

## اثر حفاظت قلبی فعالیت بدنی اختیاری بر تغییرات بیان ژن زنجیره سنگین میوزین قلبی ناشی از القاء دوکسوروبیسین در رات های مدل سالمندی

احمد پارسایی فر<sup>۱</sup>، والی الله دبیدی روشن<sup>۲</sup>، زهره مظاهری<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت ۱۳۹۵/۰۶/۲۶ تاریخ پذیرش ۱۳۹۵/۰۸/۲۲

### چکیده

**پیش زمینه و هدف:** علی‌رغم تأیید تأثیر تمرین ورزشی اجباری در کاهش سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین، نقش فعالیت بدنی اختیاری در کاهش سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین به‌ویژه در سالمندان هنوز به‌درستی بررسی نشده است. هدف مطالعه حاضر بررسی اثر حفاظت قلبی فعالیت بدنی اختیاری بر تغییرات بیان ژن زنجیره سنگین میوزین قلبی ناشی از القاء دوکسوروبیسین در رات های مدل سالمند بود.

**مواد و روش کار:** این مطالعه از نوع تجربی بود که در آن ۲۴ رات نر ۱۲ هفته‌ای، با میانگین وزنی  $23 \pm 25$  گرم، پس از القاء سالمندی از طریق تزریق درون صفاقی روزانه ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم محلول دی‌گالاکتوز به مدت ۹ هفته، به‌صورت تصادفی به سه گروه سالمند+سالین (AS)، سالمند+دوکسوروبیسین (AD) و سالمند+دوکسوروبیسین+فعالیت بدنی اختیاری (ADWR) تقسیم شدند. فعالیت بدنی اختیاری بر روی چرخ گردان هم‌زمان با ۶ هفته آخر القاء سالمندی اجرا شد. در ۱۵ روز پایانی روزانه ۱ میلی‌گرم/کیلوگرم دوکسوروبیسین و سالین (دوز تجمعی ۱۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) به‌صورت درون صفاقی به رات های دریافت‌کننده دوکسوروبیسین و سالین تزریق شد. ۴۸ ساعت بعد از آخرین تزریق دوکسوروبیسین، بطن چپ جدا و با روش Real time – PCR، بیان ژن های زنجیره سنگین میوزین قلبی اندازه‌گیری شد.

**یافته‌ها:** دوکسوروبیسین باعث افزایش بیان ژن زنجیره سنگین میوزین بتا و کاهش بیان ژن زنجیره سنگین میوزین آلفا قلبی در گروه AD شد. باین وجود، ۶ هفته فعالیت بدنی اختیاری، تغییرات ناشی از دوکسوروبیسین در بیان ژن های زنجیره سنگین میوزین قلبی در گروه ADWR را کاهش داد.

**بحث و نتیجه‌گیری:** فعالیت بدنی اختیاری ابزاری مؤثر در کاهش اثرات سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین در افراد سالمند است.

**کلیدواژه‌ها:** دوکسوروبیسین، سالمندی، سمیت قلبی، زنجیره سنگین میوزین، فعالیت بدنی اختیاری

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و هفتم، شماره دهم، ص ۹۰۱-۸۹۳، دی ۱۳۹۵

آدرس مکاتبه: مازندران - بابلسر - پردیس دانشگاه - دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، تلفن: ۰۱۱-۲۵۲۳۲۰۹۱

Email: vdabidiroshan@yahoo.com

### مقدمه

اثرات سمیت ناشی از DOX می‌باشد (۳). در همین زمینه گزارش شده است که سالمندان بالای ۶۵ سال در معرض خطر بیشتری برای سمیت قلبی ناشی از DOX قرار دارند (۳). لذا توجه به این دسته از بیماران لازم و ضروری است. مسیرها و مکانیزم‌های پیشنهادی مختلفی نظیر اختلال در بیان پروتئین‌های سلول‌های قلبی، اختلال در هموستاز کلسیم سلولی و میتوکندریایی، اختلالات بیوانرژی میکرواندریایی (۴) و افزایش تولید گونه‌های اسیژنی فعال (ROS) (۱) برای سمیت قلبی ناشی از DOX ارائه شده است. گزارش شده است که در این میان رادیکال‌های آزاد نقش اصلی را

دوکسوروبیسین (DOX) یا آدریامایسین یکی از داروهای ضد سرطانی مؤثر در درمان انواع سرطان است. علی‌رغم استفاده بالینی این دارو در درمان انواع سرطان، بیمارانی که تحت درمان DOX قرار می‌گیرند، مستعد اختلالات قلبی حاد و مزمن نظیر ریتم‌های نابجا، بد عمل کردن بطنی و نارسایی قلبی می‌شوند (۱). در نتیجه سمیت قلبی وابسته به دوز تجمعی این دارو مهم‌ترین محدودیت درمانی آن است (۲). این مسئله در بیماران سالمند مبتلا به سرطان اهمیت بیشتری پیدا می‌کند. زیرا سن، یکی از فاکتورهای خطر ایجاد

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران  
<sup>۲</sup> استاد تمام فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران (نویسنده مسئول)  
<sup>۳</sup> استادیار علوم تشریح، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

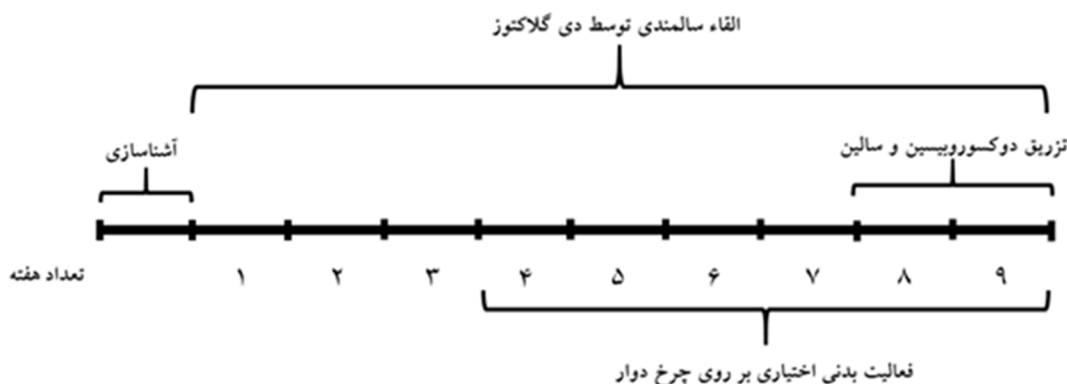
می‌رسد. فعالیت بدنی اختیاری روشی پیشنهادی است که در آن بیمار به صورت خودکنترلی و بدون اجبار، میزان فعالیت بدنی خود را بر اساس توانایی خود تنظیم می‌کند. بر همین اساس، در مطالعه حاضر، محققان با توجه به شرایط بدنی آزمودنی‌های تحقیق که رات‌های مدل سالمند بودند، فعالیت بدنی اختیاری را انتخاب کردند. بر اساس دانش ما، تاکنون در تحقیقات صورت گرفته داخلی، تأثیر فعالیت بدنی اختیاری بر تغییرات بیان ژن MHC قلبی ناشی از القای DOX در رات‌های مدل سالمندی بررسی نشده است. همچنین، برخلاف مطالعات قبلی داخلی که دوزهای حاد DOX را بکار برده‌اند، در این مطالعه از دوزهای تجمعی DOX برای ایجاد سمیت قلبی استفاده گردید که ممکن است اثرات سمیت قلبی متفاوتی نسبت به دوزهای حاد داشته باشد. در این مطالعه محققان فرض کردند که القای DOX بیان ژن MHC- $\beta$  را در بطن قلب رات‌های سالمند افزایش و از طرفی بیان ژن MHC- $\alpha$  را کاهش می‌دهد و در مقابل، ۶ هفته فعالیت بدنی اختیاری اثر پیشگیرانه‌ای در مقابل این تغییرات ناشی از القای DOX دارد. بنابراین هدف این مطالعه بررسی اثر حفاظت قلبی فعالیت بدنی اختیاری بر تغییرات بیان ژن‌های MHC قلبی ناشی از القای DOX در رات‌های مدل سالمندی بود.

### مواد و روش کار

پژوهش حاضر از نوع تجربی و آزمایشگاهی بود. ابتدا طرح تحقیق توسط گروه فیزیولوژی ورزشی دانشگاه مازندران تأیید و سپس بر اساس دستورالعمل‌های نگهداری و استفاده حیوانات آزمایشگاهی، تهیه‌شده توسط آکادمی ملی علوم (۱۸) اجرا شد. در این پژوهش ۲۴ سر رات نر نژاد ویستار ۱۲ هفته‌ای با میانگین وزن اولیه  $23 \pm 250$  گرم از مرکز انستیتو پاستور آمل تهیه و سپس به آزمایشگاه حیوانی دانشکده تربیت‌بدنی دانشگاه مازندران منتقل شدند. پس از یک هفته سازگاری با محیط آزمایشگاه، موش‌ها به‌طور تصادفی به سه گروه ۸ تایی شامل گروه سالمند+سالین (AS)، گروه سالمند+ DOX (AD)، گروه سالمند+ DOX + فعالیت بدنی اختیاری (ADWR) تقسیم شدند. کلیه آزمودنی‌ها به‌صورت ۴ سر رات در هر قفس و در شرایط کاملاً استاندارد، در دمای ۲۴-۲۰ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۴۵-۵۵ درصد و چرخه تاریکی/روشنایی ۱۲ ساعته همراه با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. طرح کلی تحقیق در شکل ۱ نشان داده شده است.

در ایجاد سمیت قلبی ناشی از DOX بازی می‌کنند (۵). تولید ROS یا استرس اکسایشی منجر به افزایش آپوپتوز، نکروز و خودخواری سلول‌های قلبی شده و از این طریق در گسترش کاردیومیوپاتی ناشی از DOX (۶) و تغییر بیان ژن‌های زنجیره سنگین میوزین قلبی (MHC) نقش دارد (۷). به‌طوری‌که القای DOX منجر به افزایش بیان ژن زنجیره سنگین میوزین بتا (MHC- $\beta$ ) و کاهش بیان ژن زنجیره سنگین میوزین آلفای قلبی (MHC- $\alpha$ ) می‌شود (۷-۹). در واقع DOX منجر به جابجایی ایزوفرم‌های زنجیره سنگین میوزین قلبی، یعنی از نوع آلفا به نوع بتا می‌شود (۸). پروتئین انقباضی میوزین نقش مهمی در تنظیم انقباض عضله قلبی دارد (۱۰). عضله قلبی دو نوع ایزوفرم زنجیره سنگین میوزین (MHC) آلفا و بتا را بیان می‌کند (۱۱). فعالیت ATP آزی و سرعت بیشینه کوتاه شدن ایزوفرم آلفا بیشتر از ایزوفرم بتا است (۱۱). بنابراین زمانی که بافت قلب حاوی مقادیر زیادی ایزوفرم آلفا نسبت به ایزوفرم بتا باشد، توان انقباضی آن بالاتر است (۱۱). از طرفی گزارش شده است که افزایش بیان MHC- $\beta$  قلبی، با بد عمل کردن قلبی ارتباط دارد (۷). مطالعات متعددی نشان داده‌اند که القای DOX منجر به افزایش بیان MHC- $\beta$  قلبی می‌شود (۷، ۸، ۱۲). در مطالعه‌ای ارتباط خطی و معکوسی بین بیان MHC- $\beta$  قلبی و برون ده توان در سلول‌های قلبی جداشده موش‌ها گزارش شد (۱۳). بنابراین روشن است که جابجایی ناشی از DOX، در ایزوفرم‌های زنجیره سنگین میوزین آلفا و بتای قلبی، می‌تواند عملکرد قلبی را در بیماران دریافت‌کننده DOX تحت تأثیر قرار داده و مشکلات سلامتی آن‌ها را دوچندان کند.

در تلاش برای کاهش اثرات سمیت قلبی ناشی از القای DOX، تدابیر مختلفی بکار گرفته شده است. تمرین ورزشی یکی از رویکردهایی است که در سال‌های اخیر توجه محققان را به خود جلب کرده است. اثرات مفید تمرینات ورزشی در کاهش سمیت قلبی ناشی از DOX به‌کرات توسط مطالعات قبلی داخلی و خارجی به اثبات رسیده است (۸، ۱۴-۱۶). علیرغم اثرات مفید تمرینات منظم ورزشی در کاهش اثرات سمیت قلبی ناشی از DOX، گاهی شرایطی به وجود می‌آید که استفاده از تمرینات ورزشی با شدت، مدت و تکرار مشخص را محدود می‌سازد. افزایش سن، از جمله شرایطی است که می‌تواند ظرفیت ورزشی و بدنی فرد را در اجرای تمرینات منظم ورزشی کاهش دهد (۱۷). بنابراین در چنین شرایطی استفاده از روشی جایگزین که بیمار را فعال نگه‌داشته و در عین حال فشار ناشی از تمرینات ورزشی را نداشته باشد، ضروری به نظر



شکل (۱): طرح کلی تحقیق در این پژوهش

استخراج RNA به وسیله QIAzol® Lysis Reagent (Qiagen, Hilden, Germany) و کلوفرم (Qiagen) به روش دستی و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. بدین صورت که حدود ۵۰ میلی گرم بافت بطن چپ قلب به صورت جداگانه، جهت استخراج total RNA به نسبت ۱ به ۱۰ در QIAzol® Lysis Reagent به روش هاون کوبی هموژن گردید و به منظور برداشتن اجزاء پروتئینی، محصول حاصل در ۴ درجه سانتی گراد، ۱۰ دقیقه، ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. سپس به نسبت ۱ به ۰/۵ با کلوفرم مخلوط و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. محصول در ۴ درجه سانتی گراد، ۱۵ دقیقه، ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ و بخش معدنی و آبی از هم جدا شدند، بخش محتوی RNA برداشته و با نسبت ۱ به ۰/۵ با ایزوپروپانول مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق رها و سپس در ۴ درجه سانتی گراد، ۱۰ دقیقه، ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. پلاک حاوی RNA در اتانول شستشو و در ۲۰۰ μL آب RNase-Free حل گردید. غلظت RNA مورد سنجش واقع شد (Eppendorf، آلمان) و نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ به عنوان تخلیص مطلوب تعریف گردید. سنتز cDNA با استفاده از QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. به طور خلاصه ابتدا نمونه های RNA به منظور حذف DNA ژنومی به مدت ۲ دقیقه در gDNA Wipout buffer در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. بعد از این مرحله نمونه های RNA برای ساخت cDNA آماده شدند. واکنش کلی در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد و سپس یک مرحله انکوباسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد انجام شد. به دنبال سنتز cDNA واکنش زنجیره ای پلیمرز (Polymerase Chain Reaction, PCR) صورت گرفت.

#### Real time – PCR

#### القای سالمندی:

پس از یک هفته سازگاری با محیط آزمایشگاه، سالمندی از طریق تزریق روزانه ۱۰۰ میلی گرم/ کیلوگرم دی گلاکتوز (Sigma ST. Louis, MO) محلول در نرمال سالین به صورت درون صفاقی برای مدت ۹ هفته القاء شد (۱۹).

#### برنامه فعالیت بدنی اختیاری:

به طور کلی ۶ هفته فعالیت اختیاری دویدن بر روی چرخ گردان اجرا شد. ابتدا حیوانات گروه تمرینی به مدت یک هفته با نحوه فعالیت بر روی چرخ گردان آشنا شدند. سپس برنامه فعالیت بدنی همزمان با شروع هفته چهارم سالمند سازی شروع و تا آخر ادامه پیدا کرد. هر یک از رات های گروه تمرینی به صورت انفرادی برای مدت ۶ هفته، در قفس های مجهز به چرخ گردان و شمارشگر مسافت قرار گرفتند و مقدار مسافت طی شده توسط هر یک از آنها به صورت روزانه یادداشت گردید.

#### تزریق DOX و سالین و بافت برداری:

در ۱۵ روز پایانی طرح پژوهش که با هفته پنجم و ششم فعالیت بدنی اختیاری و نیز هفته هشتم و نهم سالمند سازی همزمان بود، روزانه ۱ میلی گرم/ کیلوگرم داروی DOX (Doxorubicin hydrochloride, Pfizer, Australia) و سالین به صورت درون صفاقی به هر یک از موش های دریافت کننده DOX و سالین تزریق شد (۱۲). هدف از این برنامه، رسیدن به دوز تجمعی ۱۵ میلی گرم/ کیلوگرم بود. ۴۸ ساعت بعد از آخرین تزریق داروی DOX، کلیه آزمودنی ها در شرایط استراحتی و ناشتایی، با کتامین و زایلازین با نسبت ۵ به ۲ بی هوش و پس از جراحی، بافت قلب به طور کامل برداشته و قسمتی از بطن چپ جدا و پس از شستشو بلافاصله در مایع نیتروژن قرار داده شد و تا زمان اندازه گیری بیان ژن های زنجیره سنگین میوزین قلبی در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد قرار داده شد.

#### استخراج RNA و سنتز cDNA:

پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ گزارش شده است، ضمن اینکه از GAPDH به عنوان ژن مرجع استفاده گردید. برنامه دمایی مورد استفاده در Real time – PCR شامل: ۹۵ به مدت ۱۰ دقیقه- ۹۵ به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ به مدت ۱ دقیقه (تکرار ۴۰ سیکل) بود. نمودار Melt جهت بررسی صحت داده‌ها و نمودار استاندارد به منظور بهینه‌سازی شرایط آزمایش رسم گردید و بیان داده‌ها توسط نسبت بیان ژن‌های های MHC- $\alpha$  و MHC- $\beta$  به ژن مرجع محاسبه گردید. میزان بیان ژن‌های مورد نظر نیز با روش  $2^{-\Delta\Delta CT}$  اندازه‌گیری شد.

جهت اندازه‌گیری سطوح بیان ژن‌های های MHC- $\beta$  و MHC- $\alpha$  بافت قلبی از روش کمی Real time – PCR با استفاده از Applied Primix syber green II (آمریکا) انجام شد (Biosystems Step One, Biosystems Step One). مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۰ میکرو لیتر (شامل ۱ میکرو لیتر cDNA، ۱ میکرو لیتر پرایمر Forward، ۱ میکرو لیتر پرایمر Reverse، ۷ میکرو لیتر آب Depc و ۱۰ میکرو لیتر syber green) و هر واکنش به صورت duplicate صورت پذیرفت. طراحی پرایمرها بر اساس اطلاعات در بانک ژنی NCBI و توسط شرکت پیشگام (ایران, Pishgam) انجام شد. توالی

جدول (۱): مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش

نام ژن	کد ژن	توالی پرایمر (5'-3')	دمای ذوب (°C)	اندازه (bp)
$\alpha$ -MHC	NM_017239.2	F: TGATGACTCCGAGGTGCTTT	83.96	234
		R: TGACACAGACCCTTGACCAG		
$\beta$ -MHC	NM_017240.2	F: GAGAATGGCAAGACGGTG	79.94	78
		R: GTCCTCGATCTTGTCCAAC		
GAPDH	NM_017008.4	F: GACATGCCCGCTGGAGAAAC	۷۹.۹۳	۹۲
		R: AGCCCAGGATGCCCTTTAGT		

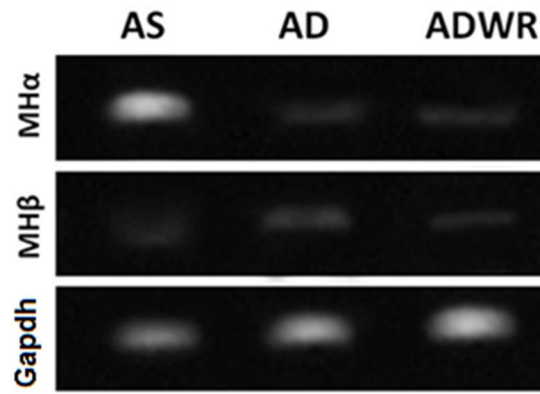
می‌شود، تزریق داروی DOX منجر به افزایش معنی‌دار بیان ژن  $\beta$ -MHC ( $P \leq 0/05$ ) در گروه AD نسبت به گروه AS و ADWR و کاهش معنی‌دار بیان ژن  $\alpha$ -MHC ( $P \leq 0/05$ ) قلبی در گروه AD نسبت به گروه AS شد. در مقابل نشان داده شد که در گروه ADWR، ۶ هفته فعالیت بدنی اختیاری بر روی چرخ دوار از افزایش بیان ژن  $\beta$ -MHC جلوگیری کرد، به گونه‌ای که بیان این ژن، نه تنها نسبت به گروه AD ( $P \leq 0/05$ ) بلکه حتی نسبت به گروه AS ( $P \leq 0/05$ ) نیز به طرز معنی‌داری کم‌تر بود. همچنین ۶ هفته فعالیت بدنی اختیاری منجر به افزایش بیان ژن  $\alpha$ -MHC در گروه ADWR شد، اما این افزایش نسبت به گروه AD معنی‌دار نبود.

### روش‌های آماری

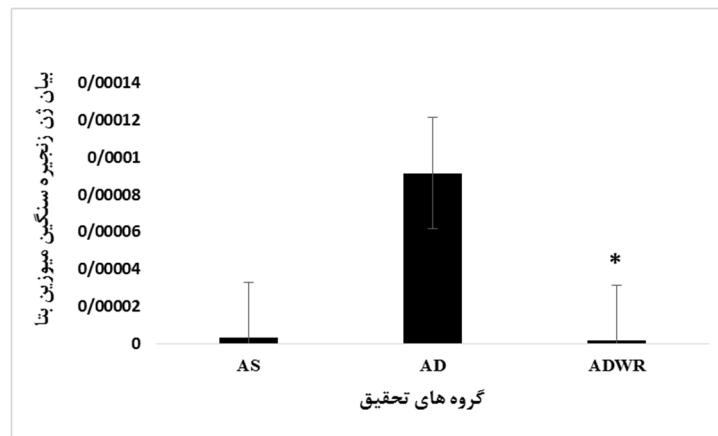
پس جمع‌آوری داده‌های خام، از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف جهت بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌ها استفاده گردید. با توجه به طبیعی بودن توزیع داده‌ها، برای بررسی تفاوت‌های موجود در بین ۳ گروه مورد مطالعه، از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی در سطح معنی‌داری  $P \leq 0/05$  استفاده شد.

### یافته‌ها

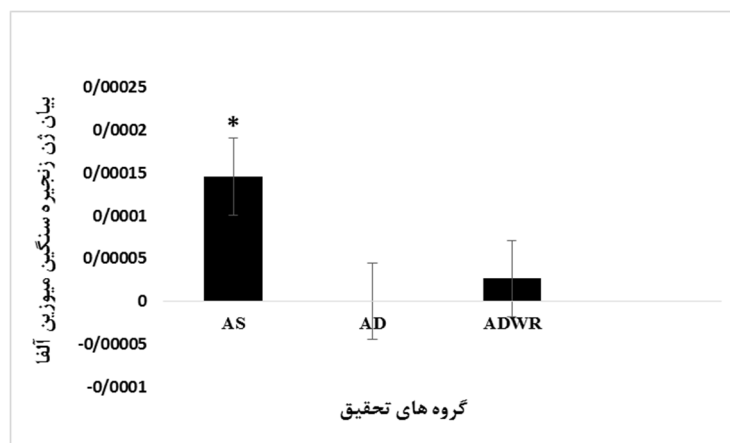
شکل ۲، ۳ و ۴ نتایج حاصل از Real time – PCR را در ارتباط با بیان ژن‌های  $\beta$ -MHC و  $\alpha$ -MHC بافت بطن چپ گروه‌های مختلف تحقیق نشان می‌دهد. همان‌گونه که مشاهده



شکل (۲): نحوه توزیع بیان ژن  $\alpha$ -MHC و  $\beta$ -MHC قلبی در هر سه گروه AS، AD و ADWR بر روی اسکن ژل بیان ژن



شکل (۳): توزیع بیان ژن  $\beta$ -MHC قلبی در رات های دریافت کننده دوکسوروبیسین (DOX) یا سالین (S). AS (سالمند+ سالین)، AD (سالمند+ دوکسوروبیسین)، ADWR (سالمند+ دوکسوروبیسین+ فعالیت بدنی اختیاری).  $\times$  معنی داری تفاوت (کمتر بودن) در مقابل گروه های AS و AD ( $P \leq 0/05$ ).



شکل (۴): توزیع بیان ژن  $\alpha$ -MHC قلبی در رات های دریافت کننده دوکسوروبیسین (DOX) یا سالین (S). AS (سالمند+ سالین)، AD (سالمند+ دوکسوروبیسین)، ADWR (سالمند+ دوکسوروبیسین+ فعالیت بدنی اختیاری).  $\times$  معنی داری تفاوت (بیشتر بودن) در مقابل گروه های AD و ADWR ( $P \leq 0/05$ ).

## بحث و نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر برای اولین بار در تحقیقات داخلی، تأثیر یک دوره فعالیت بدنی اختیاری را قبل و در حین درمان با دوزهای تجمعی DOX، بر سمیت قلبی ناشی از این دارو در رات های مدل سالمندی بررسی کرد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که ۱۵ روز تزریق DOX (دوز تجمعی ۱۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) منجر به افزایش بیان ژن زنجیره سنگین میوزین بتا و کاهش هم‌زمان بیان ژن زنجیره سنگین میوزین آلفا قلبی شد؛ اما ۶ هفته فعالیت بدنی اختیاری قبل و در حین تزریق DOX، تغییرات بیان ژن‌های زنجیره سنگین میوزین قلبی ناشی از DOX را کاهش دهد.

یافته‌های پژوهش حاضر در زمینه تأثیر DOX بر بیان ژن‌های MHC- $\alpha$  و MHC- $\beta$  با نتایج حاصل از مطالعات قلبی همسو می‌باشد (۷، ۸، ۱۲). سمیت قلبی ناشی از DOX پیچیده بوده و مطالعات گذشته به روش‌های مختلفی این موضوع را بررسی کرده‌اند. مطالعات اولیه از آزمایشگاه ما نیز به‌عنوان پیشگام در تحقیقات داخلی، اثرات حاد سمیت قلبی ناشی از DOX را از طریق بررسی فاکتورهای بیوشیمیایی نظیر مالون دی آلدئید (MDA)، سوپر اکسید دسموتاز (SOD) (۱۴، ۱۵، ۲۰)، پروتئین شوک گرمایی ۷۰ (HSP ۷۰) (۲۰) و آپلین (۱۴، ۱۵) نشان دادند. در مطالعه حاضر به دنبال ۱۵ روز تزریق DOX، افزایش معنی‌دار بیان ژن MHC- $\beta$  در رات های گروه AD نسبت به گروه AS و ADWR و نیز کاهش معنی‌دار بیان ژن MHC- $\alpha$  در رات های گروه AD نسبت به گروه AS مشاهده شد. نتایج حاصل با یافته‌های مطالعات قلبی هم‌خوانی دارد (۷، ۸). از دلایل تغییرات بیان ژن‌های MHC قلبی ناشی از DOX، می‌توان به استرس اکسایشی عضله قلبی، آپوپتوز و تغییرات متابولیسمی اشاره کرد (۷). گزارش شده است که اختلالات در متابولیسم انرژی سلول‌های عضله قلبی در ایجاد سمیت قلبی نقش داشته (۷، ۲۱) و ممکن است بر توزیع MHC قلبی تأثیر داشته باشد (۷). از آنجایی که ژن MHC- $\beta$  فعالیت ATP آزی میوزین و سرعت لغزش فیلامان کم‌تری نسبت به ژن MHC- $\alpha$  دارد، لذا می‌تواند منجر به تخریب عملکرد قلبی شود (۸). هایدوک و همکاران نیز دلیل احتمالی بد عمل کردن قلبی ناشی از تزریق DOX را افزایش بیان MHC- $\beta$  عنوان کردند (۷). پیشنهاد شده است که افزایش بیان MHC- $\beta$  به دلیل اقتصاد بالای مصرف انرژی، می‌تواند انرژی درون‌سلولی را ذخیره کند، اما به دلیل کاهش عملکرد انقباضی می‌تواند پیشرفت بیماری را تسریع کند (۲۲).

در زمینه تأثیر تمرینات ورزشی در جهت کاهش اثرات مخرب ناشی از القاء DOX بر بافت قلب، مطالعات قلبی داخلی (۱۴، ۱۵، ۲۰) و خارجی (۷، ۸، ۱۶) پیشنهاد می‌کنند که هم فعالیت بدنی اختیاری و هم تمرینات ورزشی اجباری نقش مؤثری در کاهش اثرات

سمیت قلبی ناشی از DOX دارند. در مطالعه حاضر، به دلیل اینکه آزمودنی‌های ما سالمند بودند و ممکن بود از ضعف عضلانی وابسته به سن (۲۳) رنج ببرند، لذا ما ترجیح دادیم که آزمودنی‌ها برنامه فعالیت بدنی خود را ۴ هفته قبل از آغاز اولین تزریق DOX شروع کنند تا شرایط بدنی و قلبی-عروقی آن‌ها به‌مرورزمان بهبود یافته و برای دوره تزریق DOX آماده شوند. زیرا بر اساس شواهد موجود، در افراد با عملکرد بطن چپ نرمال، ورزش از طریق جلوگیری از آسیب‌های قلبی مرتبط با سالمندی و سازگاری قلبی به تمرین ورزشی منظم که منجر به هایپر تروفی قلبی فیزیولوژیکی می‌شود و نیز جلوگیری از تخریب عملکرد سیستمی و دیاستولی مرتبط با DOX اثرات مثبت خود را اعمال می‌کند (۲۴). همچنین به‌منظور حفظ آمادگی قلبی عروقی به‌دست‌آمده طی ۴ هفته نخست فعالیت بدنی و تقلیل اثرات مخرب ناشی از DOX، ۲ هفته پایانی برنامه فعالیت بدنی را هم‌زمان با تزریق دوره ۱۵ روزه DOX قرار دادیم. زیرا قبلاً نیز اثر حفاظت قلبی تمرین ورزشی کوتاه‌مدت در حین تزریق DOX نشان داده شده بود (۲۵). یافته‌های ما نشان داد که ۶ هفته فعالیت بدنی اختیاری قبل و در حین ۱۵ روز تزریق DOX، اثر حفاظتی بر تغییرات MHC بطن چپ حیوانات دریافت‌کننده DOX داشت، به‌گونه‌ای که به طرز معنی‌داری از افزایش بیان ژن MHC- $\beta$  در رات های گروه ADWR جلوگیری کرد و از طرفی موجب تضعیف کاهش بیان MHC- $\alpha$  قلبی در رات های گروه ADWR شد، اما این نتیجه نسبت به گروه AD معنی‌دار نبود. این یافته مشابه با نتایج مطالعات قلبی در این زمینه است (۷، ۸). از آنجایی که نشان داده شده است تمرین ورزشی حالت ضد اکسایشی عضله قلبی را افزایش می‌دهد (۸، ۲۶)، لذا احتمال دارد اثر حفاظت قلبی ناشی از فعالیت بدنی اختیاری که در این مطالعه نشان داده شد، ناشی از سرکوب رادیکال‌های آزاد باشد. گزارش شده است که تمرین ورزشی منجر به افزایش ایزوفرم های سوپر اکسید دسموتاز (SOD) و محتوای پروتئین شوک گرمایی ۷۲ (HSP ۷۲) قلبی می‌شود که هر دوی این فاکتورها به ترتیب از طریق مقاومت در برابر رادیکال‌های سوپر اکسید و حفظ عملکرد پروتئینی در حین وضعیت‌های استرس سلولی، اثر حفاظت قلبی خود را اعمال می‌کنند (۲۵). همچنین گزارش شده است که سطوح افزایش یافته SOD یا HSP72 قلبی با اثر حفاظت قلبی ناشی از ورزش در مقابل DOX ارتباط دارد (۲۵، ۲۷). علاوه بر این ورزش در به حداقل رساندن سیگنال‌های آپوپتوزی که از فاکتورهای مرتبط با سمیت قلبی ناشی از DOX است (۱۲)، نقش دارد.

آنچه مسلم است، این است که بر اساس شواهد موجود، هم تمرینات ورزشی منظم و هم فعالیت بدنی اختیاری هر دو می‌توانند به‌عنوان درمان کمکی در کنار سایر روش‌های درمانی، در کاهش

کار، اثرات مفیدی در کاهش سمیت قلبی ناشی از DOX دارد. به طور کلی یافته‌های این مطالعه نشان داد که حتی حداقل فعالیت بدنی اختیاری و با شدت کم نیز می‌تواند در کاهش اثرات سمیت قلبی مؤثر باشد. نتیجه حاصل می‌تواند برای افراد سالمند و ناتوان در اجرای تمرینات ورزشی منظم مفید واقع شود.

### تشکر و قدردانی

از تمامی کسانی که در اجرا و به پایان رساندن این پژوهش ما را یاری نمودند و همچنین از مسئولین و کارکنان محترم آزمایشگاه فیزیولوژی ورزشی دانشگاه مازندران صمیمانه قدردانی می‌نماییم.

اثرات سمیت قلبی ناشی از DOX مؤثر باشند. بر این اساس، بیماران مبتلا به سرطان که تحت درمان DOX قرار می‌گیرند، می‌توانند با توجه به شرایط جسمانی خود، یکی از دو شیوه زندگی فعال را برای خود انتخاب نمایند؛ اما از آنجایی که ماهیت تمرینات ورزشی منظم، ممکن است فشار بیشتری را به فرد وارد کند و با در نظر گرفتن این نکته که گاهی خود تمرینات ورزشی سنگین، می‌توانند به عنوان استرس اضافی برای بعضی از بیماران مبتلا به سرطان، به‌ویژه بیماران سالمند باشند. لذا به بیماران سالمند پیشنهاد می‌شود که فعالیت بدنی اختیاری را انتخاب کنند، چراکه بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، این نوع فعالیت بدنی ضمن ایمن بودن از لحاظ فشار

### References

1. Dhingra R, Margulets V, Chowdhury SR, Thliveris J, Jassal D, Fernyhough P, et al. Bnip3 mediates doxorubicin-induced cardiac myocyte necrosis and mortality through changes in mitochondrial signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111(51):E5537-5544.
2. Umlauf J, Horký M. Molecular biology of doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Exp Clin Cardiol* 2002;7(1): 35.
3. Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, Janssens S, Crijns HJ, Moens AL. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J Mol Cell Cardiol* 2012;52(6): 1213-25.
4. Andreadou I, Mikros E, Ioannidis K, Sigala F, Naka K, Kostidis S, et al. Oleuropein prevents doxorubicin-induced cardiomyopathy interfering with signaling molecules and cardiomyocyte metabolism. *J Mol Cell Cardiol* 2014;69: 4-16.
5. 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-R31.
6. Ma J, Wang Y, Zheng D, Wei M, Xu H, Peng T. Rac1 signalling mediates doxorubicin-induced cardiotoxicity through both reactive oxygen species-dependent and-independent pathways. *Cardiovascular Res* 2012: cvs309.
7. Hydock DS, Lien C-Y, Schneider CM, Hayward R. Exercise preconditioning protects against doxorubicin-induced cardiac dysfunction. *Med Sci Sports Exerc* 2008;40(5): 808-17.
8. 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.
9. de Beer EL, Bottone AE, van der Velden J, Voest EE. Doxorubicin impairs crossbridge turnover kinetics in skinned cardiac trabeculae after acute and chronic treatment. *Mol Pharmacol* 2000;57(6): 1152-7.
10. Carnes CA, Geisbuhler TP, Reiser PJ. Age-dependent changes in contraction and regional myocardial myosin heavy chain isoform expression in rats. *J Appl Physiol* 2004;97(1): 446-53.
11. Rundell VL, Manaves V, Martin AF, de Tombe PP. Impact of  $\beta$ -myosin heavy chain isoform expression on cross-bridge cycling kinetics. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288(2): H896-H903.

12. Hydock DS, Lien C-Y, 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.
13. Korte FS, Herron TJ, Rovetto MJ, McDonald KS. Power output is linearly related to MyHC content in rat skinned myocytes and isolated working hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289(2): H801-H12.
14. Ashrafi J, Roshan VD. Is short-term exercise a therapeutic tool for improvement of cardioprotection against DOX-induced cardiotoxicity? An experimental controlled protocol in rats. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13(8): 4025-30.
15. Ashrafi J, Roshan VD, Mahjoub S. Cardioprotective effects of aerobic regular exercise against doxorubicin-induced oxidative stress in rat. *Afr J Pharm Pharmacol* 2012;6(31): 2380-8.
16. Hydock DS, Lien C-Y, 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.
17. Behnke BJ, Ramsey MW, Stabley JN, Dominguez JM, Davis RT, McCullough DJ, et al. Effects of aging and exercise training on skeletal muscle blood flow and resistance artery morphology. *J Appl Physiol* 2012;113(11): 1699-708.
18. Garber JC, Barbee RW, Bielitzki JT, Clayton L, Donovan J, Hendriksen C, et al. Guide for the care and use of laboratory animals. The National Academic Press, Washington DC; 2011. P. 220.
19. Kim SY, Lee J. Exercise Training suppresses vascular fibrosis in aging obesity induced rats. *J Exerc Nutrition Biochem* 2014;18(2):175-80.
20. Shirinbayan V, Roshan VD, Mahjoub S. The Therapeutic Effect of Endurance Training on Adriamycin-induced Cardiac Stress in Rats. *Iran J Health Physical Activity* 2013;4(2): 8-17.
21. Tokarska-Schlattner M, Wallimann T, Schlattner U. Alterations in myocardial energy metabolism induced by the anti-cancer drug doxorubicin. *C R Biol* 2006;329(9): 657-68.
22. Krenz M, Robbins J. Impact of beta-myosin heavy chain expression on cardiac function during stress. *J Am Coll Cardiol* 2004;44(12): 2390-7.
23. Umanskaya A, Santulli G, Xie W, Andersson DC, Reiken SR, Marks AR. Genetically enhancing mitochondrial antioxidant activity improves muscle function in aging. *Proc Natl Acad Sci* 2014;111(42): 15250-5.
24. Gielen S, Schuler G, Adams V. Cardiovascular effects of exercise training molecular mechanisms. *Circulation* 2010;122(12): 1221-38.
25. Chicco AJ, Hydock DS, Schneider CM, Hayward R. Low-intensity exercise training during doxorubicin treatment protects against cardiotoxicity. *J Appl Physiol* 2006;100(2): 519-27.
26. Pushpalatha K, Nishanth K, Reddy K. Myocardial antioxidant status and oxidative stress after combined action of exercise training and ethanol in two different age groups of male albino rats. *Acta Biologica Hungarica* 2007;58(2): 173-85.
27. Ascensão A, Magalhães 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-H31.



## CARDIOPROTECTIVE EFFECT OF VOLUNTARY PHYSICAL ACTIVITY ON CHANGES OF DOXORUBICIN-INDUCED CARDIAC MYOSIN HEAVY CHAIN EXPRESSION IN AGING MODEL RATS

Ahmad Parsaeifar<sup>1</sup>, Valiollah Dabidi Roshan<sup>\*2</sup>, Zohreh Mazaheri<sup>3</sup>

Received: 17 Sep, 2016; Accepted: 13 Nov, 2016

### Abstract

**Background & Aims:** Despite confirmed effectiveness of forced exercise training in reducing doxorubicin-induced cardiotoxicity, the role of voluntary physical activity in reducing doxorubicin-induced cardiotoxicity, especially in the elderly, still has not been investigated properly. The aim of this study was to investigate the protective effect of cardiac protection caused by voluntary physical activity on myosin heavy chain gene (MyHC) expression changes induced by doxorubicin in the aging model rats.

**Materials & Methods:** In this experimental study, after induction of aging, 24 twelve-week old male rats with an average weight of 250±25g received 100 mg/kg D-galactose solution for 9 weeks through intraperitoneal injection. They were randomly divided into three groups: aging + saline (AS), aging + doxorubicin (AD), and aging + doxorubicin + voluntary physical activity (ADWR). Voluntary physical activity was carried out during the last 6 weeks of aging, on a running wheel.

In the last 15 days, 1 mg/kg doxorubicin and saline (cumulative dose of 15 mg/kg) was peritoneally injected to the rats receiving doxorubicin and saline. Forty eight hours after the last injection of doxorubicin, the left ventricle was isolated, and gene expression of cardiac myosin heavy chain was measured using Real time - PCR.

**Results:** Doxorubicin increased beta myosin heavy chain gene expression and decreased alpha-cardiac myosin heavy chain gene expression (MyHC) in the AD group. However, voluntary 6-week physical activity decreased doxorubicin-induced changes in MyHC gene expression in the ADWR group.

**Conclusion:** Voluntary physical activity is a tool effective in reducing doxorubicin-induced cardiotoxicity in the elderly.

**Keywords:** Doxorubicin, Aging, Cardiotoxicity, Myosin heavy chain, Voluntary physical activity

**Address:** Department of Sport Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

**Tel:** +981125232091

**Email:** v.dabidi@umz.ac.ir

SOURCE: URMIA MED J 2016; 26(10): 901 ISSN: 1027-3727

<sup>1</sup> Ph.D student of Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, Mazandaran University, Babolsar, Iran

<sup>2</sup> Professor of Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, Mazandaran University, Babolsar, Iran (Corresponding Author)

<sup>3</sup> Assistant Professor of Anatomical Sciences, Department of Anatomical Sciences, Medicine Faculty, Tarbiat Moddres University, Iran