicin treatment protects against cardiotoxicity. *J Appl Physiol* (1985) 2006; 100(2): 519-27.
  23. Sharifi F, Roshan V, Mazaheri Z. Effect of pretreatment of aerobic training on doxorubicin-induced left ventricular apoptosis gene expression in aging model rats. *Modares J Med Sci Pathol* 2016; 19(2): 29-43. [In Persian].
  24. Mohammadi Gorji S, Karimpour Malekshah AA. Effect of doxorubicin on Bcl2 and Bax expression in Rat heart. *J Gorgan Univ Med Sci* 2013; 15(1): 19-24. [In Persian].
  25. Yari R. Cell ageing and biotechnology. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal* 2011; 1(4): 7-26. [In Persian].
  26. Sadat-Hoseini SK, Dabidi Roshan V. Is sub-chronic exercise in Combination with medicinal nanoparticles a protective strategy against Doxorubicin-induced Hepatic oxidative stress and apoptosis in aging model rats? *Nanomedicine Journal* 2017; 4(4): 224-31.
  27. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? *J Neurochem* 2006; 97(6): 1634-58.
  28. Javid AH, Dabidi Roshan V. Effects of six weeks of continuous training with and without nanocurcumin supplementation on doxorubicin-induced hepatotoxicity in an aging rat model. *Pathobiology Research* 2017; 19(4): 1-12. [In Persian].
  29. Kwak HB, Song W, Lawler JM. Exercise training attenuates age-induced elevation in Bax/Bcl-2 ratio, apoptosis, and remodeling in the rat heart. *FASEB J* 2006; 20(6): 791-3.
  30. Jafari A, Pourrazi H, Nikookheslat S, Baradaran B. Effect of exercise training on Bcl-2 and Bax gene expression in the rat heart. *Gene, Cell and Tissue* 2015; 2(4): e32833.

## The Protective Effect of 6 Weeks of Voluntary Training on Liver Apoptosis Induced by Doxorubicin in Aging Model Rats

Minoo Dadban-Shahamat<sup>1</sup>, Valiollah Dabidi-Roshan<sup>2</sup>, Touraj Farazmandfar<sup>3</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Different training methods have been presented to reduce the side effects of doxorubicin and it seems that according to patient's condition, the time to start exercises, and the duration and stress of exercise should be considered. This study aimed to investigate the preventive effect of voluntary exercise on liver apoptosis induced by doxorubicin in aging model rats.

**Methods:** 42 adult male Wistar rats were divided into 6 equal groups of young, aging, aging + saline, aging + doxorubicin, aging + doxorubicin + voluntary training, and aging + saline+ voluntary training. Voluntary training was performed in cages equipped with a running wheel for six weeks individually and freely. At the same time, as the end of the training, doxorubicin or saline solution was injected with a cumulative dose (1 mg/kg). 48 hours after completion of the training, liver tissue sampling was performed to assess the apoptosis via examining the expression of Bax and B-cell leukemia 2 (Bcl-2) proteins using western blot method.

**Findings:** One-way analysis of variance showed that in the training groups, the expression level of Bax protein and Bax/Bcl-2 ratio decreased significantly, and the expression of Bcl-2 protein was significantly increased in comparison to the control groups.

**Conclusion:** Voluntary exercises prior to treatment with doxorubicin can reduce apoptosis and increase survival in healthy elderly hepatocytes via reducing the Bax protein and the Bax/Bcl-2 ratio, thereby reducing the side effects of doxorubicin.

**Keywords:** Exercise, Apoptosis, Doxorubicin, Aging, Bax protein, B-cell leukemia 2 family proteins

**Citation:** 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.

1- PhD Student in Exercise Physiology, Department of Physical Education, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran

2- Professor, Department of Exercise Physiology, School of Sport Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

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

**Corresponding Author:** Valiollah Dabidi-Roshan, Email: v.dabidi@umz.ac.ir