Original Article

Effect of 12 Weeks of Treadmill Aerobic Training on Cytochrome c and Caspase-9 gene Expression in Cardiac Muscle of Male Rats

Nasrin Javid Tabrizi[1], Jabbar Bashiri[1], Mohammad Narimani Rad[2]*

[1]*Department of Physical Education & Sport Sciences, Faculty of Humanities & Education, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.*

[2]*Department of Physiology, Ilkhchi Branch, Islamic Azad University, Ilkhchi, Iran.*

[*]***Corresponding Author:***
Jabbar Bashiri, Department of Physical Education & Sport Sciences, Faculty of Humanities & Education, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

Email:
bashiri.jabbar@gmail.com

Received: 27 May, 2016

Accepted: 27 July, 2016

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 20:33 IRDT on Friday April 20th 2018

Abstract

***Background and Objectives*:** Apoptosis plays an important role in the development of cardiovascular diseases, especially heart failure. Some evidences suggest that exercise training may alter apoptosis-related signaling in somatic tissues such as the myocardium. The purpose of the present study was to determine the effect of 12 weeks of treadmill aerobic training on cytochrome c and caspase-9 gene expression in cardiac muscle of male rats.

***Methods*:** This study was conducted as a two-group experimental design project (animal model) on 16 3-month-old male rats. Animals were randomly divided into two homogeneous groups of aerobic training and control (8 animals each). Animals of the training group underwent an aerobic training program for 12 weeks (75-80% VO_{2max}). Forty-eight hours after the last training session, their hearts were extracted and cytochrome c and caspase-9 genes, were evaluated by RT-PCR. Data were analyzed using independent t-test at the significance level of $p<0.05$.

***Results*:** Cytochrome c gene expression in the experimental group was significantly higher than the control group (140.62%, $p<0.05$). The expression of caspase-9 gene, was also significantly higher in the experimental group compared to the control group (333.92%, $p<0.05$).

***Conclusion*:** Overall, it seems that 2-weeks of aerobic training on treadmill has a significant effect on the increased the expression of key genes of the cardiac mitochondrial apoptosis pathway. However, the underlying mechanisms of these effects are unclear and require further researches.

***Keywords*:** Exercise; Myocardium; Apoptosis.

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره یازدهم، شماره ششم، شهریور ۹۶
صفحه ۱ الی ۹

مقاله پژوهشی
(Original Article)

تأثیر ۱۲ هفته تمرین هوازی روی نوارگردان بر بیان ژن‌های سیتوکروم c و کاسپاز-۹ عضله قلبی موش‌های صحرایی نر

نسرین جاوید تبریزی[۱]، جبار بشیری[۱*]، محمد نریمانی‌راد[۲]

[۱]گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی و تربیتی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

[۲]گروه فیزیولوژی، واحد ایلخچی، دانشگاه آزاد اسلامی، ایلخچی، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: آپوپتوز، نقش مهمی در ایجاد بیماری‌های قلبی- عروقی، به‌ویژه ناتوانی قلبی ایفا می‌کند. برخی از شواهد حاکی از آن است که تمرینات ورزشی ممکن است فرآیندهای پیام‌رسانی مربوط به آپوپتوز را در بافت‌های سوماتیک حساس مانند میوکارد تغییر دهند. مطالعه حاضر با هدف تعیین تأثیر ۱۲ هفته تمرین هوازی روی نوارگردان بر بیان ژن‌های سیتوکروم c و کاسپاز - ۹ عضله قلبی موش‌های صحرایی نر انجام شد.

روش بررسی: این مطالعه به‌صورت یک طرح تجربی دو گروهی (مدل حیوانی) بر روی ۱۶ سر موش صحرایی نر ۳ ماهه انجام گرفت. حیوانات به‌طور تصادفی در دو گروه همگن تمرین هوازی و کنترل (هرگروه ۸ سر) قرار گرفتند. حیوانات گروه تمرین به مدت ۱۲ هفته، برنامه تمرین هوازی (شدت ۸۰-۷۵٪ اکسیژن مصرفی بیشینه) را انجام دادند. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، قلب آزمودنی‌ها جدا شد و ژن‌های سیتوکروم c و کاسپاز- ۹ میوکارد با استفاده از روش RT-PCR بررسی گردید. داده‌ها با استفاده از آزمون تی مستقل، در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: در این مطالعه، بیان ژن سیتوکروم c در گروه تمرین، به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل گزارش شد (۱۴۰/۶۲٪، $p<0/05$). بیان ژن کاسپاز-۹ گروه تمرین نیز به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود (۳۳۳/۹۲٪، $p<0/05$).

نتیجه‌گیری: به‌طورکلی، به‌نظر می‌رسد ۱۲ هفته تمرین هوازی روی نوارگردان، در افزایش بیان ژن‌های کلیدی مسیر میتوکندریایی آپوپتوز قلبی، تأثیر قابل‌توجهی دارد. با این حال، مکانیسم‌های زمینه‌ساز این تأثیرات نامشخص بوده و نیازمند تحقیقات بیشتری است.

کلید واژه‌ها: تمرین هوازی؛ میوکاردیوم؛ آپوپتوز.

*نویسنده مسئول مکاتبات:
جبار بشیری، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی و تربیتی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
bashiri.jabbar@gmail.com

تاریخ دریافت:۹۵/۳/۶

تاریخ پذیرش:۹۵/۵/۵

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

**Javid Tabrizi N, Bashiri J, Narimani Rad M. Effect of 12 weeks of treadmill aerobic training on cytochrome C and Caspase-9 gene expression in cardiac muscle of male rats.
Qom Univ Med Sci J 2017;11(6):1-9. [Full Text in Persian]**

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 20:33 IRDT on Friday April 20th 2018

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 20:33 IRDT on Friday April 20th 2018

مقدمه

بیماری‌های قلبی – عروقی، به‌عنوان یکی از مهم‌ترین مشکلات سلامتی در سراسر دنیا محسوب می‌شوند. پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۲۰ بیش از ۴۰٪ مرگ و میرها ناشی از بیماری‌های قلبی - عروقی باشد (۱). آپوپتوز، یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد بیماری قلبی – عروقی، به‌ویژه ناتوانی قلبی است. این فرآیند که در تنظیم تعادل بین زایش و مرگ سلولی در بافت‌های مختلف، به‌خصوص بافت‌های سوماتیک مانند عضله قلبی نقش اساسی دارد با تکه‌تکه کردن کروماتین‌ها و چگال نمودن سیتوپلاسم سلولی کار خود را آغاز و با مچاله شدن هسته، غشاهای سلولی و تولید واکوئل‌های محتوی ذرات آپوپتوتیکی خاتمه می‌یابد (۳،۲). نتایج مطالعات موجود حاکی از آن است که میزان آپوپتوز اندک عضله قلبی (در حدود ۰/۰۰۱ الی ۰/۰۰۲٪) ممکن است در اثر عوامل درونی یا بیرونی مانند ایسکمی/پرفزیون مجدد، سالخوردگی و فشارهای جسمانی، تشدید پیدا کرده و از این طریق مقدمات بروز انواع بیمارهای قلبی - عروقی را فراهم کند (۴). این فرآیند فیزیولوژیکی اغلب از طریق دو مسیر کلاسیک داخل و خارج سلولی رخ می‌دهد. مسیر خارجی با اتصال لیگاندهای مهم مانند TNFα و Fas به گیرنده‌های غشایی القاکننده مرگ راه‌اندازی می‌شود (۴،۳)؛ درحالی‌که مسیر داخلی به‌عنوان مهم‌ترین مسیر ایجاد آپوپتوز، با تغییراتی در نفوذپذیری غشای خارجی میتوکندری و رهایش عوامل آپوپتوزی همراه است (۳،۲). در این بین، سیتوکروم c به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل آپوپتوزی، با افزایش نفوذپذیری غشای خارجی میتوکندری به داخل سیتوزول رها شده و موجب راه‌اندازی واکنش‌های کاسپازی در مسیر داخلی می‌شود. سیتوکروم c با اتصال به فاکتور فعال‌کننده آپوپتوز ۱ (Apaf-1) موجب فعال‌سازی پروکاسپاز-۹، سپس کاسپاز-۹ به‌عنوان کاسپاز آغازگر آپوپتوز در مسیر میتوکندریایی می‌شود. این روند در نهایت، موجب فعال‌سازی کاسپاز-۳ تحت عنوان کاسپاز اجرایی و فصل مشترک همه مسیرهای آپوپتوزی می‌گردد. کاسپازها پس از فعال شدن، بسیاری از پروتئین‌های حیاتی سلولی را هیدرولیز و تجزیه کرده و باعث ورود سلول به مرحله غیرقابل‌برگشت مرگ سلولی می‌شوند، لذا پژوهشگران درپی اتخاذ راهکارهای مناسب برای حمایت از قلب در مقابل آپوپتوز شدید و آسیب‌های احتمالی مرتبط با آن هستند (۶،۵،۱).

در سالهای اخیر، تأثیر تمرینات ورزشی با شدت‌های مختلف بر فرآیند آپوپتوز، توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده است. این درحالی است که نتایج برخی از مطالعات در این زمینه متناقض می‌باشد. در این راستا، Lee و همکاران (سال ۲۰۱۳) گزارش کردند ۱۲ هفته تمرین هوازی موجب کاهش میزان پروتئین کاسپاز- ۹ عضله قلبی در موش‌های تمرین‌کرده در مقایسه با موش‌های تمرین‌نکرده می‌شود (۷). همچنین، Peterson و همکاران اشاره داشتند ۹ هفته تمرین هوازی متوسط موجب کاهش بیان پروتئین سیتوکروم c، کاهش بیان، فعالیت کاسپاز-۹ و قطعه قطعه شدن DNA در میوکارد موش‌های چاق می‌شود (۸). برخلاف نتایج مطالعات مذکور، برخی از پژوهش‌ها اشاره به تسریع فرآیند آپوپتوز و افزایش بیان پروتئین‌های کاسپازی متعاقب تمرینات ورزشی دارند؛ به‌طوری‌که Ho و همکاران عنوان کردند بیان پروتئین سیتوکروم c و پروتئین کاسپاز-۳ در میوکارد گروه تمرین استقامتی، به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بوده است (۹). همچنین Xin و همکاران نشان دادند ۶ ماه تمرین استقامتی موجب تسریع فرآیند آپوپتوز در میوکارد موش‌های صحرایی می‌شود (۱۰). به هر حال، با توجه به نقش حساس و کلیدی بافت قلبی در سلامتی و عملکرد، این موضوع یکی از نگرانی‌ها و چالش‌های جدی است که می‌تواند ذهن پژوهشگران و حتی اغلب افراد جامعه را به خود جلب کند که البته تناقضات موجود، عدم دسترسی به مستندات معتبر و تحقیقات جامع در این زمینه؛ ضرورت و اهمیت موضوع را دو چندان کرده است. به‌علاوه، در مطالعات اندکی که به بررسی اثر فعالیت یا تمرین ورزشی بر آپوپتوز قلبی، به‌ویژه در داخل کشور پرداخته‌اند، اغلب از روش تانل و تغییرات مورفولوژیکی برای بررسی وقوع آپوپتوز قلبی استفاده شده و تغییرات احتمالی مولکولی و پروتئین‌های درگیر در آپوپتوز، متعاقب فعالیت‌ها و تمرینات ورزشی، به‌خصوص به شکل طولانی‌مدت و با شدت بالای متوسط، کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. لذا شناسایی اثر تمرینات ورزشی بر آپوپتوز قلبی جهت کاهش بیماری‌ها و آسیب‌های ناشی از آن در بین همه افراد جامعه، به‌ویژه ورزشکاران، یک ضرورت انکارناپذیر به‌نظر می‌رسد.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 20:33 IRDT on Friday April 20th 2018

مطالعه حاضر با هدف تعیین تأثیر ۱۲ هفته تمرین هوازی روی نوارگردان بر بیان ژن‌های سیتوکروم c و کاسپاز - ۹ عضله قلبی موش‌های صحرایی نر انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، ۱۶ موش صحرایی نر ۳ ماهه ویستار ۱۴۸۴۸ خریداری شدند. جهت جلوگیری از استرس و تغییر شرایط فیزیولوژیکی، نمونه‌ها به مدت ۲ هفته تحت شرایط استاندارد (دمای ۲±۲۲سانتیگراد، رطوبت محیط ۵±۵۰٪ و چرخه روشنایی- تاریکی ۱۲:۱۲ ساعته) نگهداری شدند. آزمودنی‌ها به‌صورت آزادانه به غذای استاندارد و آب در طول دوره پژوهش دسترسی داشتند. لازم به ذکر است تمامی اعمال انجام‌شده روی حیوانات، مطابق دستورالعمل کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی مستخرج از دستورالعمل هلسینکی رعایت گردید.

ابتدا نمونه‌ها به مدت ۱۴روز تحت برنامه آشنایی با نحوه فعالیت، روی نوارگردان قرار گرفتند. در طی این دوره، شیب نوارگردان صفر درصد، سرعت ۱۵-۱۰ متر در دقیقه و مدت تمرین ۱۰-۵ دقیقه در روز بود. در پایان این دوره، موش‌ها پس از مطابقت وزنی، به‌طور تصادفی به دو گروه کنترل و تمرین تقسیم شدند. گروه تمرین برای ۵ روز در هفته (یکشنبه، دوشنبه، سه‌شنبه، پنج‌شنبه و جمعه) و به مدت ۱۲ هفته در برنامه تمرین هوازی روی نوارگردان الکترونیکی هوشمند حیوانی قرار گرفتند. شدت نسبی کار در سرتاسر برنامه تمرین، معادل ۸۰-۷۵٪ اکسیژن مصرفی بیشینه (۳۳-۲۴ متر در دقیقه با شیب ۱۵٪) حفظ شد. مدت زمان تمرین از ۱۰ دقیقه در روز در هفته اول، شروع و به ۶۰ دقیقه در روز در هفته پنجم رسید و تا انتهای دوره حفظ گردید (۱۱).

جدول شماره ۱: برنامه ۱۲ هفته تمرین هوازی روی نوارگردان

هفته‌های تمرین												
	هفته‌های تمرین											
شاخص	اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم	هفتم	هشتم	نهم	دهم	یازدهم	دوازدهم
مدت تمرین (دقیقه در روز)	۱۰	۲۰	۳۵	۴۵	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰
سرعت نوارگردان (متر در دقیقه)	۲۴	۲۴	۲۵	۲۵	۲۶	۲۷	۲۸	۲۹	۳۰	۳۱	۳۲	۳۳
شیب نوارگردان (درصد)	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵

۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، موش‌های صحرایی گروه‌های تمرین هوازی و کنترل تحت جراحی قرار گرفتند. موش‌ها ابتدا با استنشاق اتر بیهوش شدند، سپس توسط متخصصین کارآزموده، جراحی انجام و قلب آنها جدا و در مایع فیزیولوژیک انداخته شد. پس از تخلیه خون قلب و وزن‌کشی آن، بلافاصله دهلیزها از بطن جدا شده و بخشی از بافت بطن چپ آزمودنی‌ها در کرایوتویوب در نیتروژن مایع قرار گرفت و برای بررسی‌های بعدی در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

برای استخراج RNA از نمونه‌ها، طبق روش پیشنهادی کیت (Thermo,K0731, USA)، حدود ۵۰ میلی‌گرم از بافت عضله قلبی با استفاده از یک میلی‌لیتر RNXTM-PLUS (سیناژن، ایران) هموژنه شده و در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه انکوبه گردید. پس از اضافه کردن ۰/۲ میلی‌لیتر کلروفرم به هر میکروتیوب و تکان‌دادن آن با دست به مدت ۱۵ ثانیه، میکروتیوب ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد انکوبه شد و در ادامه، عمل سانتریفوژ (به‌مدت ۱۵ دقیقه در شرایط ۴ درجه سانتیگراد و ۱۳۷۰۰ دور در دقیقه) انجام گرفت. سپس به دقت و بدون تکان دادن تیوب، قسمت بالایی (حاوی RNA) جدا شده و به میکروتیوب دیگری انتقال یافت. به محلول جداشده، حجم مساوی از ایزوپروپانول سرد اضافه و برای ۱۰ دقیقه در دمای۲۰ درجه انکوبه گردید، سپس میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه و ۱۳۷۰۰ دور در دقیقه، سانتریفوژ شده و مایع رویی آن بیرون ریخته شد و یک میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ به میکروتیوب اضافه گردید، در ادامه، بلافاصله میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه در شرایط ۴ درجه و ۱۳۷۰۰ دور در دقیقه، سانتریفوژ شده و مایع رویی آن بیرون ریخته شد و به دقت اتانول، خالی و حدود ۲۰ دقیقه اجازه داده شد تا الکل تبخیرگردد، سپس در آب تیمارشده با دی اتیل پیروکربنات (DEPC) حل شد. پس از استخراج RNA، مقدار و خلوص آن به‌وسیله روش اسپکتروفتومتری (Bio-Rad, CA, USA) تعیین گردید.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 20:33 IRDT on Friday April 20th 2018

RNA تام به‌وسیله الکتروفورز روی ژل آگارز حاوی اتیدیوم بروماید قرار گرفت و دو باند مشخص با طول موج ۱۸ و ۲۸ مربوط به RNA ریبوزومی، مشاهده و کنترل گردید.

RNA استخراج‌شده جهت استفاده در مراحل بعدی در دمای ۸۰- درجه نگهداری شد. طبق دستورالعمل کیت (Fermentas, Canada) Revert AID^{TM} Firs Standard cDNA synthesis، یک میکرولیتر RNA و یک میکرولیتر از DNase I reaction buffer 10X در یک تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد و به‌وسیله DEPC-traeted water به حجم ۹ میکرولیتر رسید. برای از بین بردن آلودگی احتمالی با DNA، یک میکرولیتر DNase به تیوب، اضافه و پس از افزودن یک میلی‌لیتر از اتانول مطلق، تیوب مربوطه به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر ۷۰- درجه قرار گرفت، سپس به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط ۴ درجه و ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و پس از آن، در زیر هود به دقت اتانول آن، خالی و حدود ۱۰ دقیقه اجازه داده شد تا الکل تبخیر گردد. به تیوب یک میکرولیتر DEPC-treated water و یک میکرولیتر پرایمر oligi (dt) یا پرایمر Random hexamer افزوده شد و ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه بر روی Dry block انکوبه گردید. ۴ میکرولیتر Reaction Buffer 5X و ۲ میکرولیتر dNTP 10mM mix و یک میکرولیتر Ribo lock Ribo Nuclease Transcription Inhibitor به تیوب افزوده شد و پس از سانتریفوژ مختصر، به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه گردید. یک میکرولیتر آنزیم RverertAid^{TM} H Minus M-MuLV Reverse به تیوب قبل افزوده شد. در ادامه، درصورت استفاده از پرایمر oligo (dt)، ۶ دقیقه در ۴۲ درجه و درصورت استفاده از پرایمر Random hexamer، ابتدا ۵ دقیقه در ۲۵ درجه و درپی آن ۹۰ دقیقه در ۴۲ درجه، انکوباسیون صورت گرفت. واکنش با قرار دادن تیوب به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰درجه پایان یافت و نمونه در فریزر ۷۰- درجه نگهداری شد.

اندازه‌گیری میزان بیان ژنی پروتئین‌های سیتوکروم c و کاسپاز-۹، با استفاده از دستگاه Corbett-Rotor gene-۶۰۰۰ (Corbett Research Australia) انجام شد. جفت پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از نرم‌افزار Primer 3، طراحی و به‌وسیله Bioneer-Germany سنتز شده و با غلظت نهایی ۸۰نانومتر مورد استفاده قرار گرفت. واکنش‌ها برمبنای استفاده از رنگ Syber green انجام گرفت. (رنگ Syber green طی واکنش Real-time PCr به DNA دو رشته‌ای، متصل و نور فلورسنت ساطع می‌کند.) در جدول شماره ۲، توالی پرایمرهای بیان ژنی برای موش‌های صحرایی مشخص شده است.

در این مطالعه، به‌عنوان بلانک از تیوبی که حاوی همه مواد موجود در واکنش بجز cDNA بود، استفاده گردید و به جای cDNA، به تیوب مربوطه، DEPC water افزوده شد. پس از اتمام واکنش تکثیر، برای هر واکنش PCR، یک نمودار رسم شد، سپس بر این اساس C_T تعیین گردید. در پایان، قبل از آنالیز داده‌ها، منحنی ذوب (Melting curve) به‌دست‌آمده از هر واکنش Real-time PCR بررسی گردید تا پیک مربوط به ژن مورد نظر و فقدان پرایمر دایمر تأیید شود. برای آنالیز داده‌ها نیز ابتدا ΔCt ژن در هر نمونه از افتراق Ct ژن مربوطه و Ct ژن GAPDH به‌عنوان رفرنس با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه شد.

$\Delta C_T = C_T \text{ target} - C_T \text{ reference}$

$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ test sample} - \Delta C_T \text{ control sample}$

جدول شماره ۲: توالی پرایمرهای بیان ژنی عضله قلبی موش‌های صحرایی

Genes	Primer sequence Product	Length (bp)
Cytocrome c	F: 5' GGAGTGTTCGTTGTGCCAGC3' R: 5' CTGACCTGTCTTCCGCCCAA3	169
Caspase 9	F:5' CGAGCTGTTCAGGCCCCATA3' R: 5'CGCAGAAACGAAGCCAGCAT3'	174
GAPDH	F: 5' GGAAAGCCTGCCGGTGACTA 3' R:5' CACCCGGAGGAGAAATCGGG 3'	110

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 20:33 IRDT on Friday April 20th 2018

توزیع طبیعی داده‌ها و برابری واریانس‌ها، با استفاده از آزمون کولموگروف - اسمیرنوف و لون مشخص گردید. سپس برای تعیین اختلاف میزان شاخص‌های مورد نظر بین دو گروه کنترل و تمرین هوازی، از آزمون تی مستقل استفاده شد. تمامی محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ در سطح معنی‌داری p<۰/۰۵ انجام گرفت.

یافته‌ها

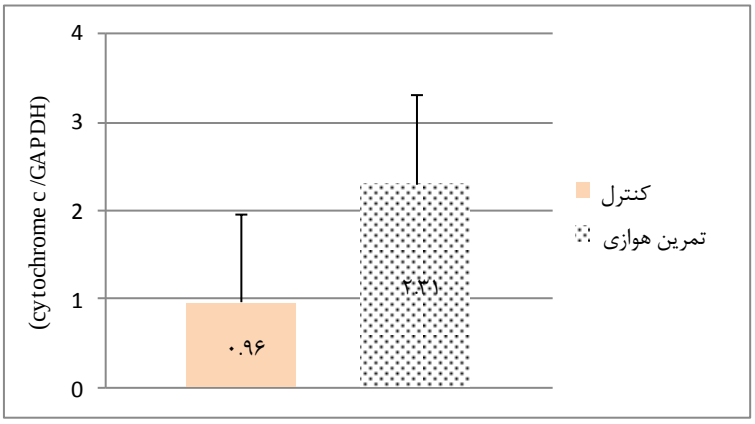
در رابطه با تأثیر ۱۲ هفته تمرین هوازی روی نوارگردان بر ویژگی‌های بدنی با استفاده از آزمون تی، تفاوت معنی‌داری بین توده‌بدنی آزمودنی‌های گروه کنترل و تمرین مشاهده گردید (p<۰/۰۵)؛ به‌طوری‌که توده بدنی گروه تمرین، ۱۹٪ کمتر از گروه کنترل بود. همچنین تفاوت معنی‌داری در نسبت وزن قلب به توده‌بدنی گروه کنترل و تمرین دیده شد (p<۰/۰۱) و نسبت وزن قلب به توده‌بدنی گروه تمرین، ۳۳٪ از گروه کنترل بیشتر بود. با این حال، تفاوت معنی‌داری در وزن قلب گروه‌های تمرین و کنترل مشاهده نشد (p<۰/۰۵) (جدول شماره ۳).

جدول شماره ۳: مشخصات موش‌های صحرایی در دو گروه کنترل و تمرین هوازی

شاخص / گروه	کنترل	تمرین هوازی
وزن بدن (گرم)*	۲۵۱/۷±۲۲/۶	۲۰۲/۳±۱۸/۳
وزن قلب (گرم)	۰/۷۵±۰/۰۹	۰/۸۱±۰/۰۸
وزن قلب بر وزن بدن (گرم بر کیلوگرم)*	۳/۱±۰/۴۵	۴±۰/۳۴

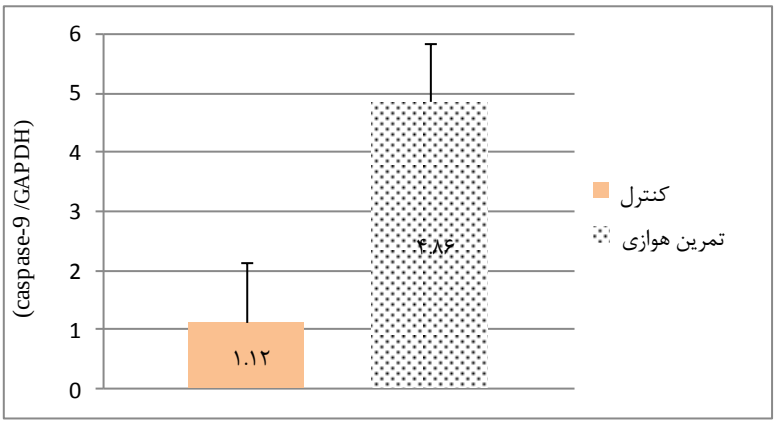
*p<۰/۰۵

در رابطه با شاخص‌های مربوط به آپوپتوز عضله قلبی، نتایج نشان داد تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل و تمرین هوازی در بیان ژن‌های سیتوکروم c و کاسپاز-۹ وجود دارد (p<۰/۰۱). در این راستا، میزان بیان هر دو ژن سیتوکروم c و کاسپاز-۹ در گروه تمرین هوازی، به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود (ژن سیتوکروم c: ۱۴۰/۶٪ و ژن کاسپاز-۹: ۳۳۳/۹٪). به عبارتی، ۱۲ هفته تمرین هوازی روی نوارگردان موجب افزایش قابل‌توجه هر دوی ژن‌های مربوط به آپوپتوز میتوکندریایی عضله قلبی موش‌های صحرایی گردید (نمودار شماره ۱ و ۲).



نمودار شماره ۱: میزان بیان ژن سیتوکروم c در دو گروه کنترل و تمرین هوازی.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 20:33 IRDT on Friday April 20th 2018



نمودار شماره ۲: میزان بیان ژن کاسپاز-۹ در دو گروه کنترل و تمرین هوازی.

بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد ۱۲ هفته تمرین هوازی روی نوارگردان موجب کاهش وزن بدن موش‌های صحرایی می‌شود (۱۹/۶٪). با این حال، تمرین هوازی باوجود کاهش معنی‌دار وزن بدن، موجب افزایش وزن قلب (۸٪) و افزایش معنی‌دار نسبت وزن قلب به وزن بدن (۲۹٪) شد. به عبارتی، اگرچه ۱۲ هفته تمرین هوازی روی نوارگردان موجب کاهش وزن بدن شده، اما این تمرین هوازی موجب افزایش وزن قلب و افزایش قابل‌توجه نسبت وزن قلب به وزن بدن در موش‌های صحرایی می‌شود. به‌علاوه، در پژوهش حاضر میزان بیان ژن سیتوکروم c در گروه تمرین هوازی، حدود ۱۴۰/۶٪ به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود. همچنین میزان بیان ژن کاسپاز-۹ در گروه تمرین هوازی حدود ۳۳۳/۹٪، به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود. به عبارتی، ۱۲ هفته تمرین هوازی روی نوارگردان با شدت نسبی ۸۰-۷۵٪ اکسیژن مصرفی بیشینه موجب افزایش قابل‌توجه هر دو ژن مربوط به آپوپتوز میتوکندریایی عضله قلبی موش‌های صحرایی شده و این احتمال وجود دارد که این موضوع در نهایت، موجب تشدید بروز فرآیند آپوپتوز از طریق مسیر داخلی شود. در تأیید نتایج پژوهش حاضر، Ho و همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند بیان پروتئین سیتوکروم c و پروتئین کاسپاز-۳ در میوکارد گروه تمرین (۱۲ هفته تمرین استقامتی)، به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بوده است (۹). همچنین Xin و همکاران بیان داشتند ۶ ماه تمرین استقامتی موجب تسریع فرآیند آپوپتوز در میوکارد موش‌های صحرایی می‌شود (۱۰).

در این راستا، اگرچه ساز و کارهای متعددی مانند تغییر مستقیم در بیان ژن‌های مربوط به آپوپتوز، آزادسازی عوامل آپوپتوتیک میتوکندری، تغییرات تولید ROS و وضعیت ضداکسایشی مطرح شده، ولی هنوز ابهامات بسیاری در این زمینه وجود دارد (۱۳،۱۲). در این خصوص، Vainshtein و همکاران نشان دادند آپوپتوز میتوکندریایی اغلب با افزایش گونه‌های فعال اکسیژن همراه است (۱۴). از طرفی، Xin و همکاران نیز عنوان کردند تمرینات هوازی و استقامتی طولانی‌مدت، اگرچه مقدمات هایپرتروفی میوکارد را فراهم نمی‌کند، اما می‌تواند با افزایش استرس اکسایشی موجب تشدید آپوپتوز میوکارد شود (۱۰). همچنین این احتمال وجود دارد در پاسخ به فشار اکسایشی، جابه‌جایی و استقرار پروتئین Bax (Bcl2-associated X protein) در غشای بیرونی میتوکندری افزایش یابد. این موضوع تا اندازه‌ای می‌تواند ناشی از فعال‌شدن JNK (c-Jun-N-terminal kinase) سیتوزولی باشد؛ به‌طوری‌که JNK در حضور محرک‌های استرس سلولی فسفریله‌شده و موجب مهار پروتئین Bcl-2 می‌گردد، لذا پروتئین Bax اجازه جابه‌جایی به سمت میتوکندری را می‌یابد. پروتئین JNK در داخل میتوکندری، در بازشدن mtPTP (Mitochondrialpermeability transition pore) دخالت کرده و موجب رهایش عوامل پیش‌آپوپتوزی AIF (Apoptosis Inducing Factor) و سیتوکروم c به داخل سیتوزول می‌شود، به محض رهایش و ورود به سیتوزول، AIF و سیتوکروم c موجب قطعه‌قطعه شدن DNA به‌طور مستقیم یا از طریق آبشار کاسپازی شامل کاسپاز-۹ و در نهایت، کاسپاز-۳ می‌شوند (۱۴).

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 20:33 IRDT on Friday April 20th 2018

البته عوامل دیگری نیز در برخی مطالعات در رابطه با نفوذپذیری غشای میتوکندری مورد بررسی قرار گرفته‌اند، به‌طوری‌که اشاره شده برخی از پروتئین‌های اسکلت سلولی مانند کافیلین-۲ (Cofilin-2)(یک پروتئین اسکلت سلولی متصل به آکتین)، با آپوپتوز ناشی از فشار اکسایشی ارتباط دارد. کافیلین-۲ در سیتوزول قرار دارد، ولی به محض اکسایش، در درون میتوکندری جابه‌جا و احتمالاً موجب تسهیل بازشدن mtPTP می‌گردد (۱۵). با این حال، اگرچه امکان بررسی تغییرات این شاخص در مطالعه حاضر وجود نداشت، ولی شواهد حاکی از آن است که سطوح این پروتئین با تمرین، تغییر چندانی نمی‌کند و نشانگر عدم سازگاری آن با تمرین ورزشی است. با این وجود، برخلاف نتایج مطالعه حاضر، Lee و همکاران گزارش کردند ۱۲ هفته تمرین هوازی به مدت ۶۰ دقیقه در روز و با سرعت ۲۷ متر در دقیقه موجب کاهش میزان پروتئین کاسپاز-۹ عضله قلبی در موش‌های تمرین‌کرده در مقایسه با موش‌های تمرین‌نکرده می‌شود (۷). بنابراین، به‌نظر می‌رسد دلیل اصلی تناقض مطالعه حاضر با پژوهش Lee و همکاران و برخی از مطالعات پیشین که اشاره به مهار یا کاهش فرآیند آپوپتوز متعاقب تمرینات هوازی و استقامتی داشته‌اند (۱۶،۸)، پروتکل تمرینی مورد استفاده در مطالعه حاضر باشد؛ زیرا این احتمال وجود دارد که تمرینات هوازی شدیدتر و طولانی‌مدت، پیام‌رسانی آپوپتوتیک عضله قلبی را افزایش دهند، به‌طوری‌که آزمودنی‌های مطالعه lee و همکاران در یک سرعت متوسط و زیرمتوسط (سرعت ۲۷ متر در دقیقه معادل تقریبی ۶۰-۵۵٪ اکسیژن مصرفی بیشینه) و شیب نوارگردان پایین‌تر تمرین کرده بودند، درحالی‌که آزمودنی‌های پژوهش حاضر، ۱۲ هفته تمرین هوازی روی نوارگردان را با شدت نسبی ۸۰-۷۵٪ اکسیژن مصرفی بیشینه (سرعت ۳۳ متر در دقیقه در هفته آخر) اجرا کردند.

لذا به‌نظر می‌رسد تمرینات هوازی با شدت‌های متوسط و پایین موجب بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش استرس اکسایشی سلول شده و سازگاری‌های لازم برای مهار یا توقف آپوپتوز ناشی از تمرینات هوازی را فراهم می‌کند (۱۵،۱۴). با این حال، با توجه به محدودیت‌های پژوهش حاضر مانند عدم اندازه‌گیری تغییرات مورفولوژیکی، ارزیابی بیان سایر پروتئین‌های درگیر در مسیر میتوکندریایی آپوپتوز، بررسی بیان پروتئین‌های درگیر در مسیر خارجی آپوپتوز و اندازه‌گیری محتوی پروتئین‌های موردنظر به‌وسیله روش وسترن بلات؛ اظهارنظر قطعی در مورد نحوه تأثیرپذیری شاخص‌های مربوط به آپوپتوز عضله قلبی از تمرینات ورزشی مختلف، منوط به انجام تحقیقات و مطالعات بیشتر در این زمینه می‌باشد.

نتیجه‌گیری

براساس نتایج مطالعه حاضر می‌توان عنوان کرد تمرینات هوازی طولانی‌مدت و با شدت بالای متوسط، با وجود تأثیرات عملکردی مثبت همچون کاهش وزن بدن، افزایش وزن قلب و نسبت وزن قلب به بدن، احتمالاً می‌توانند موجب افزایش بیان برخی ژن‌های درگیر در مسیر میتوکندریایی آپوپتوز مانند سیتوکروم c و کاسپاز-۹ شده و در نهایت، باعث تشدید آپوپتوز قلبی در موش‌های صحرایی جوان شوند.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد فیزیولوژی ورزشی خانم نسرین جاوید تبریزی می‌باشد. لذا از مساعدت و همکاری صمیمانه مسئولین دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز و تمام افرادی‌که موجب تسهیل اجرای پایان‌نامه شدند، تقدیر و تشکر می‌گردد. ضمناً تمامی هزینه‌های پایان‌نامه به‌صورت شخصی بوده و هیچ سازمانی حمایت مالی نکرده است.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 20:33 IRDT on Friday April 20th 2018

References:

1. Marzetti E, Wohlgemuth SE, Anton SD, Bernabei R, Carter CS, Leeuwenburgh C. Cellular mechanisms of cardioprotection by calorie restriction: state of the science and future perspectives. Clin Geriatr Med 2009;25(4):715–32. PubMed

2. Cerella C, Grandjenette C, Dicato M, Diederich M. Roles of apoptosis and cellular senescence in cancer and aging. Curr Drug Targets 2016;17(4):405-15. PubMed

3. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Toxicol Pathol 2007;35(4):495–16. PubMed

4. Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Ilio CD, Laurenzi VD. Role of apoptosis in disease. Aging (Albany NY) 2012;4(5):330-49. PubMed

5. Parrish AB, Freel CD, Kornbluth S. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. Cold Spring Harb Perspect Biol 2013;5(6):a008672. PubMed

6. Würstle ML, Laussmann MA, Rehm M. The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome. Exp Cell Res 2012;318(11):1213-20. PubMed

7. Lee SD, Shyu WC, Cheng IS, Kuo CH, Chan YS, Lin YM, et al. Effects of exercise training on cardiac apoptosis in obese rats. Nutr Metab Cardiovasc Dis 2013;23(6):566-73. PubMed

8. Peterson JM, Bryner RW, Sindler A, Frisbee JC, Alway SE. Mitochondrial apoptotic signaling is elevated in cardiac but not skeletal muscle in the obese Zucker rat and is reduced with aerobic exercise. J Appl Physiol (1985) 2008;105(6):1934-43. PubMed

9. Ho TJ, Huang CC, Huang CY, Lin WT. Fasudil, a Rho-kinase inhibitor, protects against excessive endurance exercise training-induced cardiac hypertrophy, apoptosis and fibrosis in rats. Eur J Appl Physiol 2012;112(8):2943-55. PubMed

10. Xin L, Jian LU, Wei WU. Effect of long-term endurance exercise on cardiac apoptosis. J Mian Nor Univ 2009;7:2009-11. PubMed

11. Natio H, Powers SK, Demirel HA, Aoki J. Exercise training increases heat shock protein in skeletal muscles of old rats. Med Sci Sports Exerc 2001;33(5):729-34. PubMed

12. McMillan EM, Graham DA, Rush JWE, Quadrilatero J. Decreased DNA fragmentation and apoptotic signaling in soleus muscle of hypertensive rats following 6 weeks of treadmill training. J Appl Physiol (1985) 2012;113(7):1048-57. PubMed

13. 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. PubMed

14. Vainshtein A, Kazak L, Hood DA. Effects of endurance training on apoptotic susceptibility in striated muscle. J Appl Physiol (1985) 2011;110(6):1638-45. PubMed

15. Klamt F, Zdanov S, Levine RL, Pariser A, Zhang Y, Zhang B, et al. Oxidant-induced apoptosis is mediated by oxidation of the actin-regulatory protein cofilin. Nat Cell Biol 2009;11(10):1241-6. PubMed

16. Santana ET, Serra AJ, Silva Junior JA. Aerobic exercise training induces an anti-apoptotic milieu in myocardial tissue. Motriz 2014;20(2):233-38. SciElo