

Effect of Pretreatment of Aerobic Training on Doxorubicin-induced Left Ventricular Apoptosis Gene Expression in Aging Rat Model

Fateme Sharifi¹, Valiollah Dabidi Roshan^{2*}, Zohreh Mazaheri³

- 1- Ph.D. Candidate, Department of Sport Physiology, College of Physical Education and Sport Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran
- 2- Professor, Department of Sport Physiology, College of Physical Education and Sport Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran
- 3- Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Corresponding Address: Postal Code: 4741613534, Department of Sport Physiology, College of Physical Education and Sport Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran
Email: v.dabidi@umz.ac.ir, vdabidiroshan@yahoo.com

Received: 16/May/2016, Accepted: 12/Dec/2016

Abstract

Objective: Aging can affect adaption of the heart tissue's apoptotic system to aerobic exercise and induction of doxorubicin. Therefore, this study aims to evaluate the effect of pretreatment of aerobic training on doxorubicin-induced left ventricular apoptosis gene expression in a model of aging rats.

Methods: We randomly assigned 42 adult Wistar male rats to 6 groups (n=7 per group): control of young, control of aging, aging + saline, aging + doxorubicin, aging + aerobic exercise + saline, and aging + aerobic exercise + doxorubicin. Aging was induced by an intraperitoneal (i.p.) injection of D- galactose (100 mg/kg). The training protocol included treadmill running with a gradual increase from 25 min/day to 54 min/day at a velocity of 15 m/min to 20 m/min, 5 days/week for 6 weeks. During the two ultimate training weeks, the animals underwent a 15-day i.p. doxorubicin regimen that consisted of 1 mg/kg of doxorubicin per day. The rats were sacrificed 48 hours after the last training and injection session. A portion of the left ventricle was analyzed by real-time PCR for *Bax* and *Bcl-2* gene expressions.

Results: ANOVA indicated that doxorubicin injection induced a significant increase in expression of *Bax* and *Bax/Bcl-2* ratio and an insignificant decrease in *Bcl-2* gene expression. On the other hand, aerobic training before and during the induction of doxorubicin prevented an increase in the *Bax/Bcl-2* ratio and the doxorubicin-induced decrease in *Bcl-2* gene expression.

Conclusion: Due to the significant decrease in *Bax/Bcl-2* ratio in the hearts of the trained rats that underwent doxorubicin treatment, we conclude that aerobic exercise training prior to and during treatment with doxorubicin as a non-pharmacological strategy, probably protects cardiomyocytes from doxorubicin-induced apoptosis.

Keywords: Doxorubicin, Cardiotoxicity, Pre-treatment, Aerobic exercise, Heart apoptosis

Pathobiology Research, Vol. 19 (2016-2017), No.2, Pages: 29-43

اثر پیش درمان تمرین هوازی بر بیان ژن مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده بطن چپ متعاقب القای دوکسوروبیسین در موش‌های صحرایی مدل سالمندی

فاطمه شریفی^۱، ولی‌ا... دیدی روشن^{۲*}، زهره مظاهری^۳

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

۲- استاد، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

۳- استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، بابلسر، کدپستی: ۴۷۴۱۶۱۳۵۳۴، دانشگاه مازندران، دانشکده تربیت بدنی، گروه فیزیولوژی ورزشی

Email: v.dabidi@umz.ac.ir, vdabidiroshan@yahoo.com

پذیرش مقاله: ۹۵/۰۹/۲۲

دریافت مقاله: ۹۵/۰۲/۲۷

چکیده

هدف: سالمندی می‌تواند سازگاری سیستم مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده بافت قلب به تمرین هوازی و القای دوکسوروبیسین را تحت تاثیر قرار دهد. بنابراین هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی اثر پیش درمان تمرین هوازی بر بیان ژن مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده بطن چپ متعاقب القای دوکسوروبیسین در موش‌های صحرایی مدل سالمندی بود.

مواد و روش‌ها: ۴۲ سر موش صحرایی بالغ نر نژاد ویستار، به‌طور تصادفی در ۶ گروه ۷ تایی: کنترل جوان، کنترل سالمند، سالمند + دوکسوروبیسین، سالمند + سالین، سالمند تمرین هوازی + سالین و سالمند تمرین هوازی + دوکسوروبیسین قرار گرفتند. سالمندسازی به‌وسیله تزریق درون صفاقی محلول دی‌گالاکتوز (۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) ایجاد شد. دستورالعمل تمرین استقامتی شامل شش هفته دویدن روی نوارگردان به‌صورت پیشرونده به مدت ۲۵-۵۴ دقیقه در روز با سرعت ۱۵-۲۰ متر در دقیقه، پنج جلسه در هفته بود. ۲ هفته آخر تمرین، هر روز تزریق درون صفاقی دوکسوروبیسین یا محلول سالین ۰/۹ درصد، با یک دوز تجمعی (۱ میلی‌گرم/کیلوگرم) اجرا شد. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و تزریق، رت‌ها قربانی و قسمتی از بطن چپ قلب، برای ارزیابی بیان ژن‌های *Bax* و *Bcl-2* به روش Real time-PCR جدا شد.

نتایج: آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد تزریق دوکسوروبیسین موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن *Bax* و نسبت *Bax/Bcl-2* و کاهش جزئی بیان ژن *Bcl-2* می‌شود. از طرفی انجام تمرین هوازی قبل و طی القای دوکسوروبیسین از افزایش نسبت *Bax/Bcl-2* و کاهش بیان ژن *Bcl-2* ناشی از تزریق دوکسوروبیسین پیشگیری کرد.

نتیجه‌گیری: با توجه به کاهش معنی‌دار در نسبت *Bax/Bcl-2* در قلب موش‌های گروه تمرین کرده درمان شده با دوکسوروبیسین می‌توان نتیجه گرفت که تمرین ورزشی هوازی قبل و طی درمان دوکسوروبیسین احتمالاً می‌تواند به‌عنوان راهبرد غیر دارویی، موجب محافظت سلول‌های قلب از مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده ناشی از القای دوکسوروبیسین شود.

کلیدواژگان: دوکسوروبیسین، سمیت قلبی، پیش درمان، تمرین هوازی، مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده قلب

پژوهش‌های آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۹، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۵، صفحات: ۳۰-۳۳

مقدمه

دوکسوروبیسین (Doxorubicin: Dox) به‌عنوان یک عامل ضد سرطان قوی به رسمیت شناخته شده‌است، اما اثر سمیت قلبی آن دلیل اصلی برای محدود کردن است از آن محسوب می‌شود [۱-۵]. مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده

عملکرد ناشی از Dox به‌وسیله افزایش فعالیت و بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو [۳، ۱۸، ۲۳، ۲۴]، کاهش پروکسیداسیون لیپیدی [۳، ۱۸، ۲۵]، تنظیم مثبت پروتئین شوک گرمایی (Heat shock protein 72: HSP72) [۲۶]، حفظ توزیع ایزوفرم زنجیره سنگین میوزین (Myosin Heavy Chain: MHC) [۲۷، ۲۸] یا تنظیم منفی آنزیم‌های مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده شود [۲۲، ۲۵، ۲۹]. آسانسائو (Ascensão) و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعه‌ای نشان دادند که Dox باعث اختلال عملکرد تنفس میتوکندریایی، آسیب اکسیداتیو و ضایعات هیستوپاتولوژیک و راه انداختن مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده می‌شود. با این وجود تمرین استقامتی افزایش ناشی از Dox را در پروتئین کربونیل، مالون دی آلدئید، Bax، نسبت Bax/Bcl-2 و فعالیت کاسپاز ۳ (Caspase 3) را مهار می‌کند [۳]. با این حال، اکثر مطالعات آثار حفاظتی برنامه‌های تمرین‌های بلند مدت [۳، ۱۷] یا تمرین‌های حاد [۱۶، ۳۰] را در درمان سمیت قلبی ناشی از Dox گزارش داده‌اند؛ اما اثر پیش درمان تمرین هوازی میان مدت قبل از القای Dox کمتر مورد توجه محققان قرار گرفته است. همچنین اکثر مطالعاتی که تاکنون به مطالعه اثر القای Dox پرداخته‌اند، از موش‌های جوان به‌عنوان آزمودنی استفاده کرده‌اند [۳، ۱۹، ۲۹، ۳۱]. در تحقیقات گذشته، این حقیقت که سازگاری سیستم مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده بافت قلب به ورزش و القای Dox می‌تواند تحت تأثیر روند سالمندی قرار گیرد، مورد توجه قرار نگرفته است و این موضوع، دیدگاه تازه‌ای است که در پژوهش حاضر مورد بررسی قرار گرفت. بنابراین هدف مطالعه حاضر بررسی اثر پیش درمان تمرین هوازی بر بیان ژن‌های مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده بطن چپ قلب متعاقب القای مزمن Dox در موش‌های صحرایی مدل سالمندی بود.

مواد و روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی

در پژوهش حاضر ۴۲ سر موش صحرایی بالغ نر ۱۲

(Apoptosis) ناشی از القای Dox مکانیسم رایج در سلول‌های سرطانی است و تصور بر این است که مسمومیت در سلول‌های سالم ممکن است از طریق این اثر رخ دهد، اگرچه ممکن است از طریق مسیرهای دیگر نیز به‌وجود بیاید [۶]. نشان داده شده‌است که Dox با تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن موجب آسیب به غشای میتوکندری، آزاد شدن سیتوکروم C و در نتیجه القای مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در کاردیومیوسیت‌ها (Cardiomyocytes) می‌شود [۷-۹]. اخیراً مطالعه‌ای نشان داد که Dox موجب انهدام تقریباً کامل سلول‌های پیش‌ساز قلب شد در حالی که تزریق داخل میوکاردی پیش‌سازهای قلبی یکسان از لحاظ ژنتیکی، قلب را از مسمومیت ناشی از Dox نجات داد [۱۰]. از طرفی؛ قلب سالمند نسبت به قلب جوان، به مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده حساس‌تر است همچنین تمرین ورزشی تکراری عملکرد ضد مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در قلب سالمند اعمال می‌کند [۱۱]. برخی از مطالعات نشان داده‌است که Dox می‌تواند موجب سالخوردگی نا به‌هنگام در کاردیومیوسیت‌ها [۱۲] و سلول‌های پیش‌ساز قلبی شود [۱۳]. بنابراین کاهش تعداد سلول کاردیومیوسیت، انحطاط میوفیبریلی و جلوگیری از رشد کاردیومیوسیت در ترکیب با هم در ایجاد مسمومیت قلبی ناشی از Dox نقش دارند. پس با توجه به این مطالب، مداخلات موفق باید چند عاملی با هدف حفظ هر دو تعداد و رشد سلول کاردیومیوسیت در مقابل از بین رفتن ناشی از Dox باشند [۱۴].

در میان استراتژی‌های پیشنهادی در مقابله مؤثر با عوارض جانبی مرتبط با درمان Dox، ورزش به‌عنوان یک ابزار غیر دارویی چند عاملی در برابر صدمه قلبی توصیه شده‌است که در برخی از مطالعات به‌کار رفته‌است [۱، ۳، ۱۵-۲۰]. پیش درمان ورزشی اجرا شده قبل از شروع درمان Dox، عملکرد قلب را حفظ می‌کند و نشانه‌های ظاهری آسیب عضله قلب را کاهش می‌دهد [۲۱]. علاوه بر این؛ نشان داده شده است که تمرین ورزشی پیشین، تعداد و اندازه کاردیومیوسیت را افزایش می‌دهد [یعنی هایپرتروفی فیزیولوژیک (Physiologic hypertrophy)] [۲۲]. همچنین ورزش ممکن است موجب محافظت بافت قلبی از اختلال

هفته‌ای، از نژاد ویستار با میانگین وزنی ۲۶۰ گرم از مرکز انستیتو پاستور خریداری و به آزمایشگاه منتقل شدند. کلیه موش‌ها در شرایط کنترل شده محیطی با میانگین دمای 22 ± 3 درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۴۵ تا ۵۵ درصد، چرخه روشنایی-تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت، به صورت گروه‌های ۴ سر موش در قفس‌های پلی‌کربنات شفاف و با دسترسی آزاد به آب نگهداری شدند. طی دوره پژوهش غذای ساخت شرکت بهرپور (ایران) به صورت پلت و با توجه به وزن کشتی هفتگی به میزان ۱۰ گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن در اختیار حیوان قرار داده می‌شد [۳۱]. در پژوهش حاضر، کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات بر طبق رهنمودهای انجمن فیزیولوژی آمریکا رعایت شد.

نحوه ایجاد مدل سالمندی

پس از یک هفته آشناسازی و سازگاری حیوانات با محیط جدید با توجه به هدف پژوهش، مدل‌سازی سالمندی به طور تصادفی روی ۳۵ سر از آن‌ها انجام گرفت و ۷ سر دیگر نیز بدون ایجاد سالمندی [کنترل جوان (Y)] باقی ماندند. برای ایجاد مدل سالمندی، از دی گالاکتوز (Sigma، آمریکا) محلول در نرمال سالین ۰/۹ درصد استفاده شد. در گروه‌های سالمند، روزانه ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن محلول دی گالاکتوز به صورت درون صفاقی و به مدت ۹ هفته تزریق شد [۳۲-۳۴]. رت‌ها پس از شروع مدل‌سازی سالمندی، از هفته چهارم به بعد به طور تصادفی دره گروه ۷ تایی: کنترل سالمند (A)، سالمند + دوکسوروبیسین (AD)، سالمند + سالین (AS) و سالمند تمرین هوازی + دوکسوروبیسین (AExD)، سالمند تمرین هوازی + سالین (AExS) قرار گرفتند.

برنامه تمرین ورزشی تحقیق

قبل از اجرای برنامه تمرین هوازی، به منظور آشنایی آزمودنی‌ها با نحوه انجام برنامه، برنامه تمرینی سبک شامل ۵ جلسه راه رفتن و دویدن روی نوارگردان، با سرعت ۵ تا ۸ متر

در دقیقه در شیب صفر درصد و به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد (هفته چهارم). سپس از هفته پنجم، برنامه تمرینی اصلی تحقیق شامل دویدن روی نوارگردان بدون شیب ویژه جوندگان با مدت فزاینده و با رعایت اصل اضافه بار از ۲۵ دقیقه به ۵۴ دقیقه و تغییر سرعت تمرین از ۱۵ به ۲۰ متر در دقیقه انجام شد. این برنامه به مدت ۶ هفته، ۵ جلسه در هفته اجرا شد. برای گرم کردن نیز آزمودنی‌ها در ابتدای هر جلسه تمرینی به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۷ متر در دقیقه دویده و سپس برای رسیدن به سرعت مورد نظر در هر دقیقه، ۲ متر در دقیقه به سرعت نوارگردان افزوده شد. برای سرد کردن بدن در انتهای هر جلسه تمرینی نیز سرعت نوارگردان به طور معکوس کاهش یافت تا به سرعت اولیه برسد [۱۹].

نحوه تهیه و تزریق داروی Dox

از هفته نهم، به آزمودنی‌های تحقیق به مدت ۲ هفته و همزمان با مدل‌سازی سالمندی و برنامه تمرینات ورزشی، داروی Dox هیدروکلراید (Pfizer، استرالیا) با یک دوز تجمعی ۱ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن (۱۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) هر روز به صورت زیرصفاقی تزریق شد. همچنین با در نظر گرفتن آثار استرس احتمالی ناشی از تزریق در گروه‌های دریافت کننده دارو و به منظور یکسان‌سازی شرایط همه آزمودنی‌ها به گروه‌های دیگر نیز ۱ واحد انسولینی سالین (سدیم کلراید ۰/۹ درصد) به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدنشان به صورت زیر صفاقی تزریق شد [۳۵].

برداشت بافت

آزمودنی‌های تمام گروه‌های تحقیق در شرایط استراحت (۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی یا ۴۸ ساعت پس از آخرین تزریق Dox یا سالین) با کتامین (Ketamine) (۳۰-۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (xylazine) (۳-۵ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن) بیهوش [۱۹] شدند. سپس قلب

اثر تمرین هوازی بر مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده بطن چپ متعاقب القای دوکسوروبیسین

حذف DNA ژنومی به مدت ۲ دقیقه در gDNA Wipout buffer در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از این مرحله نمونه‌های RNA برای ساخت cDNA آماده شدند. واکنش کلی در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و سپس یک مرحله انکوباسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد. به دنبال سنتز cDNA واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Polymerase Chain Reaction: PCR) صورت گرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Real time-PCR)

برای اندازه‌گیری سطوح بیان ژن‌های مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده Bax و Bcl-2 بافت قلبی از روش کمی PCR با استفاده از Primix syber green II انجام شد (Applied Biosystems Step One، آمریکا). مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر (شامل ۱ میکرولیتر cDNA، ۱ میکرولیتر آغازگر پیشرو (Forward primer)، ۱ میکرولیتر آغازگر برگشتی (Reverse)، ۷ میکرولیتر آب فاقد DNA و RNA (آب Depc) و ۱۰ میکرولیتر syber green) و هر واکنش به صورت دوبار تکرار صورت پذیرفت. طراحی آغازگرها بر اساس اطلاعات در بانک ژنی NCBI و توسط شرکت پیش گام (ایران) انجام شد. توالی آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ گزارش شده است، ضمن این‌که از GAPDH به عنوان ژن مرجع استفاده شد. برنامه دمایی مورد استفاده در PCR شامل: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه - ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه (تکرار ۴۰ چرخه) بود. نمودار ذوب (Melt) برای بررسی درستی داده‌ها و نمودار استاندارد به منظور بهینه‌سازی شرایط آزمایش رسم شد و بیان داده‌ها توسط نسبت بیان ژن‌های مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده Bax و Bcl-2 به ژن مرجع محاسبه شد (شکل ۱). میزان بیان ژن‌های مورد نظر نیز با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ اندازه‌گیری شد.

حیوان از ناحیه ریشه آئورت جدا و بلافاصله پس از شستشو توسط آب دیونیزه، قسمتی از بطن چپ برای بررسی بیان ژن‌های مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده Bax و Bcl-2 جدا و بلافاصله در مایع نیتروژن قرار داده شد و سپس در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد فریز شد.

اندازه‌گیری بیان ژن‌های مرگ سلولی

برنامه‌ریزی شده Bax و Bcl-2 قلبی

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA به وسیله QIAzol® Lysis Reagent (Qiagen، آلمان) و کلروفرم (Qiagen، آلمان) به روش دستی و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. بدین صورت که حدود ۵۰ میلی گرم بافت بطن چپ قلب به صورت جداگانه، برای استخراج RNA کل (total RNA) به نسبت ۱ به ۱۰ در QIAzol® Lysis Reagent به روش هاون کوبی یکنواخت شد و به منظور برداشتن اجزای پروتئینی، محصول حاصل در ۴ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ دقیقه و ۱۲۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. سپس به نسبت ۱ به ۰/۵ با کلروفرم مخلوط و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. محصول در ۴ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ دقیقه و ۱۲۰۰۰ دور سانتریفوژ و بخش معدنی و آبی از هم جدا شد. بخش محتوی RNA برداشته شد و با نسبت ۱ به ۰/۵ با ایزوپروپانول مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق رها و سپس در ۴ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ دقیقه و ۱۲۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. پلاک حاوی RNA در اتانول شستشو و در ۲۰ میکرولیتر آب فاقد RNase حل شد. غلظت RNA مورد سنجش واقع شد (Eppendorf، آلمان) و نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ به عنوان تخلیص مطلوب تعریف شد. سنتز cDNA با استفاده از QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen، آلمان) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. به طور خلاصه ابتدا نمونه‌های RNA به منظور

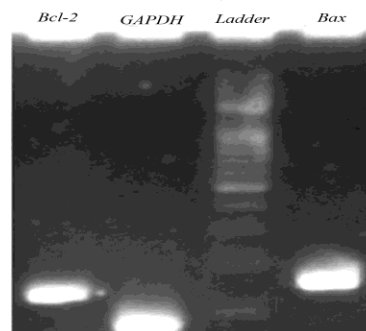
جدول ۱ توالی آغازگرهای استفاده شده برای بررسی بیان ژن با روش Real time PCR

نام ژن	کد ژن	توالی آغازگر	دمای ذوب (درجه سانتی گراد)	طول محصول (جفت باز)
Bax	NM_017059.2	5'-GCAAACTGGT GCTCAAGG-3' 5'-CAGCCACAAAGATGGTCA-3'	۸۴/۲۶	۱۸۳
Bcl-2	NM_016993.1	5'-TCTTTGAGTTCGGTGGGGTTC-3' 5'-GTTCCACAAAGGCATCCAG-3'	۸۸/۵۸	۱۵۳
GAPDH	NM_017008.4	5'-GACATGCGGCTTGGAGAAAC-3' 5'-AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3'	۷۹/۹۳	۹۲

انجام شد.

نتایج

میزان بقا، ۴۸ ساعت بعد از آخرین تزریق Dox در همه گروه‌ها (کنترل جوان، کنترل سالمند، سالمند سالی، سالمند Dox، سالمند تمرین هوازی + Dox و تمرین هوازی + Dox) در جدول ۲ و روند وزن‌گیری در شکل ۱ نشان داده شده است. در شروع، تفاوت قابل توجهی در میانگین وزن بدن میان گروه‌ها وجود نداشت. Dox موجب کاهش معنی‌دار وزن بدن در هر دو گروه سالمند Dox و سالمند تمرین هوازی + Dox طی دوره درمان ۲ هفته‌ای شد ($P \leq 0.05$). همچنین القای مزمن Dox منجر به کاهش معنی‌دار وزن قلب نسبت به گروه‌های AS، Y و AExS شد. از طرفی ۶ هفته تمرین دویدن هوازی موجب کاهش روند وزن‌گیری (شکل ۱) نسبت به سایر گروه‌های بی‌تمرین شد ولی به لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). همچنین ۶ هفته تمرین دویدن هوازی موجب افزایش وزن قلب نسبت به سایر گروه‌ها شد ولی این افزایش فقط نسبت به گروه AD و AExD معنی‌دار بود ($P \leq 0.05$).



شکل ۱ بررسی درستی آغازگرهای استفاده شده برای انجام Real time PCR روی ژل آگارز؛ طول قطعات پس از انجام ۴۰ مرحله تکثیر در دستگاه PCR متناسب با قطعه استاندارد (Ladder) با اندازه قطعات ۱۰۰ جفت باز نشان‌دهنده درستی عملکرد آغازگر است.

تجزیه و تحلیل آماری

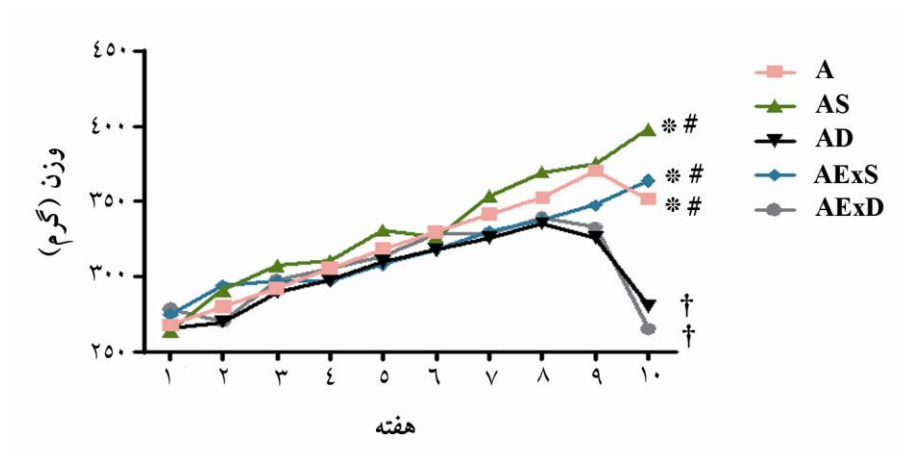
برای تجزیه و تحلیل یافته‌های پژوهش از آنالیز واریانس یک طرفه (one way analysis of variance: ANOVA)، برای مقایسه بین گروه‌های مختلف از آزمون تعقیبی توکی (Tukey test) و برای بررسی روند وزن‌گیری از آنالیز واریانس دو طرفه استفاده شد. کلیه محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ و در سطح معنی‌داری $P \leq 0.05$

جدول ۲ میانگین وزن رت‌ها در ابتدا و انتهای پژوهش، میانگین وزن قلب و وزن قلب به وزن بدن در گروه‌ها

گروه	میانگین وزن ابتدای انحراف معیار (گرم)	میانگین وزن انتهای انحراف معیار (گرم)	میانگین وزن قلب انحراف معیار (گرم)	میانگین وزن قلب/وزن بدن انحراف معیار
Y (N=7)	۲۵۶/۹±۵۴/۵	۳۴۷/۱±۴۴/۰*	۱/۳۸۹±۰/۲۴*	۰/۰۰۳۷±۰/۰۰۰۴
A (N=7)	۲۵۶/۴±۵۰/۵	۳۴۷/۱±۴۱/۰*	۱/۳۱۱±۰/۱۹*	۰/۰۰۳۷±۰/۰۰۰۵
AS (N=7)	۲۶۲/۳±۴۳/۹	۳۵۹/۹±۶۲/۶*	۱/۴۰۳±۰/۱۷*	۰/۰۰۳۵±۰/۰۰۰۲
AD (N=7)	۲۶۵/۷±۴۳/۶	۳۲۶/۱±۴۲/۴†	۱/۰۷۳±۰/۱۱†	۰/۰۰۳۹±۰/۰۰۰۵
AExS (N=7)	۲۷۲/۸±۲۷/۷	۳۵۷/۹±۳۹/۲*	۱/۴۲۳±۰/۲۱*	۰/۰۰۳۹±۰/۰۰۰۴
AExD (N=7)	۲۶۷/۲±۲۷/۶	۳۳۶/۹±۲۵/۷†	۰/۹۸۶±۰/۱۲†	۰/۰۰۳۷±۰/۰۰۰۴

* اختلاف معنی‌دار با گروه AD، # اختلاف معنی‌دار با گروه AExD، † اختلاف معنی‌دار با گروه AExS ($P < 0.05$).

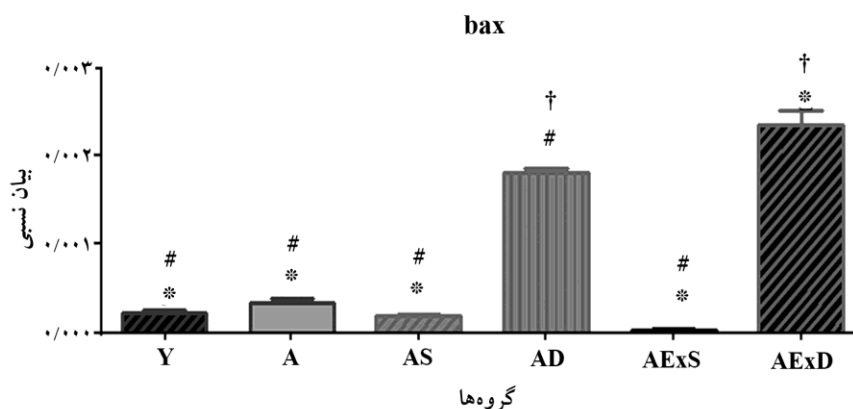
اثر تمرین هوازی بر مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده بطن چپ متعاقب القای دوکسوروبیسین



شکل ۱ روند وزن‌گیری گروه‌ها از ابتدا تا انتهای پژوهش؛ Y (N=7)، A (N=7)، AS (N=7)، AD (N=7)، AExS (N=7)، AExD (N=7)؛ * اختلاف معنی‌دار با گروه AD، # اختلاف معنی‌دار با گروه AExD، † اختلاف معنی‌دار با گروه AExS ($P < 0.05$)

تمرین هوازی منجر به کاهش میزان بیان ژن Bax در گروه سالمند تمرین هوازی + سالین (AExS) در مقایسه با سایر گروه‌ها شد ولی این کاهش فقط نسبت به گروه‌های AD و AExD معنی‌دار بود ($P \leq 0.05$). از طرفی ۶ هفته تمرین هوازی به همراه تزریق Dox موجب افزایش معنی‌دار میزان بیان ژن Bax در مقایسه با سایر گروه‌ها (A، AS، AD و AExS) ($P \leq 0.05$) شد (شکل ۲).

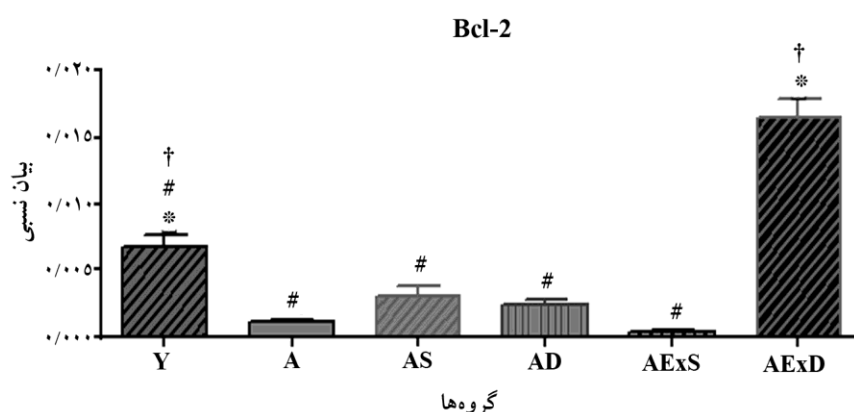
شکل ۲ میانگین میزان بیان ژن Bax بافت قلب را در گروه‌های مختلف پژوهش نشان می‌دهد. در گروه سالمند میزان بیان ژن Bax در مقایسه با گروه جوان بیشتر بود ولی این افزایش معنی‌دار نبود. تزریق Dox در گروه سالمند Dox (AD) موجب افزایش معنی‌دار میزان بیان ژن Bax در مقایسه با گروه‌های Y، A، AS و AExS شد ولی نسبت به گروه AExD کاهش معنی‌دار داشت ($P \leq 0.05$). همچنین ۶ هفته



شکل ۲ میانگین بیان ژن Bax بطن چپ قلب گروه‌های مختلف مورد آزمون در پایان آزمایش با روش Real time PCR؛ * اختلاف معنی‌دار با گروه AD، # اختلاف معنی‌دار با گروه AExD، † اختلاف معنی‌دار با گروه AExS ($P < 0.05$)

مقایسه با گروه Y و AExD شد ($P \leq 0/05$). همچنین ۶ هفته تمرین هوازی همراه تزریق Dox موجب افزایش معنی داری بیان ژن Bcl-2 در گروه AExD نسبت به سایر گروه‌ها (Y، A، AS، AD و AExS) ($P \leq 0/05$) شد (شکل ۳).

شکل ۳ میانگین میزان بیان ژن Bcl-2 بافت قلب را در گروه‌های مختلف پژوهش نشان می‌دهد. در گروه سالمند میزان بیان ژن Bcl-2 در مقایسه با گروه جوان به‌طور معنی داری پایین‌تر بود. تزریق Dox در گروه سالمند Dox (AD) موجب کاهش معنی داری میزان بیان ژن Bcl-2



شکل ۳ میانگین بیان ژن Bcl-2 بطن چپ قلب گروه‌های مختلف مورد آزمون در پایان آزمایش با روش Real time PCR. * اختلاف معنی دار با گروه AD، # اختلاف معنی دار با گروه AExS ($P < 0/05$)، † اختلاف معنی دار با گروه AExD.

موجب افزایش معنی دار نسبت Bax/Bcl-2 در مقایسه با گروه‌های Y، AS، AExS و AExD شد ($P \leq 0/05$). از طرفی ۶ هفته تمرین هوازی منجر به کاهش نسبت Bcl-2/Bax در مقایسه با گروه‌های A، AS، AD و AExD شد ولی این کاهش فقط نسبت به گروه AD معنی دار بود ($P \leq 0/05$). همچنین ۶ هفته تمرین هوازی به همراه تزریق Dox موجب کاهش معنی دار نسبت Bax/Bcl-2 در مقایسه با گروه AD شد ($P \leq 0/05$).

جدول ۳ نسبت بیان ژن Bax به Bcl-2 در گروه‌های مختلف میانگین $\pm$ انحراف معیار

گروه	نسبت Bax/Bcl-2
Y (N=7)	$0/0431 \pm 0/054$ *
A (N=7)	$0/0856 \pm 0/018$ *
AS (N=7)	$0/2277 \pm 0/31$ *
AD (N=7)	$0/7680 \pm 0/29$ #†
AExS (N=7)	$0/09515 \pm 0/04$ *
AExD (N=7)	$0/1568 \pm 0/06$ *

* اختلاف معنی دار با گروه AD، # اختلاف معنی دار با گروه AExD، † اختلاف معنی دار با گروه AExS ($P < 0/05$).

بحث

نتایج این مطالعه برای اولین بار نشان داد که تمرین هوازی قبل و طی درمان با Dox تا حدی از مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده قلب ناشی از القای Dox در موش‌های صحرایی نر مدل سالمندی پیشگیری می‌کند. به علاوه نتایج این مطالعه نشان داد

جدول ۳ مقادیر نسبت بیان ژن Bax/Bcl-2 قلب را در گروه‌های مختلف پژوهش حاضر نشان می‌دهد. در گروه سالمند نسبت بیان ژن Bax/Bcl-2 در مقایسه با گروه جوان به‌طور معنی داری بالاتر بود ($P \leq 0/05$). القای مزمن Dox

که تمرین هوازی تا حدودی موجب کاهش فرآیند مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده ناشی از سالمندی می‌شود.

گزارش‌ها نشان دهنده آن است که درمان به‌وسیله Dox اغلب به بافت‌های غیر هدف آسیب می‌رساند و از آثار سمی Dox بر قلب، به‌عنوان مهم‌ترین عوارض جانبی این دارو نام برده می‌شود [۳۱]. اخیراً نشان داده شده است که Dox موجب مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در قلب موش می‌شود و این پدیده حداقل در بخشی به مسیرهای با واسطه میتوکندری نسبت داده شده است [۳]. در واقع عوارض جانبی منفی Dox غیرقابل برگشت هستند، بنابراین دانستن تغییرات بیان ژن که در قلب پس از اجرای Dox رخ می‌دهد، می‌تواند دانش مورد نیاز برای توسعه اقدامات متقابل درمانی را فراهم نماید [۲۷]. پژوهش حاضر نشان داد القای مزمن Dox موجب کاهش وزن طی دو هفته درمان نسبت به قبل از آن در گروه‌های دریافت کننده Dox شد. این یافته با پژوهش چیکو (Chicco) و همکاران (۲۰۰۶) هم‌سو بود، آن‌ها نشان دادند درمان Dox منجر به از دست دادن قابل توجهی از وزن بدن به دنبال درمان Dox در موش‌ها شد [۱۸]. کاهش وزن‌گیری به دنبال درمان Dox احتمالاً می‌تواند به کاهش مصرف مواد غذایی بعد از درمان و مهار ستر پروتئین در اثر داروی ضد سرطان نسبت داده شود. معمولاً تزریق دوکسوروبیسین موجب تأخیر افزایش وزن می‌شود که می‌تواند به دلیل سمیت سیستمیک آن باشد [۳۶]. همچنین القای مزمن Dox منجر به کاهش معنی‌دار وزن قلب در گروه‌های دریافت کننده Dox شد که هم‌سو با پژوهش چیکو و همکاران (۲۰۰۶) است، هر چند آن‌ها اثر قابل توجه ناشی از درمان Dox در میزان وزن قلب به وزن بدن را نیز مشاهده کردند که شاید به علت اختلاف دوز تزریقی با پژوهش حاضر باشد [۱۸].

نتیجه دیگر پژوهش حاضر، نشان دهنده این است که حیوانات تمرین کرده وزن‌گیری کمتری نسبت به حیوانات گروه‌های بی‌تمرین داشتند که البته معنی‌دار نبود و با توجه به افزایش کالری مصرفی متعاقب فعالیت بدنی گروه‌های تمرین،

این امر بدیهی به نظر می‌رسد. این یافته هم‌سو با پژوهش‌های جعفری و همکاران (۲۰۱۵) و چیکو و همکاران (۲۰۰۶) بود که نشان دادند ۱۲ هفته تمرین ورزشی موجب کاهش وزن‌گیری موش‌های تمرین کرده در مقایسه با موش‌های بدون تمرین می‌شود [۱۸]. به‌علاوه این موضوع را می‌توان با توجه به این مطلب توجیه کرد که موش‌های نر فعالیت بدنی افزایش یافته را با بالا بردن دریافت کالری جبران نمی‌کنند، در نتیجه در یک میانگین پایین‌تر افزایش وزن در طول زمان در مقایسه با حیوانات هم‌سن بی‌تمرین قرار دارند [۲۴]. از طرفی ۶ هفته تمرین دوییدن هوازی موجب افزایش وزن قلب نسبت به سایر گروه‌ها شد ولی این افزایش فقط نسبت گروه AD و AExD معنی‌دار بود ($P \leq 0.05$). این یافته هم‌سو با پژوهش کووک (Kwak) و همکاران (۲۰۰۶) است که نشان دادند تمرین ورزشی محافظت معنی‌دار در مقابل کاهش میوسیت‌های قلبی، کاهش تعداد هسته‌های تارهای قلب، هایپرتروفی واکتشی میوسیت‌های باقی مانده و افزایش بافت رابط در بطن چپ قلب موش سالمند را فراهم می‌کند [۳۷]. همچنین با پژوهش جعفری و همکاران (۲۰۱۵) هم‌سو بود، آن‌ها نشان دادند که تمرین ورزشی هایپرتروفی قلب شامل وزن قلب و وزن قلب/وزن بدن را افزایش می‌دهد [۳۸]. مطالعات نشان داده‌اند که تمرین هوازی منجر به هایپرتروفی قابل توجه قلب می‌شود که به‌وسیله سنگینی و بزرگتر بودن نسبی و مطلق قلب در حیوانات تمرین کرده نسبت به حیوانات بی‌تمرین نمایان می‌شود. علاوه بر این تمرین هوازی هایپرتروفی فیزیولوژیک قلب را از طریق افزایش عامل رشد انسولین (Insulin Growth Factor 1: IGF1) و پروتئین کیناز B (Akt) تحریک می‌کند [۳۹]. این مطلب با اطلاعات گزارش شده چیکو و همکاران (۲۰۰۶) از موش‌های تمرین کرده به مدت ۱۲ هفته نیز هم‌سو است [۲۴].

در مطالعه حاضر Dox باعث افزایش بیان ژن پیش برنده مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده Bax و تا حدودی موجب کاهش بیان ژن ضد مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده Bcl-2 و افزایش

نسبت Bax/Bcl-2 در گروه AD نسبت به گروه سالین شد. این یافته هم‌سو با پژوهش‌های آسانسائو و همکاران (۲۰۰۵) و کاوازیس (Kavazis) و همکاران (۲۰۱۰) است که نشان دادند Dox باعث اختلال عملکرد تنفس میتوکندریایی، آسیب اکسیداتیو و ضایعات هیستوپاتولوژیک و راه انداختن مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده می‌شود [۲۷، ۳]. همچنین مطالعات قبلی روی کشت کاردیومیوسیت‌ها نیز نشان داد که Dox موجب افزایش بیان ژن Bax و از طرفی موجب کاهش بیان ژن Bcl-2 و در نهایت موجب القای مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در کاردیومیوسیت‌ها شده است [۴۰، ۴۱]. از طرفی این یافته با پژوهش چایلدز (Childs) و همکاران (۲۰۰۲) ناهم‌سو است که نشان دادند ۴ روز پس از تزریق یک دوز Dox چندین پاسخ تطبیقی از جمله افزایش نسبت Bax/Bcl-2 رخ می‌دهد [۴۲]. پروتئین‌های خانواده Bcl-2 یکپارچگی غشای خارجی میتوکندری را حفظ می‌کند و از اعضا ضد مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده و پیش برنده مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده تشکیل شده است [۴۲]. گروه ضد مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده شامل Bcl-XL و Bcl-2 است که از آزاد شدن سیتوکروم C به درون سیتوزول جلوگیری می‌کند و گروه پیش برنده مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده از Bad، Bid، Bax تشکیل شده است که موجب آزاد شدن سیتوکروم C از میتوکندری به درون سیتوزول می‌شود و در نتیجه فعال شدن کاسپاز ۳ را تنظیم می‌کند [۹]. اعضای ضد مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده و پیش برنده مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده به‌صورت هتروداایمر در می‌آیند و به‌نظر می‌رسد که اعمال یکدیگر را معین می‌کنند. حدس زده می‌شود که غلظت‌های مشابه وابسته آن‌ها، مانند یک تنظیم‌کننده قوی برای برنامه مرگ سلولی عمل می‌کند [۴۳]. در واقع نسبت پروتئین پیش برنده مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده / ضد مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده حساسیت سلول‌ها به پیام مرگ را تعیین می‌کند [۴۴] و نیز تمامیت هسته سلول قلب و بقای سلول را به وسیله کنترل نفوذپذیری غشای میتوکندری و فعال‌سازی کاسپازها تنظیم می‌کند [۳۸]. در مطالعه حاضر نیز با افزایش بیان

ژن Bax، از طرفی کاهش بیان ژن Bcl-2 و افزایش نسبت Bcl-2/Bax بعد از تزریق Dox، ناپایداری غشای میتوکندری افزایش یافت و در نتیجه نفوذپذیری آن نسبت به سیتوکروم C افزایش پیدا کرد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که تزریق Dox باعث آسیب غشای میتوکندری و در نتیجه ایجاد مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده از طریق مسیر داخلی در میوکارد موش صحرایی شده است.

همچنین دیگر یافته اصلی مطالعه حاضر نشانگر نقش پیشگیرانه تمرینات هوازی منظم روی تردمیل در راستای کاهش آثار سمیت قلبی ناشی از تزریق Dox در موش‌های صحرایی نر مدل سالمندی بود. با توجه به بیان بیشتر ژن پیش برنده مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده Bax و افزایش بسیار بیشتر بیان ژن ضد مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده Bcl-2 و نیز کاهش نسبت Bax/Bcl-2 در گروه تمرین کرده درمان شده با Dox نسبت به موش‌های تمرین نکرده درمان شده با Dox به‌نظر می‌رسد مرگ سلولی بیشتری در گروه تمرین نکرده (AD) اتفاق افتاده باشد. در واقع تمرین ورزشی هوازی قبل و طی درمان Dox به‌طور نسبی موجب محافظت سلول‌های قلب از مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده ناشی از اجرای Dox شده است. این یافته هم‌سو با پژوهش آسانسائو و همکاران (۲۰۰۵) است که نشان دادند تمرین استقامتی افزایش ناشی از Dox را در پروتئین کربونیل، مالون دی آلدئید، Bax، نسبت Bax/Bcl-2 و فعالیت کاسپاز ۳ بافت را مهار می‌کند [۳]. همچنین با مطالعه کاوازیس و همکاران (۲۰۱۰) هم‌سو بود؛ نتایج آن‌ها نشان داد که تزریق Dox منجر به اختلال عملکرد میتوکندری قلب، فعال‌سازی پروتئازها و مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده می‌شود. در حالی که تمرین ورزشی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان قلبی و پروتئین HSP72 را افزایش داد و از میوسیت‌های قلبی و مقابل آسیب میتوکندری ناشی از Dox، فعال‌سازی پروتئاز و مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده محافظت کرد [۲۷]. در میان مکانیسم‌هایی که تمرین ورزشی، مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده ناشی از Dox را در قلب موش محدود می‌کند می‌توان به

می‌دهد [۳۷]. همچنین جعفری و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند بیان ژن Bax و نسبت Bax/Bcl-2 در گروه تمرین کرده به‌طور قابل توجهی پایین‌تر از گروه بی‌تمرین است [۳۸]. به‌طور خلاصه، نتایج این مطالعه نشان داد که Dox موجب کاهش بیان ژن Bcl-2 و افزایش بیان ژن Bax و نسبت Bax/Bcl-2 می‌شود. به‌علاوه تمرین هوازی در موش‌های سالمند می‌تواند از مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده کاردیومیوسیت‌ها ناشی از سالمندی پیشگیری نماید. همچنین با توجه به کاهش معنی‌دار در نسبت Bax/Bcl-2 در موش‌های گروه تمرین کرده درمان شده با Dox در بافت قلب، نسبت به کنترل‌های بی‌تمرین می‌توان نتیجه گرفت که تمرین ورزشی هوازی قبل و طی درمان Dox می‌تواند به‌عنوان راهبرد غیر دارویی، موجب محافظت سلول‌های قلب از مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده ناشی از القای Dox شود؛ هرچند که مطالعات بعدی برای یافتن سایر مسیرهایی که Dox در آن‌ها دخالت می‌کند؛ مورد نیاز است.

تشکر و قدردانی

این پژوهش حاصل رساله دکتری رشته تربیت بدنی و علوم ورزشی در گرایش فیزیولوژی ورزش است که با حمایت مالی دانشگاه مازندران انجام شده است.

افزایش بیان HSP و سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide Dismutase: SOD) در اثر تمرین، اشاره کرد. نقش محافظتی این پروتئین‌های مهم به‌وسیله پیشگیری از مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده مشخص شده است [۳]. همچنین افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان میتوکندریایی قلب می‌تواند در محافظت قلبی ناشی از تمرین ورزشی قبل و حین اجرای Dox شرکت کند [۲۷]. نشان داده شده است به‌دنبال تمرین کردن مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده کاردیومیوسیت‌ها کمتر، تکثیر کاردیومیوسیت‌ها بیشتر و تقویت استخر پیش‌ساز میوکارد اتفاق می‌افتد [۲۲، ۴۵].

یافته دیگر مطالعه حاضر نشان داد که ۶ هفته تمرین هوازی در موش‌های سالمند (بدون تزریق Dox) منجر به کاهش میزان بیان ژن پیش برنده مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده Bax و کاهش نسبت Bax/Bcl-2 نسبت به گروه سالمند بدون تمرین شد. این مطلب ممکن است نشان دهنده کاهش فرآیند مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده باشد و می‌توان آن را به اثر محافظتی تمرین هوازی در سالمندی برای پیشگیری از مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده کاردیومیوسیت‌ها ناشی از فرآیند سالمندی نسبت داد. این یافته هم‌سو با پژوهش کووک و همکاران (۲۰۰۶) است که نشان دادند 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

منابع

- [1] Marques-Aleixo I, Santos-Alves E, Mariani D, Rizo-Roca D, Padrão AI, Rocha-Rodrigues S, Viscor G, Torrella JR, Ferreira R, Oliveira PJ, Magalhães J, Ascensão A. Physical exercise prior and during treatment reduces sub-chronic doxorubicin-induced mitochondrial toxicity and oxidative stress. *Mitochondrion* 2015; 20: 22-33.
- [2] Kim EJ, Hwang S. Effects of aerobic exercise on antioxidants in rat models with cardiomyopath. *Phys Ther Rehabil Sci* 2015; 4(1): 17-21.
- [3] Ascensão A, Magalhães J, Soares JM, Ferreira R, Neuparth MJ, Marques F, Oliveira PJ, Duarte JA. 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): H722-31.

- [4] Frias MA, Lang U, Gerber-Wicht C, James RW. Native and reconstituted HDL protect cardiomyocytes from doxorubicin-induced apoptosis. *Cardiovasc Res* 2010; 85(1): 118-26.
- [5] Marques-Aleixo I, Santos-Alves E, Balça MM, Moreira PI, Oliveira PJ, Magalhães J, Ascensão A. Physical exercise mitigates doxorubicin-induced brain cortex and cerebellum mitochondrial alterations and cellular quality control signaling. *Mitochondrion* 2016; 26: 43-57.
- [6] Kotamraju S, Konorev EA, Joseph J, Kalyanaraman B. Doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and cardiomyocytes is ameliorated by nitron spin traps and ebselen. Role of reactive oxygen and nitrogen species. *J Biol Chem* 2000; 275(43): 33585-92.
- [7] Chandran K, Aggarwal D, Migrino RQ, Joseph J, McAllister D, Konorev EA, Antholine WE, Zielonka J, Srinivasan S, Avadhani NG, Kalyanaraman B. Doxorubicin inactivates myocardial cytochrome c oxidase in rats: cardioprotection by Mito-Q. *Biophys J* 2009; 96(4): 1388-98.
- [8] Frias MA, Somers S, Gerber-Wicht C, Opie LH, Lecour S, Lang U. The PGE2-Stat3 interaction in doxorubicin-induced myocardial apoptosis. *Cardiovasc Res* 2008; 80(1): 69-77.
- [9] Panaretakis T, Pokrovskaja K, Shoshan MC, Grandér D. Activation of Bak, Bax, and BH3-only proteins in the apoptotic response to doxorubicin. *J Biol Chem* 2002; 277(46): 44317-26.
- [10] De Angelis A, Piegari E, Cappetta D, Marino L, Filippelli A, Berrino L, Ferreira-Martins J, Zheng H, Hosoda T, Rota M, Urbanek K, Kajstura J, Leri A, Rossi F, Anversa P. Anthracycline cardiomyopathy is mediated by depletion of the cardiac stem cell pool and is rescued by restoration of progenitor cell function. *Circulation* 2010; 121(2): 276-92.
- [11] Soufi FG, Farajnia S, Aslanabadi N, Ahmadiasl N, Alipour M, Alipour M, Doustar Y, Abdolalizadeh J, Sheikhzadeh F. Long-term exercise training affects age-induced changes in HSP70 and apoptosis in rat heart. *Gen Physiol Biophys* 2008; 27(4): 263-70.
- [12] Maejima Y, Adachi S, Ito H, Hirao K, Isobe M. Induction of premature senescence in cardiomyocytes by doxorubicin as a novel mechanism of myocardial damage. *Aging Cell* 2008; 7(2): 125-36.
- [13] Piegari E, De Angelis A, Cappetta D, Russo R, Esposito G, Costantino S, Graiani G, Frati C, Prezioso L, Berrino L, Urbanek K, Quaini F, Rossi F. Doxorubicin induces senescence and impairs function of human cardiac progenitor cells. *Basic Res Cardiol* 2013; 108(2): 334.
- [14] Sturgeon K, Schadler K, Muthukumaran G, Ding D, Bajulaie A, Thomas NJ, Ferrari V, Ryeom S, Libonati JR. Concomitant low-dose doxorubicin treatment and exercise. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2014; 307(6): R685-92.
- [15] Hydock DS, Parry TL, Jensen BT, Lien CY, Schneider CM, Hayward R. Effects of endurance training on combined goserelin acetate and doxorubicin treatment-induced cardiac dysfunction. *Cancer Chemother Pharmacol* 2011; 68(3): 685-92.

- [16] Ascensão A, Lumini-Oliveira J, Machado NG, Ferreira RM, Gonçalves IO, Moreira AC, Marques F, Sardão VA, Oliveira PJ, Magalhães J. Acute exercise protects against calcium-induced cardiac mitochondrial permeability transition pore opening in doxorubicin-treated rats. *Clin Sci (Lond)* 2011; 120(1): 37-49.
- [17] Ascensão A, Ferreira R, Oliveira PJ, Magalhães J. Effects of endurance training and acute Doxorubicin treatment on rat heart mitochondrial alterations induced by in vitro anoxia-reoxygenation. *Cardiovasc Toxicol* 2006; 6(3-4): 159-72.
- [18] 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.
- [19] Shirinbayan V, Dabidi Roshan V, Mahjoub S. The therapeutic effect of endurance training on adriamycin-induced cardiac stress in rats. *Iranian Journal of Health and Physical Activity* 2013; 4(2): 8-17.
- [20] Dolinsky VW, Rogan KJ, Sung MM, Zordoky BN, Haykowsky MJ, Young ME, Jones LW, Dyck JR. Both aerobic exercise and resveratrol supplementation attenuate doxorubicin-induced cardiac injury in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013; 305(2): E243-53.
- [21] Lien CY, Jensen BT, Hydock DS, Hayward R. Short-term exercise training attenuates acute doxorubicin cardiotoxicity. *J Physiol Biochem* 2015; 71(4): 669-78.
- [22] Kolwicz SC, MacDonnell SM, Renna BF, Reger PO, Seqqat R, Rafiq K, Kendrick ZV, Houser SR, Sabri A, Libonati JR. Left ventricular remodeling with exercise in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 297(4): H1361-8.
- [23] Kanter MM, Hamlin RL, Unverferth DV, Davis HW, Merola AJ. Effect of exercise training on antioxidant enzymes and cardiotoxicity of doxorubicin. *J Appl Physiol* (1985) 1985; 59(4): 1298-303.
- [24] Chicco AJ, Schneider CM, Hayward R.. Exercise training attenuates acute doxorubicin-induced cardiac dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006; 47(2): 182-9.
- [25] Wonders KY, Hydock DS, Greufe S, Schneider CM, Hayward R. Endurance exercise training preserves cardiac function in rats receiving doxorubicin and the HER-2 inhibitor GW2974. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009; 64(6): 1105-13.
- [26] 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.
- [27] Kavazis AN, Smuder AJ, Min K, Tümer 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): H1515-24.
- [28] Hydock DS, Wonders KY, Schneider CM, Hayward R. Voluntary wheel running in rats receiving doxorubicin: effects on running activity and cardiac myosin heavy chain. *Anticancer Res* 2009; 29(11): 4401-7.
- [29] Hydock DS, Lien CY, Jensen BT, Schneider CM, Hayward R. Exercise preconditioning

- provides long-term protection against early chronic doxorubicin cardiotoxicity. *Integr Cancer Ther* 2011; 10(1): 47-57.
- [30] Wonders KY, Hydock DS, Schneider CM, Hayward R. Acute exercise protects against doxorubicin cardiotoxicity. *Integr Cancer Ther* 2008; 7(3): 147-54.
- [31] 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.
- [32] Kim SY, Lee J. Exercise Training suppresses vascular fibrosis in aging obesity induced rats. *J Exerc Nutrition Biochem* 2014; 18(2): 175-80.
- [33] Lee J, Cho JY, Kim WK. Anti-inflammation effect of Exercise and Korean red ginseng in aging model rats with diet-induced atherosclerosis. *Nutr Res Pract* 2014; 8(3): 284-91.
- [34] Chang YM, Chang HH, Kuo WW, Lin HJ, Yeh YL, Padma Viswanadha V, Tsai CC, Chen RJ, Chang HN, Huang CY. Anti-apoptotic and pro-survival effect of Alpinate *Oxyphyllae Fructus* (Aof) in a d-galactose-induced aging heart. *Int J Mol Sci* 2016; 17(4): 466.
- [35] Hydock DS, Lien CY, Jensen BT, Parry TL, Schneider CM, Hayward R. Rehabilitative exercise in a rat model of doxorubicin cardiotoxicity. *Exp Biol Med (Maywood)* 2012; 237(12): 1483-92.
- [36] Uhm JS, Chung WB, Yoon JS, Oh YS, Youn HJ. Effects of adriamycin and candesartan on the collagen and elastin of the aorta in rats. *Clin Hypertens* 2014; 20: 8.
- [37] 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.
- [38] 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): 328-33.
- [39] McMullen JR, Amirahmadi F, Woodcock EA, Schinke-Braun M, Bouwman RD, Hewitt KA, Mollica JP, Zhang L, Zhang Y, Shioi T, Buerger A, Izumo S, Jay PY, Jennings GL. Protective effects of exercise and phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) signaling in dilated and hypertrophic cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(2): 612-7.
- [40] Green PS, Leeuwenburgh C. Mitochondrial dysfunction is an early indicator of doxorubicin-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1588(1): 94-101.
- [41] Chen X, Chen Y, Bi Y, Fu N, Shan C, Wang S, Aslam S, Wang PW, Xu J. Preventive cardioprotection of erythropoietin against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Cardiovasc Drugs Ther* 2007; 21(5): 367-74.
- [42] Childs AC, Phaneuf SL, Dirks AJ, Phillips T, Leeuwenburgh C. Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2:Bax ratio. *Cancer Res* 2002; 62(16): 4592-8.
- [43] Honardoost M, Soleimanjahi H, Rajaei F. Apoptosis: programmed cell death. *JQUMS* 2013; 17(3): 48-57. (Persian)
- [44] Aboutaleb N, Shamsaei N, Rajabi H,

Khaksari M, Erfani S, Nikbakht F, Motamedi P, Shahbazi A. Protection of Hippocampal CA1 Neurons Against Ischemia/Reperfusion Injury by Exercise Preconditioning via Modulation of Bax/Bcl-2 Ratio and Prevention of Caspase-3 Activation. *Basic Clin Neurosci* 2016; 7(1): 21-9.

[45] Boström P, Mann N, Wu J, Quintero PA, Plovie ER, Panáková D, Gupta RK, Xiao C, MacRae CA, Rosenzweig A, Spiegelman BM. C/EBP β controls exercise-induced cardiac growth and protects against pathological cardiac remodeling. *Cell* 2010; 143(7): 1072-83.