



## تأثیر هم‌افزایی ورزش تناوبی شدید و تروگزروتین بر آسیب قلبی و عملکرد میتوکندری در

### سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین

ابوالقاسم تقوی‌هلق<sup>۱</sup>، حسین عابدنطنزی<sup>۲\*</sup>، رضا بدل‌زاده<sup>۳</sup>، فرشاد غزالیان<sup>۴</sup>

۱- دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی - گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی - واحد علوم و تحقیقات - دانشگاه آزاد اسلامی - تهران - ایران.

۲- استادیار فیزیولوژی ورزشی - گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی - واحد علوم و تحقیقات - دانشگاه آزاد اسلامی - تهران - ایران.

۳- استاد فیزیولوژی پزشکی - مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی و گروه فیزیولوژی - دانشگاه علوم پزشکی تبریز - تبریز - ایران.

۴- استادیار فیزیولوژی ورزشی - گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی - واحد علوم و تحقیقات - دانشگاه آزاد اسلامی - تهران - ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۱۰

#### چکیده

**مقدمه:** دوکسوروبیسین (DOX) داروی مؤثر در درمان انواع سرطان است که کاربرد آن به دلیل سمیت قلبی ناشی از دوز تجمعی به میزان زیادی محدود شده است. تروگزروتین (TRX) از فلاونوئیدروتین مشتق می‌شود و خواص فارماکولوژیکی دارد. هدف از تحقیق حاضر بررسی تأثیر هم‌افزایی تمرین HIIT و تروگزروتین در کاهش سمیت قلبی ناشی از DOX و شاخص‌های عملکرد میتوکندری در سلول‌های قلبی رت‌ها است.

**مواد و روش‌ها:** رت‌های ویستار نر به صورت تصادفی در پنج گروه (n=10) تقسیم شدند: ۱- Control - ۲- DOX - ۳- HIIT+DOX - ۴- TRX+DOX - ۵- HIIT+TRX+DOX. پس از آخرین تمرین HIIT، رت‌های تمرین کرده و گروه کنترل مربوطه تحت تزریق داخل صفاقی DOX با دوز ۲۰ mg/kg قرار گرفتند. میزان تغییرات CKMB، با روش اسپکتوفوتومتری و آزمون الایزا، ROS میتوکندری و پتانسیل غشاء میتوکندری با تعیین شدت رنگ‌های فلورسنت مربوطه اندازه‌گیری شد.

**نتایج:** تزریق DOX میزان CKMB سرم را در رت‌ها افزایش داد ( $P < 0/05$ ). تمرین HIIT و مصرف تروگزروتین، هر کدام به تنهایی، میزان CKMB سرم و ROS میتوکندری را کاهش داد ( $P < 0/05$ ) و تأثیر توأم آنها بیشتر از هر کدام به تنهایی بود ( $P < 0/01$ ). همچنین تزریق DOX باعث کاهش پتانسیل غشاء میتوکندری در رت‌ها شد ( $P < 0/01$ ). درحالی‌که اثر تمرین HIIT و نیز اثر مصرف تروگزروتین هر کدام به تنهایی در افزایش پتانسیل غشاء میتوکندری معنی‌دار نبود به کارگیری توأم آنها باعث افزایش معنی‌دار پتانسیل غشاء میتوکندری در رت‌ها شد ( $P < 0/05$ ).

**نتیجه‌گیری:** تأثیر توأم تمرین HIIT و تروگزروتین برای پیشگیری از سمیت قلبی ناشی از DOX و بهبود عملکرد میتوکندری در سلول‌های قلبی رت‌ها مؤثرتر از کاربرد هر یک از این راه‌کارها به تنهایی می‌باشد.

**واژه‌های کلیدی:** دوکسوروبیسین، تمرین تناوبی شدید، تروگزروتین، سمیت قلبی، عملکرد میتوکندری.

\*نویسنده مسئول: استادیار فیزیولوژی ورزشی - گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی - واحد علوم و تحقیقات - دانشگاه آزاد اسلامی - تهران، ایران. گروه فیزیولوژی ورزشی، تلفن:

۰۹۱۲۶۱۰۷۰۶۴، نامبر: ۰۹۱۲۶۱۰۷۰۶۴، Email: abednazari@gmail.com

**ارجاع:** تقوی‌هلق ابوالقاسم، عابدنطنزی حسین، بدل‌زاده رضا، غزالیان فرشاد. تأثیر هم‌افزایی ورزش تناوبی شدید و تروگزروتین بر آسیب قلبی و عملکرد میتوکندری در سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۳۹۹؛ ۱۵(۳): ۴۶-۵۳.

## مقدمه

دوکسوروبیسین (DOX: Doxorubicin)، متعلق به خانواده آنتراسیکلین و یکی از داروهای مؤثر در درمان انواع سرطان‌ها مثل سرطان سینه، تخمدان، غدد لنف و مغز استخوان است (۱). این دارو معمولاً به صورت تزریق وریدی استفاده می‌شود (۲) که با قرار گرفتن بین رشته‌های DNA سلول‌های سرطانی، سنتز ماکرو مولکول‌های بیشتر و پیشروی توپوایزومراز II را مهار می‌کند (۳). استفاده از دوکسوروبیسین به دلیل عوارض جانبی شدید مربوط به دوز تجمعی آن، به ویژه سمیت قلبی که منجر به اختلال عملکرد بطن چپ، کاردیومیوپاتی گشادشده و نارسایی قلبی می‌گردد محدود شده است (۴).

عوارض قلبی دوکسوروبیسین از طرق مختلفی مثل ایجاد تغییراتی در فرایندهای سلولی، آپوپتوز، اتوفاژی، ایجاد شرایط استرس اکسیداتیو و اختلال عملکرد میتوکندری به وجود می‌آید (۵). مطالعات اخیر نشان می‌دهد که سمیت ناشی از DOX باعث تکه‌تکه شدن (Fragmentation) میتوکندری می‌شود (۶) و معلوم شده است که تکه شدن میتوکندری، عملکرد سلولی و مرگ سلولی (آپوپتوز) را میانجیگری می‌کند (۷). تولید زیاد گونه‌های واکنشی اکسیژن (ROS: Reactive oxygen species) و اختلال عملکرد میتوکندری به عنوان مکانیسم‌های بیشتر پذیرفته شده سمیت قلبی ناشی از DOX پیشنهاد شده‌اند (۸). سطح تولید ROS ناشی از DOX در بافت قلب ده برابر بیشتر از سایر بافت‌ها مانند کبد، کلیه و طحال است که حساسیت بافت قلب را به این دارو نشان می‌دهد (۹). میتوکندری منبع اصلی تولید ROS در اندام‌های با متابولیسم بالا مانند قلب است افزایش تولید گونه‌های واکنشی اکسیژن به طور همزمان منجر به مهار سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود (۱۰). غلظت‌های پایین DOX باعث کاهش پتانسیل غشاء میتوکندری می‌شود که تقریباً پس از شش ساعت با آپوپتوز همراه بوده است (۱۱).

یکی از راهکارها و مداخلات درمانی به منظور کاهش عوارض جانبی DOX، استفاده از ورزش و فعالیت بدنی است (۱۲). تمرینات HIIT (High intensity interval training) که شامل دوره‌های تکراری تمرین شدید با دوره‌هایی از استراحت یا تمرین آهسته است (۱۳)، در سیستم قلبی-عروقی بیماران تأثیر مثبت دارد (۱۲). نشان داده شده است که HIIT در ایجاد سازگاری‌های قلبی عروقی در بیماران قلبی خفیف تا حاد، مؤثرتر از تمرینات استقامتی با شدت متوسط است و به نظر می‌رسد جایگزین مناسب و مؤثری برای توانبخشی بیماران مبتلا به HF و CAD است. همچنین ممکن است در بهبود پایداری به تمرینات ورزشی کمک کند (۱۴). جارت و همکاران (۲۰۱۶) بیان

کرده‌اند که HIIT قبل و در حین درمان با DOX می‌تواند از طریق افزایش مقادیر آنتی‌اکسیدانی در بافت قلبی از عوارض جانبی قلبی ناشی از DOX بکاهد (۱۵). ابراهیمی و همکاران (۲۰۱۸) نیز نشان دادند که ۸ هفته فعالیت ورزشی HIIT قبل از القای DOX می‌تواند از طریق مهار کاهش بیان PGC-1 $\alpha$  ناشی از القای DOX از سلول‌های قلب محافظت کند (۱۶).

بیومارکرهای آسیب قلبی سرم خون در پی درمان با DOX افزایش می‌یابد (۱۷). تشخیص اولیه سمیت قلبی ناشی از DOX می‌تواند روش پیشگیری مناسبی را ایجاد کند (۱۸). در مطالعه‌ای، شیرین بیان و راشن گزارش کردند که مصرف DOX منجر به افزایش سطح بیومارکرهای آسیب قلبی شامل LDH (lactate dehydrogenase) و CKMB (Cratin kinase) در سرم رت‌ها شد (۱۹). همچنین ابراهیمی و همکاران نتیجه گرفتند که تمرین HIIT از طریق کاهش بیومارکرهای آسیب قلبی در پلازما (CK-MB و LDH) از قلب در برابر سمیت قلبی ناشی از DOX محافظت می‌کند (۲۰).

تروگزروتین (ویتامین TRX'P4) (با فرمول شیمیایی C33H42O19) از فلاونوئید روتین مشتق می‌شود. این فلاونوئید عمدتاً از گیاه تلخ‌بیان ژاپنی (Japonica sophora) استخراج می‌گردد که در چای، قهوه و برخی میوه‌ها نیز یافت می‌شود (۲۱). تروگزروتین خواص فارماکولوژیکی متنوعی نظیر اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، محافظت‌کننده کبدی و آنتی‌ترومبوتیک دارد (۲۲). علاوه بر این، تروگزروتین مدت‌ها برای درمان بعضی بیماری‌های قلبی-عروقی استفاده شده است (۲۳).

در خصوص تأثیر ترکیبی ورزش HIIT با TRX به عنوان راهکاری مهم در تأثیرگذاری سریع‌تر در کاهش عوارض احتمالی DOX، در بافت‌های مختلف مطالعه‌ای صورت نگرفته و همچنین مکانیسم‌های تأثیرگذاری این روش ترکیبی نیز هنوز به طور کامل بررسی نشده است و اثراتی هم که از ورزش HIIT در مطالعات مختلف گزارش شده است گاهاً دارای تناقض می‌باشد. بنابراین هدف از انجام این پژوهش، بررسی تأثیر هم‌افزایی ورزش HIIT و تروگزروتین بر عملکرد میتوکندری و آسیب قلبی ناشی از دوکسوروبیسین در رت می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

در این طرح، ۵۰ سر رت که از حیوانکده مرکز تحقیقات دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تهیه شد و در دمای محیط کنترل شده  $21 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد، در چرخه ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، با دسترسی آزاد به غذا و آب در حیوان‌خانه نگهداری شد. همه حیوانات به مدت یک هفته با شرایط زندگی در حیوان‌خانه و یک هفته بعدی با نحوه دودیدن روی نوارگردان آشنا شدند. موش‌ها در پنج گروه

در گروه‌های دریافت‌کننده TRX، تروگزروتین با دوز ۱۵۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن حیوان و از طریق گاوژ خوراکی، یک بار در روز به مدت دو ماه تجویز شد (۲۵). در گروه‌های دریافت‌کننده DOX، شش ساعت پس از آخرین جلسه فعالیت ورزشی HIIT و یا تجویز تروگزروتین، دوکسوروبیسین هیدروکلراید (با دوز ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن، به صورت داخل صفاقی) به موش‌های صحرایی تزریق شد (۲۷). ۷۲ ساعت بعد از تزریق DOX، حیوانات با تزریق داخل صفاقی کتامین (۶۰ mg/kg) و زایلازین (۱۰ mg/kg) بیهوش شدند. سپس به طور مستقیم از بطن چپ قلب حیوانات خون‌گیری انجام و بلافاصله توسط دستگاه ساتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه ساتریفیوژ شد. پس از آن، سرم از پلاسما جدا گردید و برای اندازه‌گیری CK-MB در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد فریز شد. سطوح CKMB که جزو نشانگرهای آسیب سلولی قلبی هست (۲۸)، به کمک اسپکتروفتومتری و آزمون الایزا با کیت‌های موجود (شرکت Roche) با توجه به دستورالعمل‌های شرکت تولیدکننده نسبت به پروتئین توتال اندازه‌گیری شد. جذب نوری برای آنزیم‌ها در ۳۴۰ nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتر تشخیص داده می‌شود. نتایج در U/L گزارش شدند (۲۹). قابل ذکر است که پس از خون‌گیری سریع از حیوانات بیهوش شده، آنها کشتار شده و قلب به سرعت برداشته شد و بافت بطن چپ از آن جدا گردید. بلافاصله، تمام نمونه‌های بافتی بطن چپ به محلول مهارکننده RNase منتقل شد (ساخت شرکت Qiagen) و تا زمان استخراج RNA در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. گروه‌های بدون درمان DOX و تروگزروتین نیز مقدار مشابهی از سالیین دریافت کردند (۳۰).

برای تعیین عملکرد میتوکندری قلبی از اندازه‌گیری پتانسیل غشاء میتوکندری و تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) میتوکندریایی از ناحیه نکروره بطن چپ استفاده شد. پتانسیل غشاء میتوکندری با تعیین شدت رنگ‌های فلورسنت به‌عنوان یک شاخص باز شدن کانال MPTP تعیین می‌شود. با استفاده از دستورالعمل کیت (JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit)، میتوکندری‌های ایزوله‌شده قلب در رنگ tetra ethyl JC-1 (۵ μM benzimidazolyl carbocyanine iodide) در دمای ۳۷°C به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. فرم مونومر رنگ JC-1 به‌عنوان یک کاتیون در ماتریکس میتوکندری (فلورسنت سبز) در ۴۸۰ nm برانگیخته (excited) و در ۵۹۰ nm عبور (emission) مشخص می‌شود و فرم مرکب رنگ JC-1 (ترکیب با آنیون‌های ماتریکس) (فلورسنت قرمز) در ۴۸۰ nm برانگیخته و میزان عبور در ۵۳۰ nm با استفاده از fluorescent microplate reader مشخص

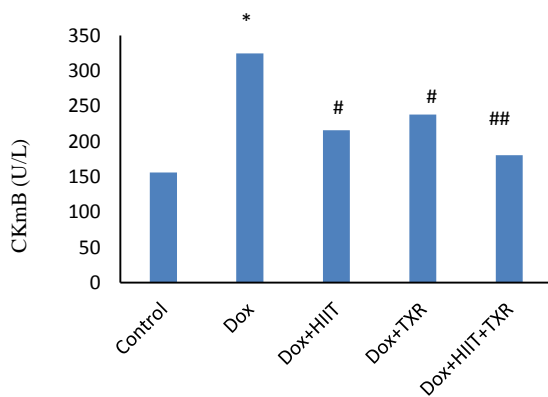
(n=۱۰) برای آزمایشات مربوطه به صورت تصادفی گروه‌بندی شدند. گروه Control (بی‌تحرک-سالیین)، گروه DOX، گروه (HIIT+DOX)، گروه (DOX+TRX) و گروه (HIIT+TRX+DOX). تجویز دوکسوروبیسین پس از آخرین تمرین به رت‌ها انجام شد. لازم به ذکر است که تمام روش‌های حیوانی در کمیته اخلاق تحقیقاتی پژوهشگاه علوم ورزشی ایران مورد بررسی قرار گرفته و براساس مطابقت با معیارهای اخلاقی وزارت علوم، تحقیقات و فن‌آوری، با کد IR.SSRI.REC.1398.669 مورد تأیید واقع شده است.

در ابتدا موش‌های صحرایی نر مربوط به گروه‌های فعالیت ورزشی به‌منظور آشنا شدن با فعالیت ورزشی به مدت یک هفته در نوارگردان حیوانی با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه تمرین کردند. سپس در ابتدای هر دو هفته میزان  $VO_2max$  حیوانات مورد ارزیابی قرار گرفت؛ با توجه به دسترسی نداشتن به ابزار مستقیم مانند دستگاه تجزیه و تحلیل گازهای تنفسی با توجه به پژوهش‌های اخیر (۲۴) و (۲۵)، پروتکل غیرمستقیمی با دقت زیاد در ابتدا پابلوت و استفاده شد، به طوری که بعد از ۲۰-۱۰ دقیقه گرم کردن با شدت ۴۰ تا ۵۰٪  $VO_2max$  سرعت نوارگردان هر دو دقیقه یک بار به میزان ۰/۰۳ متربرثانی (۱/۸ تا ۲ متربر دقیقه) افزایش داده می‌شد تا حیوانات دیگر قادر به دویدن نباشند. ملاک رسیدن به  $VO_2max$  عدم توانایی رت‌ها در ادامه دادن پروتکل تمرینی با افزایش سرعت بود. سرعت  $VO_2max$  ثبت شده سرعتی است که در آن  $VO_2$  به فلات برسد. رسیدن به فلات با غلظت لاکتات بیشتر از ۶ میلی‌مول در لیتر و نسبت تنفسی  $VO_2/VCO_2$ ، ۱/۰۵ معادل است. پژوهش‌ها نشان می‌دهند ارتباط قوی بین سرعت نوارگردان و  $VO_2max$  رت‌ها وجود دارد (۰/۹۸ -  $r=0/۹۴$ ،  $P<0/۰۰۰۵$ ). از این‌رو می‌توان با توجه به سرعت دویدن مقدار  $VO_2max$  رت‌ها را به دست آورد. بالاترین میزان  $VO_2max$  برآورد شده با این روش در شیب ۲۵ درجه نوارگردان حیوانی است (۲۶).

تمرینات ورزشی بر اساس تحقیقات قبلی بر روی تریدمیل تنظیم شده است (۲۰ و ۲۴). بدین صورت که رت‌ها در نوارگردان برای ۵ روز در هفته به مدت ۶۰ دقیقه و برای ۸ هفته تمرین کردند که شامل سه مرحله است (جدول ۱).

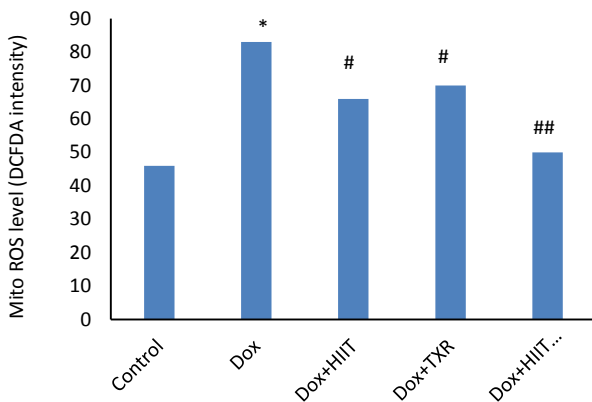
جدول ۱- پروتکل تمرینی HIIT

۱	۶ دقیقه گرم کردن با شدت ۵۰ الی ۵۵ درصد $VO_2max$
۲	۷ ست بی در بی ۴ دقیقه با ۸۰ الی ۹۰ درصد $VO_2max$ که با دوره‌های ۳ دقیقه‌ای با شدت ۶۵ الی ۷۵ درصد $VO_2max$ از هم جدا شده‌اند
۳	۵ دقیقه سرد کردن با شدت ۵۰ الی ۵۵ درصد $VO_2max$ در گروه‌های دریافت‌کننده DOX، دوکسوروبیسین هیدروکلراید به صورت داخل صفاقی به موش‌های صحرایی کنترل شده با HIIT یا هم زمان با دوز ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم در پایان دوره تمرین HIIT تزریق شد.



شکل ۱- سطح آنزیم CKMB در قلب رت‌ها در گروه‌های مختلف

\*: اختلاف معنی‌دار در سطح  $P < 0.05$  نسبت به گروه کنترل، # اختلاف معنی‌دار در سطح  $P < 0.05$  نسبت به گروه DOX، ### اختلاف معنی‌دار در سطح  $P < 0.01$  نسبت به گروه DOX



شکل ۲- میزان تولید ROS در قلب رت‌ها در گروه‌های مختلف

\*: اختلاف معنی‌دار در سطح  $P < 0.05$  نسبت به گروه کنترل، # اختلاف معنی‌دار در سطح  $P < 0.05$  نسبت به گروه DOX، ## اختلاف معنی‌دار در سطح  $P < 0.01$  نسبت به گروه DOX

نتایج این تحقیق در خصوص اختلاف پتانسیل غشاء میتوکندری، که شاخص دیگر عملکرد میتوکندری می‌باشد در شکل ۳ نشان داده شده است. به طوری که مصرف DOX باعث کاهش معنی‌دار پتانسیل غشاء میتوکندری در گروه DOX نسبت به گروه کنترل شده است ( $P < 0.01$ ). اما تمرین HIIT قبل از مصرف DOX منجر به افزایش پتانسیل غشاء میتوکندری نسبت به گروه DOX می‌شود ولی این افزایش معنی‌دار نیست و نیز مصرف تروگزروتین نیز قبل از مصرف DOX منجر به افزایش غیرمعنی‌دار در پتانسیل غشاء میتوکندری نسبت به گروه DOX شده است. قابل توجه این است که مصرف تروگزروتین توأم با تمرین HIIT قبل از مصرف DOX منجر به افزایش معنی‌دار پتانسیل غشاء میتوکندری نسبت به گروه DOX شده است ( $P < 0.05$ ).

می‌گردد. میزان کاهش نسبت شدت فلورسنت قرمز به سبز بیانگر میزان دیپولاریزاسیون غشای میتوکندری قلبی است (۳۱).

برای اندازه‌گیری تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)، میتوکندری‌های ایزوله قلب در رنگ دی‌کلروفلوروسین‌دی‌استات (DCFH-DA) با غلظت  $2 \mu\text{M}$  در دمای  $37^\circ\text{C}$  به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. رنگ در طول موج  $485 \text{nm}$  برانگیخته شده و میزان عبور یا پرتو نور در  $530 \text{nm}$  با استفاده از fluorescent microplate reader مشخص می‌گردد. افزایش در شدت فلوروسنت بیانگر افزایش در تولید ROS میتوکندریایی است (۳۱).

برای تجزیه و تحلیل داده‌های آماری به دست آمده از مطالعه از روش‌های آماری توصیفی (میانگین  $\pm$  SEM) و جهت مقایسه تغییرات شاخص‌ها در بین گروه‌ها از تحلیل واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری با نرم‌افزار IBM SPSS انجام شد. از آزمون شاپیروویلیک برای بررسی طبیعی بودن داده‌ها استفاده شد. سپس برای تعیین هرگونه تفاوت بین گروه‌ها، آزمون تعقیبی توکی استفاده گردید ( $\alpha < 0.05$ ). برای تمامی روابط P محاسبه شده و ( $P < 0.05$ ) معنی‌دار تلقی شد.

## نتایج

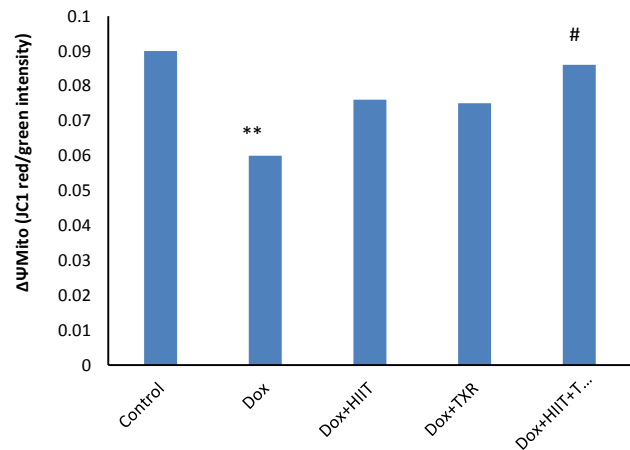
برطبق نتایج به دست آمده از این تحقیق، همان‌گونه که در شکل ۱ نشان داده شده است، مصرف DOX باعث افزایش معنی‌دار سطح آنزیم CKMB در گروه DOX نسبت به گروه کنترل شده است ( $P < 0.05$ ). اما تمرین HIIT قبل از مصرف DOX منجر به کاهش معنی‌دار در سطح آنزیم CKMB نسبت به گروه DOX شده است ( $P < 0.05$ ). مصرف تروگزروتین نیز قبل از مصرف DOX منجر به کاهش معنی‌دار در سطح آنزیم CKMB نسبت به گروه DOX شده است ( $P < 0.05$ ). مصرف تروگزروتین توأم با تمرین HIIT نیز قبل از مصرف DOX منجر به کاهش معنی‌دار در سطح آنزیم CKMB نسبت به گروه DOX شده است ( $P < 0.01$ ).

همچنین نتایج این تحقیق طبق شکل ۲ نشان می‌دهد مصرف DOX باعث افزایش معنی‌دار تولید ROS نسبت به گروه کنترل شده است ( $P < 0.05$ ). اما تمرین HIIT قبل از مصرف DOX منجر به کاهش معنی‌دار در تولید ROS نسبت به گروه DOX شده است ( $P < 0.05$ ). مصرف تروگزروتین نیز قبل از مصرف DOX منجر به کاهش معنی‌دار در تولید ROS نسبت به گروه DOX شده است ( $P < 0.05$ ). مصرف تروگزروتین توأم با تمرین HIIT نیز قبل از مصرف DOX منجر به کاهش معنی‌دار در تولید ROS نسبت به گروه DOX شده است ( $P < 0.01$ ).

DOX است (۳۲). غلظت‌های پایین DOX باعث کاهش پتانسیل غشاء میتوکندری می‌شود که تقریباً پس از شش ساعت با آپوپتوز همراه بوده است (۳۳). افزایش تولید ROS توسط DOX، سازمان آنتی‌اکسیدانی را به‌خطر می‌اندازد و به لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک آسیب می‌زند (۳۳). ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بهبودیافته سلول‌های عضله قلبی ممکن است از آسیب ناشی از ROS مرتبط با درمان دوکسوروبیسین جلوگیری کند (۳۴). در مقایسه با حیوانات تمرین نکرده، جوندگانی که تمرین هوازی انجام داده‌اند سطوح بالاتری از فعالیت آنتی‌اکسیدانی را دارا هستند و سطوح مارکرهای استرسی اکسیداتیو ناشی از در معرض دوکسوروبیسین بودن کاهش می‌یابد (۲۹ و ۳۵). ابراهیمی و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که فعالیت ورزشی HIIT قبل از القای دوکسوروبیسین منجر به مهار کاهش بیان PGC-1 $\alpha$  در سلول‌های قلبی می‌شود (۱۶). نتیجه تحقیق ما، به‌طور همسو با این تحقیقات نشان داد که تمرین HIIT به مدت هشت هفته قبل از مصرف دوکسوروبیسین با کاهش ROS میتوکندری و افزایش پتانسیل غشاء میتوکندری باعث بهبود عملکرد میتوکندری در سلول‌های قلبی رت‌ها گردید.

تروگزروتین مدت‌ها برای درمان بعضی بیماری‌های قلبی-عروقی استفاده شده است (۲۳). حیدرزاده و همکاران (۲۰۱۴)، در مطالعه‌ای تأثیر تروگزروتین را بر روی مارکر آسیب بافتی (کراتین کیناز)، بررسی کردند. نتایج حاکی از اثر محافظتی تروگزروتین بوده است. این تأثیر محافظتی ممکن است به خاصیت آنتی‌اکسیدانی تروگزروتین و نیز توانایی این بیوفلاونوئید در پاکسازی و مهار تولید رادیکال‌های آزاد نسبت داده شود (۳۶). بدل‌زاده و همکاران (۲۰۱۵)، در بررسی تأثیر مصرف تروگزروتین بر روی آسیب‌های بافت آئورت در رت‌های دیابتی نتیجه گرفتند که درمان با تروگزروتین آسیب‌های پاتولوژیک آئورت ناشی از دیابت را کاهش داد و این اثر تروگزروتین با افزایش سطوح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی (محتوی مالون‌دی‌آلدئید) در بافت آئورت رت‌های دیابتی همراه بوده است (۳۷). نتایج تحقیق ما همسو با این تحقیقات، کاهش آسیب قلبی ناشی از دوکسوروبیسین و کاهش ROS میتوکندری و افزایش پتانسیل غشاء میتوکندری را با مصرف تروگزروتین نشان داد.

در این مطالعه، ترکیب رژیم ورزشی HIIT و تجویز تروگزروتین به‌عنوان یک پروتکل پیشگیری برای مقابله با سمیت قلبی DOX استفاده شد. در بالین، بیمارانی که در مراحل اولیه تشخیص سرطان هستند و هنوز می‌توانند این نوع ورزش را قبل از شروع درمان با DOX تحمل کنند، می‌توانند از تأثیرات مثبت HIIT به همراه تروگزروتین بهره‌مند شوند. با این حال، هنوز مشخص نیست که آیا تجویز همزمان HIIT یا تروگزروتین در طی دوره‌های درمان با DOX



شکل ۳- میزان اختلاف پتانسیل غشاء میتوکندری‌ها در قلب رت‌ها در گروه‌های مختلف

\*اختلاف معنی‌دار در سطح  $P < 0.01$  نسبت به گروه کنترل، # اختلاف معنی‌دار در سطح  $P < 0.05$  نسبت به گروه DOX

### بحث

در این مطالعه ما به این نتیجه رسیدیم که تزریق دوکسوروبیسین در رت‌ها باعث افزایش سطح CKMB سرم، افزایش تولید ROS و کاهش پتانسیل غشاء میتوکندری در سلول‌های قلبی می‌گردد با وجود این، نشان داده شد که انجام تمرین HIIT و نیز مصرف تروگزروتین، دو ماه قبل از تزریق DOX، مانع از افزایش سطح CKMB سرم و آسیب قلبی شده و نیز مانع افزایش ROS میتوکندری و کاهش پتانسیل غشاء میتوکندری شد و در نتیجه از اختلال عملکرد میتوکندری در سلول‌های بطن چپ رت‌ها پیشگیری گردید. و مهمتر اینکه تأثیر توأم تمرین HIIT و تروگزروتین بیشتر از تأثیر هر یک از آنها به‌تنهایی بود.

نتایج این تحقیق با تحقیقاتی که گزارش کرده‌اند مصرف DOX منجر به سمیت قلبی از طریق افزایش بیومارکرهای آسیب قلبی در رت‌ها می‌شود همسو می‌باشد (۲۲، ۲۶ و ۲۸). جارت و همکاران (۲۰۱۶) بیان کرده‌اند که HIIT قبل و در حین درمان با DOX می‌تواند از طریق افزایش مقادیر آنتی‌اکسیدانی در بافت قلبی از عوارض جانبی قلبی ناشی از DOX بکاهد (۱۵). اخیراً ابراهیمی و همکاران (۲۰۱۹) به این نتیجه رسیدند که تمرین HIIT از طریق کاهش بیومارکرهای آسیب قلبی در پلاسما (LDH و CKMB) از قلب در برابر سمیت قلبی ناشی از DOX محافظت می‌کند (۲۰). این یافته‌ها با نتایج ما که هشت هفته تمرین HIIT قبل از درمان با DOX باعث کاهش سطوح CKMB گردید همسو می‌باشد.

میتوکندری، ۲۵ تا ۳۵ درصد حجم سلول ماهیچه قلبی را شامل می‌شود، اعتقاد بر این است که جزء هدف‌های اولیه در سمیت قلبی

- mitochondrial fission–fusion proteins. *FEBS journal* 2011;278:941-54. doi: 10.1111/2Fj.1742-4658.2011.08010.x
8. Swain SM, Whaley FS, Ewer MS. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: A retrospective analysis of three trials. *Cancer* 2003; 97:2869-79. doi: 10.1002/cncr.11407
  9. Wallace KB. Doxorubicin-induced cardiac mitochondriopathy. *Pharmacol Toxicol* 2003;93:105-15. doi: 10.1034/j.1600-0773.2003.930301.x
  10. Elwia S, Elnoury H, Muhammad M. Forskolin Effect on FOXO1 Expression and Relationship of FOXO1 Activator to Oxidative Stress: From Molecular to Therapeutic Strategy. *Biomarkers Journal* ISSN 2018;4:2472-1646.
  11. Green PS, Leeuwenburgh C. Mitochondrial dysfunction is an early indicator of doxorubicin-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2002;1588:94-101. doi: 10.1016/s0925-4439(02)00144-8
  12. Kavazis AN, Smuder AJ, Powers SK. Effects of short-term endurance exercise training on acute doxorubicin-induced FoxO transcription in cardiac and skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2014;117:223-30. doi: 10.1152/jappphysiol.00210.2014
  13. Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM, Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest* 2000; Oct;106:847-56. doi: 10.1172/JCI10268
  14. Guiraud T, Nigam A, Gremeaux V, Meyer P, Juneau M, Bosquet L. High-intensity interval training in cardiac rehabilitation. *Sports medicine* 2012;42:587-605. doi: 10.2165/11631910-000000000-00000
  15. Jarrett CL, D'Lugos AC, Mahmood TN, Gonzales RJ, Hale TM, Carroll CC, et al. Effect of high intensity exercise preconditioning and training on antioxidant enzymes in cardiomyocytes during doxorubicin treatment. *FASEB J* 2016;30:1b601. doi: 10.1096/fasebj.30.1\_supplement.1b601
  16. Ebrahimi Kh, Choobineh S, Badalzadeh R, Soori R. Protective effect of aerobic high-intensity interval training against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Journal of Knowledge and Health* 2018;13.[Persian].doi: 10.22100/jkh.v13i3.2040
  17. Zhou S, Starkov A, Froberg MK, Leino RL, Wallace KB. Cumulative and irreversible cardiac mitochondrial dysfunction induced by doxorubicin. *CANCER RES* 2001;61:771-7.
  18. Whiteside H, Nagabandi A, Jyothidasan A, Brown K, Thornton J. Acute anthracycline induced cardiotoxicity: A rare and reversible cause of acute systolic heart failure. *Journal of the American College of Cardiology* 2018;71:A2356. doi:10.1016/50735-1097(18)32897-3.
  19. Shirinbayan V and Roshan VD. Pretreatment effect of running exercise on HSP70 and DOX-induced cardiotoxicity. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13:5849-5855. doi:10.7314/apjcp.2012.13.11.5849
  20. Ebrahimi KH, Choobineh S, Soori R, Badalzadeh R. Cardioprotective effect of high-intensity aerobic interval training against adriamycin-induced cardiac toxicity in rats. *J Clin Res Paramed Sci* 2019;8:e83850. doi: 10.5812/jcrps.83850.
  21. Geetha R, Yogalakshmi B, Sreeja S, Bhavani K, Anuradha CV. Troxerutin suppresses lipid abnormalities in the heart of high-fat-high-fructose diet-fed mice. *Mol Cell Biochem* 2014;387:123-34.
  22. Subastri A, Ramamurthy CH, Suyavaran A, Mareeswaran R, Lokeshwar Rao P, Harikrishna M, et al. Spectroscopic and molecular docking studies on the interaction of troxerutin with DNA. *Int J Biol Macromol* 2015;78:122-9. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.03.036
  23. Gohel MS, Davies AH. Pharmacological agents in the treatment of venous disease: an update of the available evidence. *Current Vascular Pharmacology* 2009;7:303-308. doi: 10.2174/157016109788340758
  24. Haram PM, Kemi OJ, Lee SJ, Bendheim M, Al-Share QY, Waldum HL, et al. Aerobic interval training vs. continuous moderate exercise in the metabolic syndrome of rats artificially selected for low aerobic capacity. *Cardiovascular research* 2009;81:723-32. doi: 10.1093/cvr/cvn332

نیز در بیماران سرطانی دریافت‌کننده DOX اثر محافظتی دارد. بسیاری از مطالعات بالینی گزارش داده‌اند که ورزش منظم هوایی که قبل، حین یا بعد از درمان با DOX انجام شده است، توانسته است سمیت قلبی DOX را کاهش دهد و بنابراین، به‌نظر می‌رسد با بهینه‌سازی شدت، زمان و مدت زمان رژیم ورزشی HIIT برای هر بیمار، قابلیت ترجمه‌پذیری تجویز همزمان آن با تروگزروتین در برنامه درمان گروه خاصی از بیماران قابل دستیابی است. مطالعات تکمیلی می‌تواند برای نتیجه‌گیری بهتر در این زمینه مفید باشد.

نتایج این تحقیق نشان داد تأثیر توأم تمرین HIIT و تروگزروتین در پیشگیری از سمیت قلبی و بهبود عملکرد میتوکندری در سلول‌های بطن چپ رت‌ها بیشتر از تأثیر هر یک از آنها به تنهایی بود. بنابراین ورزش HIIT می‌تواند به‌عنوان یک روش پیش‌درمانی غیردارویی مناسب در کاهش سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسینی باشد ولی به‌نظر می‌رسد که تأثیر توأم ورزش HIIT و تروگزروتین باعث کاهش بیشتر سمیت قلبی و افزایش بهبود عملکرد میتوکندری‌های قلبی در رت‌ها می‌شود.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل قسمتی از رساله دکتری در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران است. نویسندگان این مقاله نهایت تشکر و قدردانی خود را از زحمات کارکنان مرکز تحقیقات دارویی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز جهت کمک در انجام آزمایشات و سنجش‌های این تحقیق ابراز می‌دارند.

### References

1. Dolinsky VW, Rogan KJ, Sung MM, Zordoky BN, Haykowsky MJ, Young ME, et al. Both aerobic exercise and resveratrol supplementation attenuate doxorubicin-induced cardiac injury in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013;305:E243-253. doi: 10.1152/ajpendo.00044.2013
2. Ahmet I, Sawa Y, Iwata K, Matsuda H. Gene transfection of hepatocyte growth factor attenuates cardiac remodeling in the canine heart: A novel gene therapy for cardiomyopathy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;124:957-63. doi: 10.1067/mtc.2002.126655
3. Chatterjee K, Zhang J, Honbo N, Karliner JS. Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology* 2010;115:155-62. doi: 10.1159/2F000265166
4. Koleini N and Kardami E. Autophagy and mitophagy in the context of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Oncotarget* 2017;8:46663-46680. doi: 10.18632/oncotarget.16944
5. Singal P, Kumar D, Danelisen I, Iliskovic N. Adriamycin-induced heart failure: mechanisms and modulation. *Molecular and cellular biochemistry* 2000;207:77-86. doi: 10.1023/a:1007094214460
6. Parra V, Eisner V, Chiong M, Criollo A, Moraga F, Garcia A, Hartel S, Jaimovich E, Zorzano A, Hidalgo C and Lavandero S. Changes in mitochondrial dynamics during ceramide- induced cardiomyocyte early apoptosis. *Cardiovasc Res* 2008;77:387-397. doi: 10.1093/cvr/cvm029
7. Wu S, Zhou F, Zhang Z, Xing D. Mitochondrial oxidative stress causes mitochondrial fragmentation via differential modulation of

25. Babri S, Amani M, Mohaddes G, Alihemmati A, Ebrahimi H. Protective effects of troxerutin on  $\beta$ -amyloid (1-42)-induced impairments of spatial learning and memory in rats. *Neurophy* 2012;44:387-93. doi: 10.22038/IJBMS.2018.28170.6901
26. Hoydal MA, Wisloff U, Kemi OJ, Ellingsen O. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: Practical implications for exercise training. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2007;14:753-60. doi: 10.1097/HJR.0b013e3281eacef1
27. Ascensão A, Magalhães J, Soares JM, Ferreira R, Neuparth MJ, Marques F, Duarte JA. Moderate endurance training prevents doxorubicin-induced in vivo mitochondriopathy and reduces the development of cardiac apoptosis. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2005;289:722-731. doi: 10.1152/ajpheart.01249.2004
28. Kemp M, Donovan J, Higham H, Hooper J. Biochemical markers of myocardial injury. *British Journal of Anaesthesia* 2004;93:63-73. doi: 10.1093/bja/ae148
29. Badalzadeh R, Azimi A, Alihemmati A, Yousefi B. Chronic type-I diabetes could not impede the anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of combined postconditioning with ischemia and cyclosporine A in myocardial reperfusion injury. *J Physiol Biochem* 2017;73:111-20. doi: 10.1007/s13105-016-0530-4
30. Asadi M, Shanehbandi D, Mohammadpour H, Hashemzadeh S, Sepehri B. Expression Level of miR-34a in Tumor Tissue from Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Journal of gastrointestinal cancer* 2018;1-4. doi:10.1007/s12029-018-0060-0
31. Bayrami M, Alihemmati A, Karimi P, Javadi A, Keyhanmanesh R, Mohammadi Zadi-Heydarabad M, et al. Combination of Vildagliptin and Ischemic Postconditioning in Diabetic Hearts as a Working Strategy to Reduce Myocardial Reperfusion Injury by Restoring Mitochondrial Function and Autophagic Activity. *Adv Pharm Bull* 2018;8:319-29. doi: 10.15171/apb.2018.037
32. Félix DNM. Effects of voluntary physical activity and endurance training on cardiac mitochondrial function of rats sub-chronically treated with doxorubicin [dissertation]. University of Porto;2013.
33. Marques-Alexio, I. Chronic exercise mitigates Doxorubicin-induced cardiac and brain mitochondrial activity, oxidative stress, apoptic signaling, mitochondrial dynamics and quality control. Tese de Doutoreto em Atividade Fisica e Saude. Centro de investigacao em Atividade Fisica, Saude e Lazer. Faculdade de Desporto. Universidade do porto 2014.
34. Ascensao A, Ferreira PJ Oliveira and Magalhaes J. Effects of endurance training and acute Doxorubicin treatment on rat heart mitochondrial alterations induced by in vitro anoxia-reoxygenation. *Cardiovasc Toxicol* 2006;6:159-72. doi: 10.1385/ct:6:3:159
35. Marques-Aleixo I, Santos-Alves E, Mariani D, Rizo-Roca D, Padrão AI, RochaRodrigues S, et al. Physical exercise prior and during treatment reduces subchronic doxorubicin-induced mitochondrial toxicity and oxidative stress. *Mitochondrion* 2015;20:22-33. doi: 10.1016/j.mito.2014.10.008
36. Heidarzadeh F, Badalzadeh R and Hatami H. The effect of troxerutin on lipid peroxidation and tissue injury induced by myocardial ischemia reperfusion injury in diabetic rat. *Razi Journal of Medical Sciences* 2014;21:37-45.[Persian].
37. Badalzadeh R, Layeghzadeh N, Alihemmati A, Mohammadi M. Beneficial Effect of Troxerutin on Diabetes-Induced Vascular Damages in Rat Aorta: Histopathological Alterations and Antioxidation Mechanism. *Int J Endocrinol Metab* 2015;13:e25969. doi: 10.5812/ijem.25969



## The Synergistic Effect of High-Intensity Interval Training and Troxerutin on Heart Injury and Mitochondrial Function in Doxorubicin-Induced Cardiac Toxicity

Aboalghasem Taghavi Holagh (Ph.D. Student)<sup>1</sup>, Hossein Abed Natanzi (Ph.D.)<sup>2\*</sup>, Reza Badalzadeh (Ph.D.)<sup>3</sup>, Farshad Ghazalian (Ph.D.)<sup>4</sup>

1- Dept. of Physical Education and Sports Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2- Dept. of Physical Education and Sports Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

3- Molecular Medicine Research Center, Dept. of Physiology, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

4- Dept. of Physical Education and Sports Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Received: 17 September 2020, Accepted: 31 October 2020

### Abstract:

**Introduction:** Doxorubicin (DOX) is an effective drug in the treatment of various cancers whose usage has been limited due to the cardiac toxicity. Troxerutin (TRX) is derived from rutin flavonoids and has multiplex pharmacological properties. The aim of the present study was to investigate the combination effect of high-intensity interval training (HIIT) and troxerutin on DOX-induced cardiac toxicity and indices of mitochondrial function in rat hearts.

**Methods:** Male Wistar rats were randomly divided into five groups ( $n = 10$ ): 1) Control, 2) DOX, 3) HIIT + DOX, 4) TRX + DOX, and 5) HIIT + TRX + DOX. After the last session of HIIT, the trained and time-matched control rats were injected with DOX (20 mg/kg, ip). The Creatine kinase (CKMB) changes was measured by spectrophotometry and ELISA. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial membrane potential were measured by determining the intensity of relevant fluorescent dyes.

**Results:** DOX injection increased serum CKMB in rats in comparison to control group ( $P < 0.05$ ). HIIT exercise and troxerutin, alone or in combination, reduced the serum CKMB and mitochondrial ROS levels ( $P < 0.05$ ) and their combined effect was greater than those of individual treatments ( $P < 0.01$ ). DOX injection reduced the mitochondrial membrane potential as compared with control group ( $P < 0.01$ ). While the effect of HIIT training or troxerutin alone were not significant on the mitochondrial membrane potential, their combined application significantly increased the mitochondrial membrane potential compared with DOX group ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** The combined effect of HIIT exercise and troxerutin is a promising strategy to prevent the DOX-induced cardiac toxicity and improve mitochondrial function in rat heart.

**Keywords:** Doxorubicin, High-intensity interval training, Troxerutin, Cardiac toxicity, Mitochondrial function.

Conflict of Interest: No

\*Corresponding author: H. Abed Natanzi, Email: abednazari@gmail.com

**Citation:** Taghavi Holagh A, Abed Natanzi H, Badalzadeh R, Ghazalian F. The synergistic effect of high-intensity interval training and troxerutin on heart injury and mitochondrial function in doxorubicin-induced cardiac toxicity. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2020;15(3):46-53.