

Original Article

Interactive effects of aerobic training and Crocin supplementation on some apoptosis markers in kidney tissue of rats exposed to doxorubicin

Maskanati F¹, Ghasemian SO^{2*}, Khanmohammadi R¹, Salehi OR³

1- Department of Sport Physiology, Behbahan Branch, Islamic Azad University, Behbahan, I.R. Iran.

2- Department of Veterinary, Behbahan Branch, Islamic Azad University, Behbahan, I.R. Iran.

3- Department of Physical Education and Sport Sciences, University of Kurdistan, Sanandaj, I.R. Iran.

Received: 2022/10/2 | Accepted: 2022/12/17

Abstract:

Background: The use of doxorubicin for therapeutic purposes is associated with the occurrence of kidney disorders. However, this study aimed to investigate the interactive effects of aerobic training and Crocin supplementation on B-lymphocyte lymphoma 2 (Bcl-2) and Bcl-2-associated X protein (Bax) in kidney tissue of rats exposed to doxorubicin.

Materials and Methods: 40 male Wistar rats (age 8-10 weeks, weight 200-220 grams) were randomly divided to groups: (1) healthy control, (2) doxorubicin (2 mg/kg/day), (3) doxorubicin+training, (4) doxorubicin+crocin and (5) doxorubicin+exercise+crocin. Aerobic training was performed for eight weeks, three sessions a week (with an intensity of 60-70% of VO_{2max}); and crocin was gavaged 50 mg/kg/day. To analyze the data, one-way analysis of variance with Tukey's post hoc test was used ($P \geq 0.05$).

Results: Bax and Bax/BCL2 ratio were lower in doxorubicin+crocin and doxorubicin+exercise+crocin groups and BCL2 values were higher than doxorubicin group ($P=0.001$). Bax and Bax/BCL2 ratio in doxorubicin+exercise group were lower than doxorubicin group ($P=0.001$). Bax and Bax/BCL2 ratio were lower in doxorubicin+exercise+crocin group and BCL2 was higher in this group than doxorubicin+crocin group ($P=0.001$). BCL2 in the doxorubicin+exercise+crocin group was higher and the Bax/BCL2 ratio in this group was lower than the doxorubicin+exercise group ($P=0.001$).

Conclusion: It seems that aerobic training with reduction of Bax and Crocin with increase of BCL2 have favorable effects on the inhibition of apoptosis in the kidney tissues of rats. But these two interventions have an interactive effect in inhibiting the apoptosis of kidney tissue following exposure to doxorubicin.

Keywords: Exercise training, Crocin, Apoptosis, Kidney, Doxorubicin, Rats

***Corresponding Author**

Email: ghasemian1249@yahoo.com

Tel: 0098 916 671 1475

Fax: 0098 615 287 0109

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, January, 2023; Vol. 27, No 6, Pages 683-690

Please cite this article as: Maskanati F, Ghasemian SO, Khanmohammadi R, Salehi OR. Interactive effects of aerobic training and Crocin supplementation on some apoptosis markers in kidney tissue of rats exposed to doxorubicin. *Feyz* 2023; 27(6): 683-90.

اثرات تعاملی تمرین هوایی و مکمل کروسین بر برخی نشانگرهای آپوپتوزی کلیه در موش‌های صحرایی در معرض دوکسوروبیسین

فیروزه مسکنی^۱، سیده ام البنین قاسمیان^{۲*}، رحمت‌الله خان محمدی^۱، امیرضا صالحی^۱

خلاصه:

سابقه و هدف: استفاده از دوکسوروبیسین برای اهداف درمانی با بروز اختلالات کلیوی همراه است. بنابراین هدف مطالعه حاضر، بررسی اثر تعاملی تمرین هوایی و مکمل کروسین بر مقادیر لنفوцит ۲ (Bcl-2) و پروتئین X وابسته به Bax (Bcl-2) و نسبت Bax/Bcl-2 کلیه در موش‌های صحرایی در معرض دوکسوروبیسین بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستان (با سن ۸-۱۰ هفته و وزن ۲۰۰-۲۲۰ گرم) به طور تصادفی به گروه‌های (۱) کنترل سالم، (۲) دوکسوروبیسین (۳ mg/kg/day)، (۳) دوکسوروبیسین + تمرین، (۴) دوکسوروبیسین + کروسین و (۵) دوکسوروبیسین + تمرین + کروسین تقسیم شدند. تمرینات هوایی برای مدت هشت هفته، سه جلسه در هفته با شدت ۶۰-۷۰ درصد VO_{2max} انجام شد و مصرف کروسین روزانه ۵۰ mg/kg/day بود. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یکراهمه همراه با آزمون تعقیبی توکی استفاده شد ($P < 0.05$).

نتایج: مقادیر Bax در گروه‌های Bax/BCL2 و نسبت Bax/BCL2 بالاتر از گروه دوکسوروبیسین بود ($P = 0.001$). مقادیر Bax و نسبت Bax/BCL2 در گروه دوکسوروبیسین + تمرین کمتر از گروه دوکسوروبیسین بود ($P = 0.001$). مقادیر Bax و نسبت Bax/BCL2 در گروه دوکسوروبیسین + تمرین + کروسین کمتر و مقادیر BCL2 در این گروه بالاتر از گروه دوکسوروبیسین + کروسین بود ($P = 0.001$). مقادیر BCL2 در گروه دوکسوروبیسین + تمرین + کروسین بالاتر و نسبت Bax/BCL2 در این گروه کمتر از گروه دوکسوروبیسین + تمرین بود ($P = 0.001$).

نتیجه‌گیری: بدنبال می‌رسد که تمرین هوایی با کاهش Bax و کروسین با افزایش BCL2 اثرات مطلوبی بر مهار آپوپتوز در بافت کلیه موش‌های صحرایی دارند. اما این دو مداخله به طور تعاملی نیز دارای اثرات مهارکننده آپوپتوز در بافت کلیه، متعاقب قرار گرفتن در معرض دوکسوروبیسین می‌باشد.

واژگان کلیدی: تمرین، کروسین، آپوپتوز، کلیه، دوکسوروبیسین، موش صحرایی

دوما نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و ششم، شماره ۶، بهمن-اسفند ۱۴۰۱، صفحات ۶۹۰-۶۸۳.

محققان اعتقاد دارند که اصلی‌ترین علل آسیب به بافت‌ها متعاقب تجویز DOX، افزایش رادیکال‌های آزاد و برهم‌خوردن تعادل اکسیدان - آنتی‌اکسیدانی است. اطلاعات نشان می‌دهند که افزایش DNA استرس اکسیداتیو در بافت به تمایل پیوند آن‌ها با پروتئین‌ها، و پراکسیداسیون لبیدی منجر می‌گردد و از این سیر با اختلال در میزان بیان P53 به افزایش مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (آپوپتوز) و اختلال در نشانگرهای آن مانند پروتئین لنفو ۲ خانواده سلول B B-cell lymphoma (BCL2) و پروتئین X وابسته به BCL2-associated X protein (BAX) و درنهایت برهم‌خوردن تعادل بین Bax به BCL2 منجر می‌شود. به‌گونه‌ای که مطالعات پیشین نشان دادند، دوکسوروبیسین موجب کاهش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPx)، کاتالاز (Cat) و افزایش مالوندی‌آلدئید [۲] و درنهایت آپوپتوز کلیوی می‌شود [۳]. از طرفی امروزه باتوجه به تأثیر سبک زندگی و نقش فعالیت‌های بدنی بر سلامت افراد، اعتقاد بر این است که انجام آن‌ها می‌تواند در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها نقش داشته

مقدمه

امروزه باتوجه به تغییر شرایط و سبک زندگی و افزایش آلاینده‌ها، ابتلا به بیماری سرطان افزایش یافته است؛ اگرچه دوکسوروبیسین (DOX) به عنوان یکی از داروهای آنتراسایکلین در درمان بیماری سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرد. محققان بر این باورند که داروی DOX در متوقف کردن چرخه سلول‌های سرطانی مؤثر است و فرآیند مرگ سلولی را در آن‌ها فعال می‌کند؛ ولی همواره این دارو بر روی بقیه بافت‌ها و اندام‌های بدن از جمله کلیه، اثرات سمی دارد [۱].

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد بهبهان، دانشگاه آزاد اسلامی، بهبهان، ایران
۲. گروه دامپزشکی، واحد بهبهان، دانشگاه آزاد اسلامی، بهبهان، ایران
۳. گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

* نشان نویسنده مسئول:

گروه دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بهبهان
تلفن: ۰۹۱۶۶۷۱۱۴۸۵ - ۰۹۱۵۲۷۰۱۰۹

پست الکترونیک: ghasemian1249@yahoo.com
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۱/۹/۲۶
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۷/۱۰

مواد و روش‌ها

نگهداری حیوانات

این نکته گفتنی است که تمام اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی براساس معاهده هالسینکی و تحت نظر کمیته اخلاق در پژوهش‌های زیست‌پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بهبهان با کد مصوب IR.IAU.BEBAHAN.REC.1400.010 رعایت گردید. در این مطالعه تجربی، تعداد ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با محدوده سنی ۸–۱۰ هفته و وزن ۲۰۰–۲۲۰ گرم از مرکز پرورش و تکثیر حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی اهواز تهیه شدند و به مدت یک هفته جهت سازگاری در آزمایشگاه تربیت بدنی این دانشگاه نگهداری شدند. موش‌های صحرایی در این تحقیق در شرایط استاندارد مانند چرخه روشنایی – تاریکی ۱۲ ساعته، رطوبت نسبی ۵۵ درصد، دمای ۲۲–۲۴ درجه سانتی‌گراد، محیط آرام و بدون سروصدای، در قفس‌های پلی‌کربنات با قابلیت شستشو و دسترسی آزاد به آب و غذای ویژه موش‌های صحرایی نگهداری شدند.

گروه‌بندی و مداخله‌ها

در این تحقیق، موش‌های صحرایی پس از طی دوره سازگاری به طور تصادفی به گروه‌های زیر تقسیم شدند:

(۱) کنترل سالم (HC): بدون هیچ گونه مداخله‌ای در طی تحقیق

(۲) دوکسوروبیسین (DOX): mg/kg ۲ در روز (دوز تجمعی

۱۴ mg/kg در هفته به صورت تزریق صفاقی)

(۳) DOX + تمرین هوایی (DOX + AT): دوکسوروبیسین +

تمرین هوایی به مدت هشت هفته

(۴) DOX + مکمل کروسین (DOX + Cr): دوکسوروبیسین +

صرف کروسین با دوز ۵۰ mg/kg روزانه به صورت گاواز

(۵) DOX + AT + Cr: دوکسوروبیسین + هشت هفته تمرین +

صرف گروسین

آشنازی با تمرین و ارزیابی توان هوایی

پس از طی سازگاری، ابتدا موش‌های صحرایی در گروه‌های تمرینی به مدت یک هفته روزانه ۱۰ دقیقه با سرعت ۸ متر بر دقیقه با نوارگردان آشنا شدند. در ادامه در روز هشتم ابتدا موش‌های صحرایی به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه گرم کردند و در ادامه به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۱۵ متر بر دقیقه دویدند. پس از آن به ازای هر دو دقیقه سرعت نوارگردان ۲ متر بر دقیقه اضافه گردید و این عمل تا زمانی ادامه یافت که موش‌های صحرایی دیگر قادر به دویدن بر روی نوارگردان نبودند. با توجه به تحقیقات انجام شده، حداقل سرعت در این آزمون معادل با حداقل اکسیژن مصرفی بود

[۱۲].

باشد [۴]. به عقیده محققان، فعالیت‌های ورزشی با افزایش بیان آنتی‌اکسیدان‌ها و کاهش استرس اکسیداتیو به مهار رهایش سیتوکروم - C از دیواره میتوکندری و جلوگیری از آپوپتوز منجر می‌شوند؛ همچنین فعالیت‌های بدنی منظم و طولانی مدت با کاهش عوامل التهابی و تعدیل پروتئین‌های ضد آپوپتوز مانند P53 و BCL2 از افزایش Bax و Bad جلوگیری می‌کنند [۴] و تمرینات ورزشی منظم موجب افزایش SOD، GPx و کاهش MDA در بافت کلیه و کبد موش‌های صحرایی سالمند گردید [۵]. در یک مطالعه دیگر، تمرین موجب افزایش BCL2 در بافت کلیه موش‌های صحرایی در معرض کادمیوم گردید؛ اما اثر معنی‌داری بر کاهش مقادیر Bax نداشت [۶]. اگرچه مطالعات، نقش تمرینات ورزشی را بر بیماری‌ها و سمیت برخی مواد نشان می‌دهند؛ با این حال مکانیسم دقیق تمرینات ورزشی بر استرس اکسیداتیو و آپوپتوز هنوز ناشناخته است؛ اما محققان حوزه علم ورزشی اخیراً به استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و گیاهان دارویی در کنار فعالیت‌های ورزشی علاوه‌مند شده‌اند. از بین مواد مؤثره گیاهان دارویی، کروسین به عنوان ماده اصلی تشکیل‌دهنده زعفران است که اثرات ضد آپوپتوزی آن در مطالعات قبل گزارش شده است [۷]. براساس مطالعات، کروسین با دارای بودن خواص آنتی‌اکسیدانی، تنظیم کننده‌گی متabolیت‌های بدن و بهبود شاخص‌های مرتبط با سلامت جسم در کاهش خطر ابتلا به بیماری نقش دارد [۸]. به گونه‌ای که در مطالعه‌ای مصرف کروسین موجب افزایش نشانگرهای رگزایی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و رگزایی در بافت کلیه در معرض rhabdomyolysis گردید [۹]. همچنین مصرف کروسین موجب افزایش آنتی‌اکسیدان‌ها و تعدیل فعالیت عامل پس‌ترجمه‌ای رشد بتا (TGF- β) در بافت کلیه موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت گردید [۱۰]. علاوه‌بر این در ارتباط با اثر همزمان تمرین و کروسین نیز مطالعاتی انجام شده است که نشان داده‌اند تعامل تمرین و کروسین موجب افزایش فعالیت برخی آنتی‌اکسیدان‌ها در بافت بیضه [۱۱] و کبد [۱۲] موش‌های صحرایی در معرض دوکسوروبیسین گردیده است. با توجه به بررسی‌های انجام شده به نظر می‌رسد که سمیت ناشی از DOX در بافت‌های مختلف، از جمله کلیه به آسیب‌های جبران‌ناپذیری منجر می‌شود و عده این آسیب‌ها از مسیرهای استرس اکسیداتیوی و آپوپتوزی است؛ بنابراین انجام مطالعات بنیادی برای درک بهتر مکانیسم تعامل تمرینات ورزشی و کروسین می‌تواند به پیشگیری از آسیب‌های پیش‌رونده در این شرایط منجر شود. درنتیجه هدف مطالعه حاضر، بررسی اثر تمرین هوایی و مکمل کروسین بر برخی از نشانگرهای آپوپتوزی بافت کلیه در موش‌های صحرایی در معرض دوکسوروبیسین بود.

تمرین هوایی

در هفته اول موش‌های صحرایی با شدت ۶۰ درصد $VO_{2\text{max}}$ (معادل ۲۴ متر در دقیقه) به مدت ۱۶ دقیقه، هفته دوم با ۶۵ درصد $VO_{2\text{max}}$ (معادل ۲۶ متر بر دقیقه) به مدت ۲۴ دقیقه و هفته سوم به بعد با شدت ۷۰ درصد $VO_{2\text{max}}$ (معادل ۲۸ متر در دقیقه) به مدت ۳۲ دقیقه تمرین کردند. این نکته گفتگو است که از هفته سوم به بعد تنها زمان تمرین اضافه گردید و از ۲۲ دقیقه به ۴۰ دقیقه در هفته هشتم رسید. علاوه بر این در ابتدا و انتهای تمرینات ورزشی، مدت زمان ۵ دقیقه تمرین با سرعت ۱۵–۲۰ متر بر دقیقه معادل ۵۰–۶۰ درصد اکسیژن مصرفی برای گرم کردن و سرد کردن در نظر گرفته شد [۱۱].

صرف دوکسوروپیسین

برای گروه‌های مصرف دوکسوروپیسین در طی تحقیق، دوکسوروپیسین تهیه شده از شرکت سبحان کشور ایران (Sobhan Oncology, Rasht, Iran) در نرمال‌سالین حل شد و روزانه ۲ mg/kg و دوز تجمعی ۱۴ mg/kg موش‌های صحرایی به صورت صفاقی به موش‌های صحرایی تزریق گردید [۱۱].

صرف کروسین

ابتدا کروسین از شرکت سیگما آلدربیچ کشور آمریکا تهیه شد. در ادامه کروسین به میزان ۵۰ میلی گرم بر کیلو گرم به ازای هر کیلو گرم از وزن بدن موش‌های صحرایی گواز شد [۱۱].

تشريح و نمونه‌برداری

در ادامه ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین و در حالت ۱۲ ساعت ناشتابی، موش‌های صحرایی با تزریق ترکیب کاتامین (۵۵ mg/kg) و زایلازین (۲۰ mg/kg) بیهوش شدند. برای تشخیص بیهوشی و عدم حس درد، آزمون‌های درد (با استفاده از فشردن اندام عقبی) در موش‌های صحرایی انجام شد و پس از اطمینان از بیهوشی، ابتدا حفره شکمی با استفاده از تیغ جراحی سایز ۲۰ باز شد و پس از کنار زدن بافت‌های دیگر، بافت کلیه جدا گردید و بلا فاصله در دمای ۷۰–۷۵°C در داده شد تا در اوّلین فرست، جهت اندازه‌گیری متغیرها به آزمایشگاه تشخیص طبی منتقل شود.

روش اندازه‌گیری متغیرها

سطوح $Bcl-2$ با استفاده از روش الایزا براساس راهنمای مندرج در کیت تجاری Anti- $Bcl-2$ antibody(ab59348) Abcam اندازه‌گیری شد. همچنین مقادیر Bax با استفاده از روش Anti- Bax الایزا و راهنمای مندرج در کیت تجاری Anti- Bax antibody[E63](ab32503), Abcam صحرایی اندازه‌گیری شد.

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

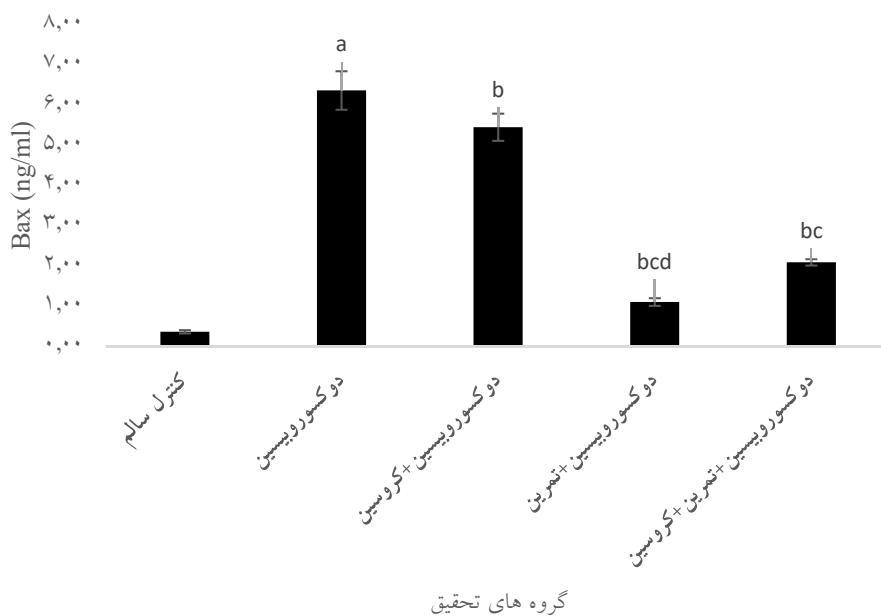
جهت بررسی نرمال‌بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیرو-ولک استفاده شد. در ادامه با توجه به نرمال‌بودن توزیع داده‌ها جهت بررسی تفاوت گروه‌ها آزمون تحلیل واریانس یکراهنگ به کار رفت و در صورت معنی دار بودن برای تعیین محل تفاوت بین گروه‌ها از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. داده‌های تحقیق حاضر در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ تجزیه و تحلیل شدند؛ همچنین ترسیم نمودارها توسط نرم‌افزار اکسل نسخه ۲۰۱۹ انجام شد. علاوه بر این سطح معنی داری برای تمام آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

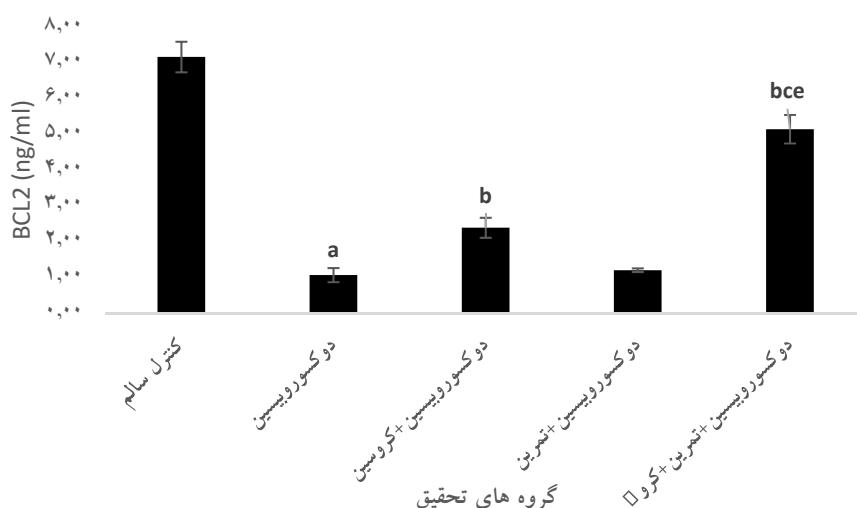
در جدول شماره ۱ میانگین و انحراف استاندارد داده‌ها ارائه شده است و در ادامه نتایج آزمون آنالیز واریانس یکراهنگ نشان داد که تفاوت معنی داری در مقادیر Bax ($F=۷۹۴/۵۱$ و $P=۰/۰۰۱$)، $Bax/BCL2$ ($F=۶۱۷/۷۰$ و $P=۰/۰۰۱$) و نسبت $BCL2$ ($F=۲۴۸/۰۵$ و $P=۰/۰۰۱$) در گروه‌های تحقیق وجود دارد. نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد که مقادیر Bax در گروه DOX به طور معنی داری بالاتر از گروه HC بود ($P=۰/۰۰۱$)؛ اما در گروه‌های DOX + AT ($P=۰/۰۰۱$)، DOX + Cr ($P=۰/۰۰۱$) + AT + Cr ($P=۰/۰۰۱$) و DOX + Cr ($P=۰/۰۰۱$) + AT ($P=۰/۰۰۱$) به طور معنی داری کمتر از گروه DOX+Cr ($P=۰/۰۰۱$) + AT + Cr ($P=۰/۰۰۱$) بود. علاوه بر این در گروه DOX + AT به طور معنی داری کمتر از گروه DOX + AT + Cr ($P=۰/۰۰۱$) بود ($P=۰/۰۰۱$) (نمودار شماره ۱). همچنین در گروه‌های DOX + AT ($P=۰/۰۰۱$) و DOX + Cr ($P=۰/۰۰۱$) + AT ($P=۰/۰۰۱$) به طور معنی داری کمتر از گروه $BCL2$ در گروه DOX بود ($P=۰/۰۰۱$). اما در گروه‌های DOX + Cr ($P=۰/۰۰۱$) و DOX + AT + Cr ($P=۰/۰۰۱$) به طور معنی داری بالاتر از گروه DOX بود؛ ولی تفاوت معنی داری در گروه‌های DOX+AT با DOX مشاهده نشد ($P=۰/۸۹$). علاوه بر این در گروه‌های DOX + AT + Cr ($P=۰/۰۰۱$) به طور معنی داری بالاتر از گروه DOX + AT ($P=۰/۰۰۱$) و DOX + Cr ($P=۰/۰۰۱$) بود (نمودار شماره ۲). نسبت $Bax/BCL2$ در گروه DOX به طور معنی داری بالاتر از گروه HC بود ($P=۰/۰۰۱$)؛ ولی در گروه‌های DOX + Cr ($P=۰/۰۰۱$) و DOX + AT + Cr ($P=۰/۰۰۱$) به طور معنی داری کمتر از گروه DOX بود. همچنین نسبت $Bax/BCL2$ در گروه DOX + AT + Cr ($P=۰/۰۰۱$) به طور معنی داری بالاتر از گروه DOX + AT ($P=۰/۰۰۱$) بود (نمودار شماره ۳).

جدول شماره ۱- میانگین و انحراف استاندارد متغیرهای تحقیق در گروههای مورد مطالعه

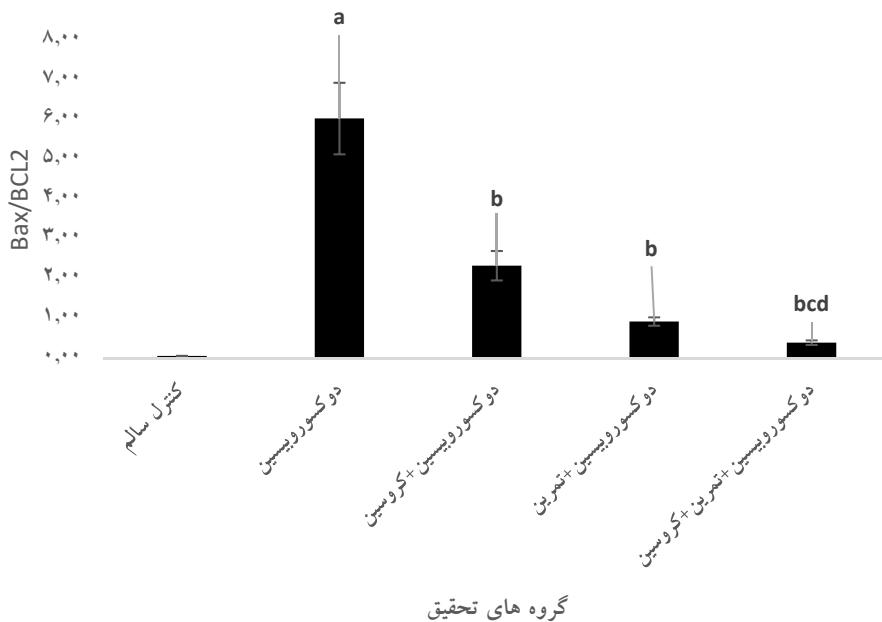
Bax/Bcl2	Bcl2 (ng/ml)	Bax (ng/ml)	
۰/۰۵ ± ۰/۰۰۱	۷/۱۹ ± ۰/۴۳	۰/۳۷ ± ۰/۰۴	کنترل سالم
۶/۰۳ ± ۰/۹۰	۱/۰۶ ± ۰/۲۰	۶/۳۶ ± ۰/۴۸	دوکسوروپیسین
۲/۳۳ ± ۰/۳۷	۲/۳۹ ± ۰/۲۸	۵/۴۵ ± ۰/۳۴	دوکسوروپیسین + کروسین
۰/۹۲ ± ۰/۱۱	۱/۲۰ ± ۰/۰۵	۱/۱۱ ± ۰/۱۰	دوکسوروپیسین + تمرین
۰/۳۹ ± ۰/۰۶	۵/۱۴ ± ۰/۴۰	۲/۰۹ ± ۰/۰۸	دوکسوروپیسین + تمرین + کروسین



نمودار شماره ۱- نتایج آزمون آنالیز واریانس یکراهه برای بررسی تغییرات مقادیر Bax در بافت کلیه موش های صحرایی در گروههای تحقیق (P=۰/۰۰۱) a افزایش معنی دار نسبت به گروه کنترل سالم، b (P=۰/۰۰۱) کاهش معنی دار نسبت به گروه دوکسوروپیسین، c (P=۰/۰۰۱) a افزایش معنی دار نسبت به گروه دوکسوروپیسین + کروسین، d (P=۰/۰۰۱) کاهش معنی دار نسبت به گروه دوکسوروپیسین + تمرین + کروسین



نمودار شماره ۲- نتایج آزمون آنالیز واریانس یکراهه برای بررسی تغییرات مقادیر BCL2 در بافت کلیه موش های صحرایی در گروههای تحقیق (P=۰/۰۰۱) a کاهش معنی دار نسبت به گروه کنترل سالم، b (P=۰/۰۰۱) a افزایش معنی دار نسبت به گروه دوکسوروپیسین، c (P=۰/۰۰۱) a افزایش معنی دار نسبت به گروه دوکسوروپیسین + کروسین، d (P=۰/۰۰۱) a افزایش معنی دار نسبت به گروه دوکسوروپیسین + تمرین



نمودار شماره ۳- نتایج آزمون آنالیز واریانس یکراهه برای بررسی تغییرات نسبت Bax/BCL2 در بافت کلیه موش های صحرایی در گروه های تحقیق

a (P=0.001) افزایش معنی دار نسبت به گروه کنترل سالم، b (P=0.001) کاهش معنی دار نسبت به گروه دوکسوروویسین.

c (P=0.001) کاهش معنی دار نسبت به گروه دوکسوروویسین + کروزین، d (P=0.001) کاهش معنی دار نسبت به گروه دوکسوروویسین + تمرین

پروتئین کیتازها و پروتئین های رونویسی هسته ای، مانند مسیر AMPK/NRF2/SOD, Cat می شوند و از این مسیر با تعدیل نیتریک اکسید اندوتیالی در بافت عروق، رگزایی در بافت کلیه را افزایش می دهند. علاوه بر این تعدیل مسیر های زیر دست تنظیم یونی، مانند داستیلازها به فعالیت بیشتر سیروتونین ها منجر می شود و هر دو مسیر در نهایت به افزایش بیوژن میتوکندری و بیان پروتئین های ضد آپوپتوزی در نفرون ها می انجامد [۱۴]. همسو با مطالعه حاضر، محققان نشان داده اند که تمرینات ورزشی به کاهش متالوپروتئازها، تعدیل P53 و افزایش SIRT1 در بافت کلیه موش های صحرایی مبتلا به دیابت و در معرض H2S منجر می گردد [۱۴]. علاوه بر این محققان در مطالعه ای دیگر نشان دادند که هشت هفته، پنج جلسه در هفته و هر جلسه تمرین با ۸۰ درصد سرعت بیشینه موجب کاهش نسبت Bax/BCL2 و افزایش غیر معنی دار BCL2 در بافت قلب موش های صحرایی گردید [۱۵]. از این رو به نظر می رسد که تفاوت در شدت و فرکانس تمرین از عواملی هستند که احتمالاً در واکنش های اکسایشی تأثیر می گذارند و مهار Bax و افزایش BCL2 نیز به عامل استرس اکسیداتیو وابسته است. همچنین تمرین تناوبی شدید، موجب افزایش Bax, BCL2 و نسبت Bax/BCL2 در بافت قلب موش های صحرایی سالم ند گردید؛ در این پرتوتل، تمرین تناوبی نیز باشد بالا بود که موجب

بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تمرین هوایی موجب کاهش مقادیر Bax و نسبت Bax/BCL2 در بافت کلیه موش های صحرایی در معرض دوکسوروویسین گردید. اعتقاد بر این است که دوکسوروویسین به عنوان یک داروی ضدسرطان با حذف سلول های سرطانی به بهبود شرایط دو دوره شیمی درمانی منجر می گردد؛ اما همان گونه که بیان شد سلول های سالم از جمله سلول های سالم در بافت کلیه نیز از قاعده تخریب متعاقب DOX در امان نیستند. به عبارتی DOX با مکانیسم افزایش نفوذ پذیری غشاء، با نفوذ به بافت کلیه، به آسیب DNA منجر می گردد و پس از آن عمل آنلا توانایی سلول برای بیان آنزیم های آنتی اکسیدانی کاهش می یابد. علاوه بر این محققان معتقدند که افزایش رادیکال های آزاد، محرك کاسپازها می باشد و کاسپازها با تعامل با عوامل التهابی به تخریب غشاء دیواره میتوکندری منجر می شوند و سیتوکروم - C از غشاء میتوکندری به بیرون منتشر می کنند و در ادامه کاسپازها Bax و Bad را در بافت کلیه، فعال و BCL2 را مهار می نمایند [۱۳]. محققان در تأیید این یافته ها افزایش استرس اکسیداتیو، آپوپتوز و شاخص های آسیب کلیوی در سرم را متعاقب مصرف DOX در بافت کلیه موش های صحرایی گزارش کردند [۱]. اما اعتقاد بر این است که فعالیت های ورزشی با مکانیسم افزایش کاتکولامین ها، فعال سازی مسیر های

موجب مهار AIF-1، کاهش Bax و افزایش BCL2 می‌گردد [۴]. بهطوری که در مطالعات پیش نیز اثر همزمان تمرین و کروسین بر بهبود شاخص‌های متابولیکی، آنتروپومتریکی [۸]، ردوکس سلولی [۷] و بهبود نشانگرهای آپوپتوزی [۴] در مدل‌های حیوانی بررسی شده بود. اما این مطالعه نشان‌دهنده تأثیر این دو مداخله بر کلیه بود و نتایج آن می‌تواند در درمان بیماری‌های کلیوی مطلوب باشد. باتوجه به نقش استرس اکسیداتیو در پیشبرد آپوپتوز، عدم اندازه‌گیری شاخص‌های اکسیدان - آنتی‌اکسیدانی و همچنین مسیرهای بیان ژنی آن از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌باشد. از این‌رو پیشنهاد می‌شود در مطالعات آنی، متغیرهای اکسایشی نیز مورد ارزیابی قرار گیرد. همچنین نیاز به کسب اطمینان از تغییرات بافتی و عدم ارزیابی میزان آپوپتوز بهروش تالن یا تری کروم، از محدودیت‌های دیگر این مطالعه است. از این‌رو پیشنهاد می‌شود در مطالعات آنی، این روش سنجش آپوپتوز نیز مورد ارزیابی قرار گیرد. علاوه‌بر این باتوجه به استفاده از DOX با اهداف درمانی در بیماری سرطان، عدم ارزیابی تمرین و مکمل کروسین در شرایط ابتلا به بیماری سرطان طی دوره درمان با DOX از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌باشد. بنابراین پیشنهاد می‌گردد در مطالعات آنی، شرایط آپوپتوز در دوره درمان سرطان با DOX موردن بررسی قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

به‌نظر می‌رسد که تمرین و کروسین، هم به‌نهایی و هم به‌طور تعاملی اثرات مطلوبی بر مهار آپوپتوز در بافت کلیه موش‌های صحرایی در معرض دوکسوروبیسین دارند. اما تأثیر تمرین BCL2 وابسته به نوع و شدت تمرین و تأثیر کروسین بر Bax وابسته به دوز مصرفی می‌باشد. بنابراین پیشنهاد می‌گردد در شرایط آسیب کلیوی متعاقب قرارگرفتن در معرض دوکسوروبیسین از تعامل تمرین و کروسین استفاده شود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بهبهان و تمام افرادی که در اجرا و نگارش این مقاله، یاری‌رسان بودند، تقدیر و تشکر می‌شود.

References:

- [1] Afsar T, Razak S, Almajwal A, Al-Disi D. Doxorubicin-induced alterations in kidney functioning, oxidative stress, DNA damage, and renal tissue morphology; Improvement by Acacia hydaspica tannin-rich ethyl acetate fraction. *Saudi J Biol Sci* 2020; 27(9): 2251–60.

افزایش Bax شد [۱۶]. بنابراین در تأیید مطالعه حاضر، تمرین با شدت‌های متوسط رو به بالا در شرایط مواجهه با مواد سمی یا وجود شرایط اکسایشی زمینه‌ای می‌تواند سازگاری مناسبی برای مقابله با آپوپتوز ارائه دهد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که مصرف کروسین موجب کاهش Bax، نسبت Bax/BCL2 و افزایش BCL2 در بروتیکال‌های آزاد، آن‌ها را خشی کند. بررسی مطالعات نشان می‌دهد که Cr دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد و می‌تواند با پیوند با رادیکال‌های آزاد، آن‌ها را خشی کند. همچنین به‌نظر می‌رسد که مصرف Cr با فسفریله کردن پروتئین کیتازها AMPK/NRF2 می‌تواند به افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از مسیرهای بیان ژنی منجر شود. علاوه‌بر این زعفران و فرآورده‌های آن به‌دلیل دارای بودن ایزوفلوانهای در بدنش به عنوان یک آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی به‌شمار می‌رند [۱۷]. محققان در مطالعه‌ای دیگر نشان دادند که مصرف Cr علاوه‌بر بهبود متابولیسم چربی‌ها، کاهش وزن و کالری دریافتی [۸] به مهار عوامل آپوپتوزی، مانند BCL2 و افزایش Bax (AIF-1) می‌گردد [۱۸,۴]. در موسهای صحرایی دارای اختلالات متابولیکی می‌گردد [۱۸,۴]. محققان در مطالعه‌ای دیگر نشان دادند که مصرف ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم Cr نیز موجب کاهش مقادیر سیتوکروم C، افزایش BCL2 و کاهش Bax در بافت قلب عضله اسکلتی موش‌های صحرایی در معرض DDX می‌شود [۴]. بنابراین یافته‌های مطالعه حاضر نیز در تأیید مطالعات دیگر بود و دوباره اثرات ضد آپوپتوزی Cr را در بافت کلیه موش‌های صحرایی نشان داد. همچنین نتایج نشان داد که تمرین هوایی همراه با مصرف کروسین موجب افزایش مقادیر BCL2، کاهش Bax و نسبت Bax/BCL2 در بافت کلیه موش‌های صحرایی در معرض دوکسوروبیسین گردید. باتوجه به بررسی‌های به عمل آمده، مطالعات محدودی بر روی اثرات تعاملی Cr و AT بر مسیرهای آپوپتوزی در بافت کلیه انجام شده است؛ اما به‌نظر می‌رسد که تمرینات ورزشی از مسیر AMPK/NRF2/SOD آنتی‌اکسیدان‌ها، مهار کاسپازها، کاهش Bax و افزایش BCL2 در کلیه گردند [۱۴]. همچنین به‌نظر می‌رسد که Cr نیز با افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، هم در فاز آنزیمی و هم در مسیر آنزیمی و بیان ژنی می‌تواند به کاهش استرس اکسیداتیو منجر شود؛ علاوه‌بر این Cr

- [2] Ayla S, Seckin I, Tanriverdi G, Cengiz M, Eser M, Soner BC, et al. Doxorubicin induced nephrotoxicity: protective effect of nicotinamide. *Int J Cell Biol* 2011; 2011.

- [3] Alasmari AF, Ali N, Alharbi M, Alqahtani F, Alasmari F, Almoqbel D, et al. Geraniol Ameliorates

Doxorubicin-Mediated Kidney Injury through Alteration of Antioxidant Status, Inflammation, and Apoptosis: Potential Roles of NF- κ B and Nrf2/Ho-1. *Nutrients* 2022; 14(8): 1620.

[4] Eydivandi K, Azarbayjani MA, Farzanegi P. The Effect of High Intensity Interval Training (HIIT) and Crocin Consumption on Doxorubicin-Induced Apoptotic Indices in the Muscle Tissue of Rats. *Gene, Cell Tissue* 2020;7(4).

[5] Farzanegi P, Abbaszadeh H, Farokhi F, Rahmati-Ahmabad S, Hosseini SA, et al. Attenuated renal and hepatic cells apoptosis following swimming exercise supplemented with garlic extract in old rats. *Clin Interv Aging* 2020; 15: 1409.

[6] Momeni L, Moghadam HF, Hosseini SA, Nikbakht M. Interactive Effects of Endurance Training and Selenium Consumption on the Intrinsic Apoptosis Pathway in the Liver Tissue of Cadmium-Exposed Rats. *J Nutr Sci Diet* 2019; 1-10.

[7] Davari F, Alimanesh Z, Alimanesh Z, Salehi O, Hosseini SA. Effect of training and crocin supplementation on mitochondrial biogenesis and redox-sensitive transcription factors in liver tissue of type 2 diabetic rats. *Arch Physiol Biochem* 2020; 1-6.

[8] Hosseini SA, Norouzi S, Rafiee N, Farzanegi P, Salehi O, Farkhaie F. Interactive Effects of Endurance Training and Crocin on Aerobic Capacity, Dietary Intake and Weight of High-Fat Diet-Induced Type 2 Diabetic Rats. *J Nutr Sci Diet* 2018; 4(3): 65-74.

[9] El-Ashmawy NE, Khedr EG, Doghish AS, Elballal MS. Carnosine and crocin ameliorate oxidative stress in rats with rhabdomyolysis-induced acute kidney injury through upregulating HO-1 gene expression. *Food Biosci* 2022;101972.

[10] Keelo RMAH, Elbe H, Bicer Y, Yigitteurk G, Koca O, Karayakali M, et al. Treatment with crocin suppresses diabetic nephropathy progression via modulating TGF- β 1 and oxidative stress in an

experimental model of pinealectomized diabetic rats. *Chem Biol Interact* 2022; 351: 109733.

[11] Davoodi M, Bouri SZ, Ghahfarokhi SD. Antioxidant effects of aerobic training and crocin consumption on doxorubicin-induced testicular toxicity in rats. *J Fam Reprod Heal* 2021; 15(1): 28.

[12] 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): 323-35. [in Persian]

[13] Ruggiero A, Ferrara P, Attinà G, Rizzo D, Riccardi R. Renal toxicity and chemotherapy in children with cancer. *Br J Clin Pharmacol* 2017; 83(12): 2605-14.

[14] Yang L, Li D, Cao B, Liu S, Xu D, Zhu X, et al. Exercise training ameliorates early diabetic kidney injury by regulating the H2S/SIRT1/p53 pathway. *FASEB J* 2021;35(9):e21823.

[15] 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 Tissue* 2015; 2(4): 6-12.

[16] Yazdanparast Chaharmahali B, Azarbayjani MA, Peeri M, Farzanegi Arkhazloo P. Increased Expression of Bax and Bcl2 Apoptosis Biomarkers in the Heart of Old Female Rats After Interval Training and Curcumin Consumption. *Jorjani Biomed J* 2018; 6(4): 40-52.

[17] Ghazal A, Raheleh R, Majid RN. Effect of Crocin on Bax, Bcl2, and Oxidative Stress Indices in Testicular Tissue of Streptozotocin Diabetic Rats. *Ofogh-e-Danesh* 2019; 25: 340-51. [in Persian]

[18] Shadegan PA, Khajehlandi A, Mohammadi A. Effect of Aerobic Training and Crocin Consumption on Bax Gene Expression in the Hippocampal Tissue of Ovariectomized Rats. *Gene, Cell Tissue* 2020; 7(3): 4-9.