University of Birjand

Journal of Practical Studies of Biosciences in Sport Research Paper

Fall 2021, 9(19), 34-46

Received: May 8, 2020 Accepted: Aug 15, 2020

Journal of Practical Studies of Biosciences in Sport

The role of 3 months of regular aerobic training on some factors of mitochondrial apoptosis pathway in cardiac tissue of male Wistar rats

Aylar Imani[1], Marefat Siahkouhian[2*], Pouran Karimi[3], Masoud Asgharpour-Arshad[4], Farnaz Seyfi-Asgshahr[5]

1. Ph.D. Student of Exercise Physiology, Faculty of Educational Sciences and Psychology, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran.
2. Full Professor, Department of Physical Education and Sport Sciences, Faculty of Educational Sciences and Psychology, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Clinical Biochemistry, Neuroscience Research Center, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
4. Assistant Professor, Department of Physical Education and Sport Sciences, Faculty of Basic Sciences, Amin Police University, Tehran, Iran.
5. Assistant Professor, Department of Physical Education and Sport Sciences, Faculty of Educational Sciences and Psychology, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran.

Abstract

Background and Aim: Apoptosis in post-mitotic tissue such as the heart is fatal due to the unable to proliferate and loss of cardiomyocytes is irreplaceable. However, exercise training could be effective in reducing apoptosis. The aim of this study was to investigate the role of 3 months of regular aerobic training on some factors of mitochondrial apoptosis pathway in cardiac tissue of male Wistar rats. **Materials and Methods:** The research was applied study that conducted in the form of an experimental project with a control group. Thirty one male Wistar rats with an average weight of 173.80 ± 9.21 grams were divided into three homogeneous groups including three-months control (n=10), six-months control (n=10) and aerobic training group (n=11).The aerobic training group participated in aerobic training with 75 to 80 percent of maximal oxygen consumption for 3 months. After the implementation of the training protocol, the surgical procedures and cardiac tissue extraction were performed and gene expression of Bax and Bcl-2 of cardiac tissue was assessed by RT-PCR. Results extracted by one-way of variance analysis and Bonferroni post hoc test at a significance level of $p<0.05$. **Results:** The results showed the significant increase in Bcl-2 gene expression during aerobic training compared to the six-month control group ($p=0.001$). However, the expression of Bax gene in the aerobic training group did not show any significant changes compared to the control group ($p=0.21$). **Conclusion:** Regular aerobic exercise can play a significant role for controlling mitochondrial apoptosis of cardiac tissue.

Keywords: Aerobic training, Gene expression of Bcl-2, Gene expression of Bax, Myocard tissue, Rat.

Cite this article:

Imani, A., Siahkouhian, M., Karimi, P., Asgharpour-Arshad, M., & Seyfi-Asgshahr, F. (2021). The role of 3 months of regular aerobic training on some factors of mitochondrial apoptosis pathway in cardiac tissue of male Wistar rats. *Journal of Practical Studies of Biosciences in Sport, 9***(19), 34-46.**

***Coressponding Author, Address: Department of Physical Education and Sport Sciences, Faculty of Educational Sciences and Psychology, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran;**

Email: m_siahkohian@uma.ac.ir

https://doi.org/10.22077/jpsbs.2020.3375.1557

نشریه مطالعات کاربردی علوم‌زیستی در ورزش
مقاله پژوهشی
پاییز ۱۴۰۰، دوره ۹، شماره ۱۹، ص ۴۶-۳۴
تاریخ دریافت: ۹۹/۰۲/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۵/۲۵
دانشگاه بیرجند

تاثیر ۳ ماه تمرین هوازی منظم بر بعضی عوامل مسیر میتوکندریایی آپوپتوزیس در بافت قلبی موش‌های نر ویستار

آیلار ایمانی[۱]، معرفت سیاه‌کوهیان[۲*]، پوران کریمی[۳]، مسعود اصغرپور ارشد[۴]، فرناز سیفی اسگ‌شهر[۵]

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روانشناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.
۲. استاد گروه تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روانشناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.
۳. استادیار بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی وخدمات بهداشتی درمانی تبریز، تبریز، ایران.
۴. استادیار گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه علوم انتظامی امین، تهران، ایران.
۵. استادیار گروه تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روانشناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: آپوپتوزیس در بافت پس‌میتوزی همچون قلب که قابلیت تکثیر سلولی ندارد، مهلک است؛ چرا که از دست رفتن کاردیومیوسیت‌ها جایگزین شدنی نیست. این در حالی است که تمرین ورزشی می‌تواند در کاهش آپوپتوزیس مؤثر باشد. هدف مطالعه حاضر تاثیر ۳ ماه تمرین هوازی منظم بر بعضی عوامل مسیر میتوکندریایی آپوپتوزیس در بافت قلبی موش‌های نر ویستار بود. **روش تحقیق:** این تحقیق از نوع مطالعات کاربردی است که در قالب یک طرح تجربی با گروه کنترل به اجرا درآمد. تعداد ۳۱ سر موش نر ویستار با میانگین وزنی ۹/۲۱± ۱۷۳/۸۰ گرم در سه گروه همگن کنترل سه ماهه (۱۰ سر)، کنترل شش ماهه (۱۰ سر) و تمرین هوازی (۱۱ سر) تقسیم شدند. گروه تمرین هوازی به مدت ۳ ماه در تمرینات ورزشی با شدت ۷۵ الی ۸۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی شرکت کردند. پس از اجرای پروتکل تمرینی، مراحل جراحی و استخراج بافت قلبی انجام شد و بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 با استفاده از روش RT-PCR ارزیابی گردید. نتایج با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک راهه و آزمون تعقیبی بونفرونی در سطح معنی‌داری p<۰/۰۵ استخراج گردید. **یافته‌ها:** بیان ژن Bcl-2 در گروه تمرین هوازی افزایش معنی‌دای در مقایسه با گروه کنترل شش‌ماهه پیدا کرد (p=۰/۰۰۱)؛ در حالی که بیان ژن Bax در گروه تمرین هوازی تغییر معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل شش‌ماهه نداشت (p=۰/۲۱). **نتیجه‌گیری:** تمرینات هوازی منظم می توانند در کنترل آپوپتوزیس میتوکندریایی بافت قلبی نقش داشته باشند.

واژه های کلیدی: تمرین هوازی، بیان ژن Bcl-2، بیان ژن Bax، بافت میوکارد، رت.

* نویسنده مسئول، آدرس: اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده علوم تربیتی و روانشناسی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی؛
پست الکترونیک: m_siahkohian@uma.ac.ir
https://doi.org/10.22077/jpsbs.2020.3375.1557

مقدمه

اصطلاح آپوپتوزیس[1] به عنوان فرآیند ویژه مرگ یا تجزیه سلولی با یک روش به دقت کنترل‌شده، توصیف می‌شود. عموماً فرآیندهای آپوپتوتیک در حین رشد و حفظ هومئوستاز بافتی، از طریق ایجاد تعادل بین تولید سلول‌های جدید و حذف سلول‌های آسیب‌دیده و یا پیر نقش مهمی دارند (آریاملو[2] و دیگران، ۲۰۱۹؛ المور[3]، ۲۰۰۷). بنابراین، آپوپتوزیس شانس از بین‌بردن سلول‌ها را بدون هرگونه آسیب به سلول‌های بافت‌های مجاور، فراهم می‌کند. آپوپتوزیس علاوه بر نقش داشتن در تحول و نوسازی سلولی فیزیولوژیک، در بسیاری از شرایط پاتوفیزیولوژیک مانند پاسخ‌های التهابی و استرس و آسیب سلولی نیز مؤثر است (کورس میر[4]، ۱۹۹۹) و نقش این فرآیند در بافت‌های سوماتیک[5] همچون قلب چشم‌گیرتر می‌باشد (کیل[6]، ۲۰۱۴). برحسب ماهیت محرک آپوپتوزی، دو مسیر القای آپوپتوزیس متمایز شده‌اند که شامل مسیر درونی (مسیر میتوکندریایی[7]) و مسیر بیرونی می‌باشد. مسیر میتوکندریایی، عمدتاً با ایجاد آسیب به سلول و یا برخی مؤلفه‌های آن آغاز می‌شود (ناگاتا و تاناکا[8]، ۲۰۱۷). محرک‌های استرس سلولی مانند شوک گرمایی، استرس اکسایشی، حذف عوامل رشدی و آسیب DNA، می‌توانند سبب فعال‌سازی مسیر میتوکندریایی آپوپتوزیس شوند (بلاندر[9]، ۲۰۱۴). این مسیر، با تغییراتی در نفوذپذیری[10] و رهایش عوامل آپوپتوزی همراه است. رخدادهای مولکولی آپوپتوزیس در مسیر میتوکندریایی، اساساً به واسطه تعادل بین پروتئین‌های ویژه تنظیمی پیش و ضد - آپوپتوزی مشخص می‌شود (گارسیا سائز[11]،۲۰۱۲؛ اولا[12] و دیگران، ۲۰۱۱، تاور[13]، ۲۰۱۵). پروتئین‌های پیش- آپوپتوزی مانند Bax [14] با کاهش پایداری غشای بیرونی میتوکندری، می‌توانند منتج به رهایش عوامل آپوپتوزی از فضای بین غشایی شوند. این در حالی است که پروتئین‌های ضدآپوپتوزی از جمله Bcl-2 [15]، با فعالیت پیش- آپوپتوزی پروتئین Bax مخالفت کرده و موجب حفظ یکپارچگی غشای میتوکندری می‌شوند (گارسیا سائز، ۲۰۱۲؛ اولا و دیگران، ۲۰۱۱؛ تاور، ۲۰۱۵).

اگر نقصی در برنامه آپوپتوتیک رخ دهد، نتیجه آن ممکن است کاهش و یا افزایش در سلول‌ها و افزایش بیماری باشد (قراخانلو و ملانوری، ۲۰۱۶). نتایج مطالعات موجود حاکی است که میزان آپوپتوزیس اندک بافت قلبی (در حدود ۰/۰۰۱ الی ۰/۰۰۲ درصد)، ممکن است بر اثر عوامل درونی یا بیرونی مانند پرتوافکنی، ایسکمی/خون رسانی مجدد، داروهای مختلف، سالخوردگی و فشارهای جسمانی (مکانیکی- متابولیکی) تشدید شود و از این طریق، مقدمات بروز انواع بیماری‌های قلبی- عروقی را فراهم سازد (برقه[16] و دیگران، ۲۰۱۵؛ روح[17] و دیگران، ۲۰۱۶). آپوپتوزیس پیش‌رونده در بافت پس‌میتوزی[18] همچون قلب که قابلیت تکثیر سلولی ندارد، مهلک است؛ چرا که از دست رفتن کاردیومیوسیت‌ها[19] جایگزین نشدنی است (روح و دیگران، ۲۰۱۶). شواهد نشان می‌دهند که آپوپتوزیس کاردیومیوسیت‌ها در نارسایی قلبی نقش دارد (کواک[20]، ۲۰۱۳؛ ساراست[21] و دیگران، ۱۹۹۹).

در دو دهه اخیر آپوپتوزیس در میان محققین علوم ورزشی توجه خاصی را به خود جلب کرده است؛ زیرا شواهدی مبنی بر نقش فعالیت‌های ورزشی، به ویژه ورزش های شدید، در مرگ برنامه ریزی شده[22] ارائه شده است (کواک، ۲۰۱۳). فعالیت ورزشی شدید، چندین عامل مربوط به فرآیند آپوپتوزیس را تحت تأثیر قرار می دهد. برای مثال، گلوکوکورتیکوئیدها[23]، گونه‌های فعال اکسیژن[24] (ROS) و استرس اکسایشی[25]، افزایش سطوح کلسیم داخل سلولی و عامل نکروز تومور آلفا [26] (TNF-α)؛ تعدای از سیگنال‌هایی هستند که می‌توانند منجر به آپوپتوزیس گردند (کوادریلاترو [27] و دیگران، ۲۰۱۱). تعدادی از این عوامل از محیط خارج سلولی نشأت می گیرند (گلوکوکورتیکوئیدها و TNF-α) و با پروتئین‌های خارج و داخل سلولی واکنش می‌دهند و ممکن است مرگ سلول را هم تحریک کنند (بردسن[28] و دیگران، ۲۰۰۶). در رابطه با آپوپتوزیس و فعالیت ورزشی، کو و دیگران (۲۰۱۳) اشاره کرده اند که فعالیت ورزشی روی نوارگردان، آپوپتوزیس میوکاردی را در موش‌ها از طریق افزایش پروتئین شوک گرمایی- ۷۰ (HSP۷۰)[29] و متعاقب آن، اثر کاهشی و افزایشی (به ترتیب) بر Bax و Bcl-2؛ کاهش می‌دهند (کو[30] و دیگران، ۲۰۱۳). لیو و دیگران (۲۰۱۳) مطالعه‌ای با عنوان تمرین وامانده‌ساز بیان

1. Apoptosis
2. Aryamloo
3. Elmore
4. Korsmeyer
5. Somatic
6. Kile
7. Mitochondrial pathway
8. Nagata & Tanaka
9. Blander
10. Permeability
11. García-Sáez
12. Ola
13. Tower
14. Bcl-2-associated X protein
15. B-cell lymphoma 2
16. Berghe
17. Roh
18. Post-mitotic
19. Cardiomyocytes
20. Kwak
21. Saraste
22. Programmed death
23. Glucocorticoids
24. Reactive oxygen species
25. Oxidative stress
26. Tumor necrosis factor alpha
27. Quadrilatero
28. Bredesen
29. Heat shock protein 70
30. Ko

UCP2[1] را افزایش و نسبت Bcl-2 بهBax را در عضله اسکلتی موش صحرایی کاهش می‌دهد را به اجرا درآوردند. یافته‌ها بیانگر این بود که بیان پروتئین UCP2 بین گروه تمرین و کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت. بیان پروتئین Bax در گروه تمرین وامانده‌ساز و گروه تمرین به‌صورت معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود. همچنین، بیان پروتئین Bcl-2 در گروه تمرین وامانده‌ساز و گروه تمرین پایین‌تر از گروه کنترل بود. نسبت Bcl-2/Bax نیز به‌طور معنی‌داری در گروه تمرین وامانده‌ساز و تمرین پایین‌تر از گروه کنترل بود (لیو[2] و دیگران، ۲۰۱۳). لی[3] و دیگران (۲۰۱۳) ضمن بررسی تأثیر تمرین ورزشی (۱۲ هفته تمرین هوازی؛ ۶۰ دقیقه در روز با سرعت ۲۷ متر/دقیقه) بر آپوپتوزیس میوکارد موش‌های صحرایی چاق، گزارش کرده اند که میزان پروتئین‌های Bad، Bax و نسبت Bax به Bcl-2 و نیز فعالیت کاسپاز-۳ و ۹ در موش‌های چاق تمرین‌کرده به‌طور معنی‌داری کمتر از موش‌های چاق تمرین نکرده می باشد. سانتانا[4] و دیگران (۲۰۱۴) نشان داده اند که فعالیت ورزشی هوازی (۱۳ هفته، هر هفته ۶ جلسه، هر جلسه ۱ ساعت دویدن روی نوارگردان با سرعت تدریجی ۱۸-۳ متر/دقیقه از روز اول تا آخر دوره تمرینی) بیان ژن و بیان پروتئین همه عوامل ضدآپوپتوزی در عضله قلبی را افزایش می‌دهد. لیائو[5] و دیگران (۲۰۱۵) اشاره کرده اند که تمرین ورزشی متوسط (تمرین ورزشی شنا ۵ روز/هفته به مدت ۱۲ هفته) می‌تواند خطر التهاب، هایپرتروفی و فیبروزیس قلبی[6] را در رت‌های با پیری القاشده کاهش دهد؛ تغییراتی که در نتیجه کاهش آپوپتوزیس (با مسیرهای پیام دهی متفاوت) روی می دهد. تنورساز و دیگران (۲۰۱۹) با بررسی تأثیر تمرین هوازی میان‌مدت بر نشانگرهای آپوپتوزیس در سلول‌های عضلانی قلب موش‌های صحرایی دیابتی‌شده با استرپتوزوتوسین[7] و اعمال پروتکلی با سرعت ۱۸-۱۵ متر بر دقیقه، به مدت زمان ۴۴-۲۵ دقیقه که در طول ۴ هفته با تکرار ۵ جلسه در هفته، اجرا گردید؛ نتیجه گرفتند که احتمالاً می توان از تمرینات منظم هوازی به عنوان یک روش غیردارویی برای کاهش عوارض آپوپتوزیس ناشی از دیابت استفاده کرد. سوری و دیگران (۲۰۱۹) ضمن بررسی تأثیر فعالیت ورزشی هوازی (مدت ۶ هفته و تکرار ۵ جلسه/هفته) بر شاخص‌های آپوپتوزیس و رشدی بافت قلب رت‌های پیر،گزارش کرده اند که تمرین شدید نسبت به تمرین کم شدت، افزایش معنی‌داری در بیان ژن Bax ایجاد می نماید. میردار و دیگران (۲۰۱۹) تاثیر تمرینات تناوبی فزآینده ۶ هفته ای، با تکرار ۶ جلسه در هفته، هر جلسه ۳۰ دقیقه، با سرعت ۲۵ تا ۷۰ متر بر دقیقه، ۱۰ تکرار ۱ دقیقه‌ای و استراحت فعال ۲ دقیقه‌ای؛ را بر آپوپتوزیس قلب رت‌های جوان بررسی کرده و افزایش معنی‌دار ۲۰۰ و ۳۲۰ درصدی آپوپتوزیس گروه تمرین در مقایسه با گروه کنترل ۶ هفته و گروه پایه را نشان دادند. سانتوس[8] و دیگران (۲۰۱۹) نشان داده اند که سیستم شبه افیونی قلبی ناشی از تمرین ورزشی، آپوپتوزیس میتوکندریایی را در موش‌های چاق کاهش می‌دهد و هر دو نوع تمرین حجم ورزشی پایین (۱۵۰ دقیقه در هفته) و حجم ورزشی بالا (۳۰۰ دقیقه در هفته)، باعث هایپرتروفی فیزیولوژیک قلبی، بهبود فشارخون سیستولیک و شاخص‌های چاقی می شوند؛ اما فقط تمرین با حجم ورزشی بالا، افزایش توده بدنی را تعدیل می کند.

با توجه به مطالعات مختلف و نتایج ناهمسو در رابطه با تاثیر انواع فعالیت های ورزشی (از نظر شدت) و نقش عوامل تنظیم‌کننده آپوپتوزیس (بخصوص در عضله قلبی) و همچنین با توجه به اهمیت تمرینات هوازی و فشارهای مکانیکی و اکسایشی و متابولیکی نسبتاً شدید و طولانی‌مدت آن؛ این مطالعه با هدف بررسی نقش ۳ ماه تمرین هوازی منظم بر برخی عوامل مسیر میتوکندریایی آپوپتوزیس (بیان ژن Bcl-2 و بیان ژن Bax) در بافت قلبی رت‌های نر ویستار به اجرا درآمد.

روش تحقیق

این تحقیق در چهارچوب یک طرح تجربی با گروه کنترل به اجرا درآمد. با توجه به شرایط مناسب مدل حیوانی برای تحقیق حاضر، ۳۱ رت نر دو ماهه ویستار[9] ۱۴۸۴۸ از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند و پس از آشنایی با شرایط آزمایشگاه، به سه گروه (کنترل پایه سه‌ماهه، کنترل شش‌ماهه و تمرین هوازی) تقسیم گردیدند. در مراحل مختلف تحقیق، ضمن رعایت مسائل اخلاقی، مطابق دستورالعمل کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی مستخرج از دستورالعمل هلسینکی[10]، از هرگونه آزار جسمی و روش‌های غیرضروری کار با حیوانات اجتناب گردید. هم چنین پروتکل این تحقیق در کمیته پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، با شماره مرجع IR.ARUMS.REC.1397.205 به تایید رسید. جهت جلوگیری از استرس و تغییر شرایط فیزیولوژیک، حیوانات مورد مطالعه به مدت ۲ هفته تحت

1. Uncoupling protein2-
2. Liu
3. Lee
4. Santana
5. Liao
6. Cardiac fibrosis
7. Streptozotocin
8. Santos
9. Wistar
10. Helsinki

شرایط استاندارد جدید با دمای ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۵±۵۰ درصد، و چرخه تاریکی به روشنایی ۱۲:۱۲ ساعته در حیوان خانه دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز نگهداری شدند. در طی این دوره، تمامی حیوانات به صورت آزادانه از غذای استاندارد و آب استفاده کردند و میزان غذای مصرفی روزانه آن ها به صورت دقیق اندازه گیری و ثبت شد. پس از ۲ هفته نگهداری در شرایط جدید، تعدادی از نمونه‌ها به مدت ۲ هفته تحت برنامه آشنایی با نحوه فعالیت روی نوارگردان الکترونیکی هوشمند حیوانی (مدل ST۰۰۸ ساخت دانشگاه تبریز) قرار گرفتند. این نوارگردان دارای ۵ کانال مجزا بود و همه موارد از قبیل میزان شیب (مثبت و منفی)، سرعت و زمان؛ توسط برنامه هوشمند کنترل شد. در این دوره، مقدار شوک الکتریکی به میزان ۰/۱ میلی‌ولت ثابت بود. در طی دوره آشنایی، شیب نوارگردان صفر درجه، سرعت ۱۵-۱۰ متر بر دقیقه و مدت تمرین ۱۰-۵ دقیقه در روز بود. در پایان این دوره، پس از مطابقت وزنی رت ها به طور تصادفی در سه گروه همگن کنترل پایه سه ماهه (۱۰ سر)، کنترل شش ماهه (۱۰ سر) و تمرین هوازی (۱۱ سر) تقسیم شدند.

گروه تمرین هوازی، پروتکل تمرینی را به مدت ۱۲ هفته و هر هفته ۵ جلسه در قالب تمرین هوازی با شدت ۸۰-۷۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی انجام دادند. مدت زمان تمرین از ۱۰ دقیقه در روز در هفته اول شروع شد و به ۶۰ دقیقه در روز در هفته پنجم رسید و تا انتهای دوره حفظ شد. همچنین این گروه، در ابتدای جلسه تمرین، ۵ دقیقه با سرعت ۱۵-۱۰ متر بر دقیقه و شیب صفر درجه، جهت گرم کردن دویدند و شیب سرعت نوارگردان به صورت تدریجی افزایش یافت تا به مقدار مورد نظر برسد. مدت مرحله سرد کردن در هفته‌های ابتدایی حدود ۵ دقیقه و در هفته‌های پایانی حدود ۱۰ دقیقه طول کشید. کل برنامه تمرینی در طی چرخه تاریکی به انجام رسید. پروتکل تمرینی تحقیق حاضر، براساس مطالعه نایتو[1] و دیگران (۲۰۰۱) طراحی گردید. این محققین با توجه به دسترسی به امکانات لازم، پس از برآورد حداکثر اکسیژن مصرفی رت‌ها، شدت فعالیت را بر اساس سرعت و شیب نوارگردان برای هر هفته تمرینی مشخص کرده‌اند. بر این اساس، سویه، جنس، سن و وزن تقریبی آزمودنی‌های تحقیق حاضر نیز با مطالعه مذکور مطابقت داده شد. پروتکل تمرینی ۳ ماه تمرین هوازی در (جدول ۱) گزارش شده است.

جدول ۱. جزئیات برنامه ماه تمرین هوازی مورد استفاده در تحقیق حاضر

	هفته‌های تمرین هوازی											
	اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم	هفتم	هشتم	نهم	دهم	یازدهم	دوازدهم
سرعت نوارگردان (متر/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
مدت زمان تمرین (دقیقه/روز)	۱۰	۲۰	۳۵	۴۵	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰

تمامی رت‌ها ۲ روز پس از آخرین جلسه تمرین، توسط تزریق درون صفاقی کتامین (۹۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) بی‌هوش و پس از آن بخش اعظم خون (حدود ۵-۴ سی‌سی) آن‌ها از قسمت سینوس چشمی و به وسیله لوله‌های موئینه هپارینه جمع‌آوری شد. با توجه به هدف تحقیق حاضر، پس از جراحی، بافت قلب آزمودنی‌ها برداشته و وزن‌کشی شد. سپس نمونه در کرایوتیوب[2] در نیتروژن مایع قرار داده شده و برای بررسی‌های بعدی در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای استخراج RNA از نمونه‌ها، طبق روش پیشنهادی کیت Thermo K0731 ساخت کشور آمریکا و با اندکی تغییرات به شرح زیر عمل شد. حدود ۵۰ میلی‌گرم از بافت عضله قلبی در حضور ۱ میلی‌لیتر محلول RNXTM-PLUS هموژنه

1. Naito
2. Cryoteube

شده و سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس به هر میکروتیوب، ۰/۲ میلی‌لیتر کلروفروم افزوده شد و میکروتیوب به شدت با دست به مدت ۱۵ ثانیه تکان داده شد و ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه انکوبه گردید. در ادامه به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط ۴ درجه و ۱۳۷۰۰ برابر شتاب جاذبه، سانتریفیوژ شد. سپس به دقت و بدون تکان دادن تیوب، فاز روئی که حاوی RNA بود، جداسازی گردید و به میکروتیوب دیگر منتقل شده و به محلول جداشده حجم مساوی از ایزوپروپانول[1] سرد اضافه گردید و برای ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه انکوبه شد. بعد از آن، میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در شرایط ۴ درجه و ۱۳۷۰۰ برابر شتاب جاذبه، سانتریفیوژ گردید و مایع روئی بیرون ریخته شده و سپس ۱ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد به میکروتیوب اضافه گردید. بلافاصله میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه در شرایط ۴ درجه و ۱۳۷۰۰ برابر شتاب جاذبه،سانتریفیوژ شد، مایع رویی بیرون ریخته شد و به دقت اتانول خالی شد و حدود ۲۰ دقیقه اجازه داده شد تا الکل تبخیر گردد. سپس مجدداً به هر میکروتیوب ۰/۰۲ میلی‌لیتر آب تیمارشده با دی‌اتیل‌پیروکربنات[2] افزوده شد. RNA استخراج‌شده برای استفاده بعدی در دمای ۷۰- درجه نگهداری گردید. در رابطه با ساخت cDNA[3]، از کیت سنتز DNA ساخت شرکت فرمنتاس کانادا[4] و طبق دستورالعمل شرکت سازنده بصورت زیر استفاده شد. ۱ میکرولیتر RNA و ۱ میکرولیتر از بافر DNase I reaction 10X [5] در یک تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد و توسط DEPC-treated eater به حجم ۹ میکرولیتر رسید. ۱ میکرولیتر DNase به تیوب اضافه گردید (برای از بین بردن آلودگی احتمالی با DNA) و پس از افزودن ۱ میلی‌لیتر از اتانول مطلق، تیوب مربوطه به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر ۷۰- درجه قرار گرفت. تیوب مربوطه به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط ۴ درجه و ۱۴۰۰۰ برابر شتاب جاذبه، سانتریفیوژ شد و پس از آن، در زیر هود به دقت اتانول تخلیه گردید و حدود ۱۰ دقیقه اجازه داده شد تا الکل تبخیر گردد. به تیوب مربوطه ۱۱ میکرولیتر DEPC-treated water و ۱ میکرولیتر Primer oligi (dt) یا Ran-dom hexamer Primer افزوده شد و ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه بر روی Dry block انکوبه گردید. ۴ میکرولیتر بافر reaction ۵X [6] و ۲ میکرولیتر dNTP ۱۰mM mix و ۱ میکرولیتر مهارکننده بیان ریبونوکلئاز ریبولاک[7] به تیوب افزوده شد و پس از سانتریفیوژ مختصر، به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه گردید. ۱ میکرولیتر آنزیم RverertAID TM H Minus M-MuLV Reverse به تیوب قبل افزوده شد. در ادامه، در صورت استفاده از پرایمر الیگو [8] (dt)، ۶ دقیقه در ۴۲ درجه و در صورت استفاده از Random hexamer primer، ابتدا ۵ دقیقه در ۲۵ درجه و به دنبال آن، ۹۰ دقیقه در ۴۲ درجه انکوبه‌گردید. واکنش با قرار دادن تیوب به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه پایان پذیرفت و نمونه در فریزر ۷۰- درجه نگهداری شد.

برای اندازه‌گیری میزان بیان ژنی پروتئین‌های مورد نظر، از دستگاه روتور ژن ۶۰۰۰ ساخت شرکت کوربت آمریکا[9] استفاده شد. جفت پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از نرم‌افزار Primer ۳ طراحی و توسط بایونرآلمان[10] سنتز شده و برای کار با غلظت نهایی ۱۰۰ نانومول مورد استفاده قرار گرفت. واکنش ها بر مبنای استفاده از رنگ سایبر سبز[11] انجام شد. در این روش، رنگ سایبر سبز طی واکنش Real-time PCR به DNA دو رشته‌ای متصل شده و نور فلورسنت ساطع می کرد. به عنوان بلانکاز تیوبی که حاوی همه مواد موجود در واکنش به جز cDNA بود، استفاده شد و به جای cDNA به تیوب مربوطه آب تیمار شده با دی‌اتیل‌پیروکربنات اضافه گردید. پس از اتمام واکنش تکثیر، برای هر واکنش یک نمودار ترسیم شد و بر این اساس، CT تعیین گردید. در پایان، قبل از آنالیز داده‌ها، منحنی ذوب[12] بدست آمده از هر واکنش Real-time PCR بررسی شد تا پیک مربوط به ژن مورد نظر و فقدان پرایمر دایمر تایید شود. برای آنالیز داده‌ها ابتدا ΔCt ژن در هر نمونه از افتراق Ct ژن مربوطه و Ct ژن بتا-اکتین به عنوان رفرنس محاسبه شد (جدول ۲). فرمول‌ها برای محاسبه به ترتیب زیر می‌باشد:

$$\Delta CT = CT\ target - CT\ reference$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT\ test\ sample - \Delta CT\ control\ sample$$

در رابطه با روش‌های تجزیه و تحلیل آماری، ابتدا توزیع طبیعی داده ها توسط آزمون شاپیرو - ویلک[13] مورد ارزیابی قرار گرفت. برابری واریانس‌های گروه‌های مختلف

1. Isopropanol
2. Diethyl pyrocarbonate (DEPC)
3. Complementary DNA
4. RevertAID TM first standard cDNA synthesis
5. DNase I reaction buffer 10X
6. Reaction buffer 5X
7. Ribolock ribonuclease transcription inhibitor
8. Oligo dt
9. Rotor gene6000-, Corbett company, USA
10. Bioneer, Germany
11. Syber green
12. Melting curve
13. Shapiro-Wilk test

جدول ۲. توالی پرایمرها

Genes	Primer sequence Product	length (bp)
Bcl2	F: 5'TATATGGCCCCAGCATGCGA3' R: 5'GGGCAGGTTTGTCGACCTCA3	136
Bax	F:5'ATCCAAGACCAGGGTGGCTG3' R:5'CACAGTCCAAGGCAGTGGGA3'	150
β-actin	F: 5'CTCTGTGTGGATCGGTGGCT3' R:5'GCAGCTCAGTAACAGTCCGC3	138

در شاخص‌های اندازه‌گیری‌شده، توسط آزمون لون[1] بررسی شد. سپس داده‌های حاصله توسط آزمون تحلیل واریانس یک راهه[2] و آزمون تعقیبی بونفرونی[3] برای تعیین اختلاف میزان شاخص‌های مورد نظر بین گروه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفتند. تمامی محاسبات آماری در سطح معنی‌داری p<۰/۰۵ و با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۲۲ انجام شد.

یافته‌ها

میانگین و انحراف استاندارد ویژگی‌های فیزیکی رت های نر ویستار شامل وزن بدن، وزن قلب و نسبت وزن قلب به وزن بدن و همچنین شاخص‌های مربوط به مسیر میتوکندریایی آپوپتوزیس عضله قلبی شامل بیان ژن Bcl-2 و Bax در جدول ۳ گزارش شده است.

جدول۳. توصیف ویژگی‌های فیزیکی رت های نر ویستار

متغیرها	گروه ها	تعداد	میانگین ± انحراف استاندارد
وزن بدن (گرم)	کنترل سه ماهه	۱۰	۱۷۳/۸۰ ± ۹/۲۱
	کنترل شش ماهه	۱۰	۴۰۱/۱۸ ± ۱۴/۲۰
	تمرین هوازی	۱۱	۳۳۹/۵۶ ± ۱۱/۴۸
وزن قلب (گرم)	کنترل سه ماهه	۱۰	۰/۵۵ ± ۰/۰۵
	کنترل شش ماهه	۱۰	۱/۰۶ ± ۰/۰۷
	تمرین هوازی	۱۱	۱/۰۸ ± ۰/۰۷
نسبت وزن قلب به وزن بدن	کنترل سه ماهه	۱۰	۳/۱۹ ± ۰/۲۵
	کنترل شش ماهه	۱۰	۲/۶۴ ± ۰/۱۷
	تمرین هوازی	۱۱	۳/۱۸ ± ۰/۲۴

با توجه به طبیعی بودن توزیع داده ها و همگنی واریانس ها در این مطالعه (p>۰/۰۵)؛ از آزمون تحلیل واریانس یک راهه استفاده شد و مشخص گردید که اختلاف معنی‌داری (p=۰/۰۰۱) بین بیان ژن Bcl-۲ و Bax گروه‌های مختلف وجود دارد (جدول ۴).

در ادامه، با آزمون تعقیبی بونفرونی مشخص گردید که بیان ژن در بافت قلبی رت های گروه تمرین هوازی، افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل پایه سه‌ماهه و کنترل شش‌ماهه دارد (p=۰/۰۰۱). همچنین، بیان ژن Bax در بافت قلبی رت های گروه تمرین هوازی نسبت به گروه کنترل پایه (p=۰/۰۰۶)، کاهش معنی‌داری داشت؛ اما در مقایسه با گروه کنترل شش‌ماهه، کاهش معنی‌داری (p=۰/۲۱) مشاهده نشد (جدول ۵).

جدول۴. نتایج آزمون تحلیل واریانس یک راهه در مورد مقایسه بیان ژن Bcl-2 و Bax بین گروه های تحقیق

متغیر	گروه ها	تعداد	میانگین ± انحراف استاندارد	مقدار F	سطح معنی‌داری (p)
بیان ژن Bcl-2	کنترل سه ماهه	۱۰	۱/۲۳ ± ۰/۲۲	۲۵۸/۹۲۲	۰/۰۰۱*
	کنترل شش ماهه	۱۰	۱/۳۰ ± ۰/۲۳		
	تمرین هوازی	۱۱	۳/۹۰ ± ۰/۳۵		
بیان ژن Bax	کنترل سه ماهه	۱۰	۱/۱۵ ± ۰/۴۱	۱۲/۴۱۱	۰/۰۰۱*
	کنترل شش ماهه	۱۰	۱/۰۱ ± ۰/۳۳		
	تمرین هوازی	۱۱	۰/۷۴ ± ۰/۱۶		

*نشانه تفاوت معنی دار بین گروه ها در سطح p<۰/۰۵.

1. Levene test
2. One way-analysis of variance (ANOVA)
3. Bonferroni post hoc test

جدول ۵. نتایج آزمون تعقیبی بونفرونی در مورد مقایسه زوجی بیان ژن Bcl-2 و Bax در گروه های شرکت کننده در مطالعه

متغیرها		گروه ها	اختلاف میانگین	سطح معنی‌داری
بیان ژن Bcl-2	تمرین هوازی	کنترل سه ماهه	-۲/۶۶	۰/۰۰۱*
		کنترل شش ماهه	-۲/۶۰	۰/۰۰۱*
بیان ژن Bax	تمرین هوازی	کنترل سه ماهه	-۰/۴۱	۰/۰۰۶*
		کنترل شش ماهه	-۰/۲۶	۰/۲۱

*نشانه تفاوت معنی دار با گروه کنترل در سطح p<۰/۰۵.

بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که بیان ژن Bcl-2 در بافت قلبی رت های نر ویستار به دنبال سه ماه تمرین هوازی، افزایش می یابد. این در حالی بود که بیان ژن Bax در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل پایه دچار کاهش شد، اما با گروه کنترل شش‌ماهه، تفاوت معنی‌داری نداشت. در تأیید نتایج تحقیق حاضر، در تحقیقی در سال ۲۰۱۲، ضمن بررسی تأثیر ۶ هفته تمرین ورزشی نوارگردان بر قطعه قطعه شدن DNA و پیام دهی آپوپتوزیس در عضله نعلی رت‌های پرفشارخون، نشان داده شد که تمرین استقامتی منظم (سرعت ۲۱ متر/دقیقه با شیب ۴/۵ درصد، ۴۵ دقیقه/روز، ۵ روز/هفته، با شدت ۶۰-۷۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی) شاخص‌های پیش‌آپوپتوزی (Bax و سیتوکروم c) را کاهش و برعکس، عوامل ضد - آپوپتوزی (Bcl-2 و XIAP[1]) را افزایش می‌دهد (مک میلان[2] و دیگران، ۲۰۱۲). پروتئین‌های پیش‌آپوپتوزی مانند Bax با کاهش پایداری غشای بیرونی میتوکندری، می‌توانند منتج به رهایش عوامل آپوپتوزی از فضای بین غشایی شوند. این در حالی است، پروتئین‌های ضد- آپوپتوزی خانواده Bcl-2 با فعالیت پیش‌آپوپتوزی پروتئین Bax مخالفت کرده و موجب حفظ یکپارچگی غشای میتوکندری می‌شوند. پروتئین Bcl-2، بر روی غشای داخلی میتوکندری واقع شده و فعالیت کاسپاز-۳ را مهار می‌کند. یکی از راه‌های توقف کاسپاز-۳ توسط Bcl-2، مهار رهاسازی سیتوکروم c توسط میتوکندری است، که کوفاکتوری ضروری جهت فعال‌سازی آن محسوب می‌شود. آپوپتوزیس نیازمند سنتز پروتئین تازه و RNA بوده و مهار سنتز آن توسط عواملی نظیر داکتینومایسین[3] انجام می‌شود. در تحقیقی نشان داده شد که فعالیت ورزشی هوازی در طول ۱۳ هفته، هر هفته ۶ جلسه، هر جلسه ۱ ساعت دویدن روی نوارگردان با سرعت تدریجی ۳-۱۸ متر/دقیقه از روز اول تا آخر دوره تمرینی؛ بیان ژن و بیان پروتئین همه عوامل ضد- آپوپتوزی را در عضله قلبی افزایش می‌دهد (سانتانا و دیگران، ۲۰۱۴). احتمال بر این است که تمرین هوازی باعث ایجاد سازگاری‌های آپوپتوتیکی در عضلات اسکلتی و قلبی شده و از طریق تأثیر بر نفوذپذیری غشای میتوکندری، کاهش آپوپتوزیس را به دنبال داشته باشد همچنین احتمالاً، تمرینات هوازی بتوانند از طریق کنترل و بهبود فرآیند آپوپتوزیس، مانع از بین رفتن کاردیومیوسیت‌ها و نهایتاً مرگ سلولی سلول‌های قلبی شوند. در تحقیقی دیگر، تأثیر فعالیت ورزشی هوازی بر شاخص‌های آپوپتوزی و رشدی در قلب رت‌های پیر بررسی و نتایج نشان داده شد که مقادیر بیان ژن Bax در گروه تمرین کم‌شدت نسبت به گروه کنترل افزایش غیرمعنی‌دار، اما در گروه تمرین شدید افزایش معنی‌داری پیدا می کند. به علاوه، مقادیر بیان ژن Bcl-2 در گروه تمرین کم‌شدت و شدید نسبت به گروه کنترل، افزایش غیرمعنی‌داری نشان داد (سوری و دیگران، ۲۰۱۹). دیگر محققین با هدف تعیین اثر دو شیوه تمرینی تداومی و تناوبی هوازی بر آپوپتوزیس عضله نعلی موش‌های صحرایی نر، نشان داده اند که بیان ژن Bcl-2 گروه‌های تمرین به طور معنی‌دار بیشتر از گروه کنترل است، اما نسبت Bax به Bcl-2 در هر دو گروه تمرینی به صورت معنی‌دار کمتر از گروه کنترل بود. بین گروه ها در بیان ژن Bax تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد و به نظر می‌رسد ۱۲ هفته تمرین هوازی مخصوصاً از نوع تداومی، تأثیر قابل توجهی بر افزایش پروتئین ضد- آپوپتوزی میتوکندریایی عضله نعلی دارد. در عین حال، این محققین به دلیل پایین بودن سطح معنی‌داری نسبت Bax به Bcl-2 در گروه‌های تمرین نسبت به گروه کنترل، اظهار نظر قطعی در مورد تأیید تمرینات ورزشی بر شاخص‌های مربوط به آپوپتوزیس عضله اسکلتی را منوط به انجام مطالعات بیشتر دانسته اند (سیاه‌کوهیان و دیگران، ۲۰۱۸). اثر تمرین منظم تناوبی پرشدت بر سطوح مغزی Bax و Bcl-2 نیز بررسی شده و نتایج نشان داده که ۸ هفته

1. X-linked inhibitor of apoptosis protein
2. McMillan
3. Dactinomycin

تمرین تناوبی پرشدت، موجب کاهش سطوح مغزی Bax در موش‌های صحرایی و افزایش معنی‌دار سطوح مغزی Bcl-2 در موش‌های گروه تمرین می‌شود (حسنی و حبیبیان، ۲۰۱۸). به نظر می‌رسد تمرینات تناوبی پرشدت، بخشی از اثرات حفاظتی خود را در مقابل با آپوپتوزیس ناشی از پیری، به واسطه افزایش پروتئین ضد - آپوپتوتیک Bcl-2 و سرکوب پروتئین پیش- آپوپتوتیک Bax در مغز میانجی‌گری می نمایند. با استناد به یافته‌های موجود در تحقیق حاضر، احتمالاً تمرینات هوازی منظم می توانند میزان آپوپتوزیس سلولی را از طریق افزایش بیان ژن Bcl-2؛ کاهش داده و روند ضعف عضلات بدن را بهبود بخشند. در تحقیقی دیگر، تأثیر تمرین استقامتی بر ایجاد آپوپتوزیس در عضله مخطط مورد بررسی قرار گرفته و مشخص گردیده که شاخص‌های عامل القاکننده آپوپتوزیس[1] و Bax/Bcl-2 در هر دو عضله نعلی و قلبی حیوانات تمرین‌کرده، کاهش می یابند. میزان پروتئین Bax میتوکندریایی و سیتوکروم c سیتوزولی تحت شرایط استرس اکسیداتیو تنها در عضله قلبی افزایش یافت. همچنین افزایش ناشی از هیدروژن پراکسید[2] در P-JNK[3] و Bax میتوکندریایی و عامل القاکننده آپوپتوزیس سیتوزولی نیز در عضله قلبی حیوانات تمرین‌کرده مشاهده شد. محققین اشاره کرده اند که استرس اکسیداتیو کوتاه‌مدت در شرایط آزمایشگاهی، می‌تواند موجب القای پیام‌های آپوپتوزی در عضلات مخطط شود؛ ضمن آن که استرس اکسیداتیو ناشی از آپوپتوزیس را در بافت‌های ویژه‌ای از جمله عضله قلبی، کاهش می دهد (وینشتین[4] و دیگران، ۲۰۱۱). همزمان با افزایش استرس اکسیداتیو، جابه‌جا شدن و قرارگیری پروتئین Bax در غشای بیرونی میتوکندری زیاد می‌شود. این بحث، تا حدودی می‌تواند به فعال شدن JNK سیتوزولی بستگی داشته باشد؛ زیرا JNK با فسفریله شدن توسط محرک‌های استرس سلولی، پروتئین Bcl-2 را مهار می‌نماید. JNK در داخل میتوکندری، نفوذپذیری غشای میتوکندری را افزایش داده و لذا رهایش عوامل پیش - آپوپتوزی همچون AIF و سیتوکروم c را باعث می‌شود و از این طریق، آبشار کاسپازی راه‌اندازی می‌شود. در رابطه با تمرین ورزشی تحقیق حاضر و با توجه به پیشینه نظری تحقیق و بر اساس اطلاعات موجود از سایر مطالعات، به نظر می‌رسد در سطوح مشابهی از درجه اکسیداتیو، JNK کمتری فسفریله شده است که متعاقب آن، بیان ژن Bcl-2 افزایش یافته است؛ این یک فرضیه بوده و نیازمند بررسی دقیق آزمایشگاهی می‌باشد.

علیرغم این ها، یافته های ناهمسویی نیز وجود دارد. در سال ۲۰۰۸، تأثیر فعالیت ورزشی تناوبی بر Bax و Bc1-2 در عضله اسکلتی موش‌های صحرایی بررسی گردید و فعالیت ورزشی تناوبی به‌صورت معنی‌داری نسبت Bax/Bcl-2 را در عضله اسکلتی تند انقباض افزایش داد. همچنین، بیان Bcl-2 در گروه فعالیت ورزشی، به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه تمرین تناوبی بود (چن[5] و دیگران، ۲۰۰۸). احتمالاً علت کاهش بیان ژن Bcl-2 و ناهمسو بودن این نتایج مطالعه با تحقیق حاضر، مربوط به متفاوت بودن پروتکل تمرینی باشد. فعالیت‌های حاد و کوتاه‌مدت باعث افزایش گونه‌های فعال اکسیژنی و در نتیجه، افزایش آپوپتوزیس می‌شوند. در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شده که ۶ ماه تمرین استقامتی موجب کاهش بیان پروتئین Bcl-2 در میوکارد موش‌های صحرایی می‌شود. محققان اشاره داشته اند که تمرین استقامتی طولانی‌مدت به دلیل افزایش استرس اکسیداتیو، می‌تواند موجب بروز آپوپتوزیس در عضله قلبی شود (لی[6] و دیگران، ۲۰۰۹). ناهمسو بودن نتایج احتمالا مربوط به سیستم آنتی اکسیدانی آزمودنی‌های باشد؛ زیرا سیستم های آنزیمی نظیر آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز[7] ، گلوتاتیون پراکسیداز[8] و کاتالاز[9] نقش مهمی در مهار گونه‌های فعال اکسیژنی دارند. عوامل بسیاری وجود دارند که ممکن است تعیین کنند، آیا فعالیت ورزشی موجب افزایش اثر تخریبی گونه‌های فعال اکسیژن می شود یا خیر؟ مهم ترین این عوامل، شدت مطلق فعالیت ورزشی است. از دیگر عوامل تعیین کننده، درجهٔ استرس اکسیداتیو (اثر تخریبی ROS)، درجهٔ آمادگی آزمودنی‌ها، خستگی آزمودنی‌هایی که تمرین ورزشی را اجراء می‌کنند، و در نهایت، برنامه غذایی آزمودنی ها می باشد. احتمال دیگر در رابطه با افزایش آپوپتوزیس، برخی از پروتئین‌های اسکلت سلولی می‌باشند که بهنگام افزایش استرس اکسیداتیو، به داخل میتوکندری رفته و نفوذپذیری غشایی را افزایش می‌دهند. بررسی این عوامل در تحقیق حاضر مقدور نبود، ولی شواهد موجود نشان‌دهنده این است که سطوح این پروتئین‌ها با تمرین ورزشی تغییر محسوسی نمی کند. اگرچه سازوکارهای متعددی مانند تغییر مستقیم در وضعیت ROS و بیان ژن های مربوط به آپوپتوزیس، کاهش آزادسازی عوامل آپوپتوتیک میتوکندری، و تغییر در تولید آنتی اکسیدان ها برای اثرات محافظتی تمرینات ورزشی در مقابل آپوپتوزیس مطرح شده است، ولی هنوز ابهامات بسیاری در این زمینه وجود دارد. به نظر می‌رسد،

1. Apoptosis inducing factor
2. Hydrogen peroxide (H2O2)
3. Phosphorylated-c-Jun-N-terminal kinase
4. Vainshtein
5. Chen
6. Li
7. Superoxide dismutase
8. Glutathione peroxidase
9. Catalase

میتوکندری نقش مهمی در تنظیم آپوپتوزیس سلول های عضله قلبی بازی می‌کند. در این راستا، اعضای خانواده Bcl-2 شامل پروتئین‌های Bax و Bcl-2 به عنوان پروتئین های اصلی، در شکل‌گیری کانال‌های آپوپتوزی، تنظیم نفوذپذیری میتوکندری و پیام‌های آپوپتوزی میتوکندریایی درگیر می‌شوند. متعاقب تمرین ورزشی – مشابه با اثر تمرین استقامتی تحقیق حاضر- علی‌رغم وجود فشار استرس اکسیداتیو مشابه با زمان بدون تمرین ورزشی، فسفوریلاسیون JNK کمتر اتفاق می‌افتد؛ وضعیتی که افزایش بیان ژن پروتئین Bcl-2 را به دنبال دارد. علاوه بر این، جابه‌جایی و انتقال عامل القاکننده آپوپتوزیس که خود در شرایط استرس اکسیداتیو زیاد می شود، در عضله قلبی تمرین‌کرده کاهش یافته و دال بر مهار سیگنال آپوپتوزی است. در رابطه با نفوذپذیری غشای میتوکندری، موارد دیگری نیز مورد بحث و بررسی قرار گرفته است؛ در برخی مطالعات گزارش شده است که پروتئین‌های اسکلت سلولی از جمله کافیلین-۲ [1] با رخداد آپوپتوزیس در نتیجه استرس اکسیداتیو در ارتباط است. کافیلین-۲ در سیتوزول قرار دارد، اما به محض اکسیده شدن، به داخل میتوکندری جابه‌جا شده و احتمالاً باعث تسهیل در امر نفوذپذیری غشای میتوکندری می‌شود. با همه شواهد موجود، اگرچه بررسی تغییرات این شاخص در این تحقیق مقدور نبود، اما مشهود است که مقادیر این پروتئین با تمرین تغییر چندانی نمی‌کند و این خود بیانگر سازگار نشدن آن با تمرین ورزشی است (کلامت [2] و دیگران، ۲۰۰۹). روش دیگر مهار آپوپتوزیس و افزایش طول عمر سلول، رابطه فعالیت ورزشی و پروتئین‌های سیرتوئین-۱ [3] است که حین فعالیت ورزشی افزایش پیدا می‌کند. این پروتئین‌ها، موجب فعال شدن پروتئین‌های پایین‌دست از جمله هم فعال کننده آلفای گیرنده فعال‌کننده تکثیری پراکسی زوم گاما [4] (PGC-1α) می‌شود؛ تغییری که متعاقب آن، عملکرد میتوکندری بهبود یافته و از ایجاد آپوپتوزیس ممانعت به عمل می آید (لای [5] و دیگران، ۲۰۱۴). با این حال، با توجه به محدودیت‌های تحقیق حاضر، بررسی تغییرات این شاخص و ارزیابی ارتباط بین آن ها با فرآیند آپوپتوزیس، مقدور نبود.

اگرچه مکانیسم‌های دقیق آپوپتوزیس ناشی از فعالیت ورزشی به طور دقیق شناخته نشده است، فرضیه‌های احتمالی زیادی وجود دارند که نیازمند بررسی‌های بیشتر می باشند. در تحقیق حاضر، میزان بیان ژن Bax در گروه کنترل شش‌ماهه تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. با توجه به مطالعات قبلی در رابطه با آپوپتوزیس و تمرین ورزشی هوازی، انتظار بر این بود که بیان ژن Bax در این گروه تغییر معنی‌داری را نشان دهد، اما چنین نشد. زمان برداشت بافت در تحقیق حاضر، عدم ارزیابی شاخص‌های التهابی درگیر در فعالیت کاسپازی همچون TNF-α و اینترلوکین -۶ [6]، عدم ارزیابی شاخص‌های مسیر خارجی آپوپتوزیس و مسیر آزادسازی کلسیم و سایر عوامل دخیل در فرآیند آپوپتوزیس؛ از جمله عواملی هستند که احتمالا در عدم دست یابی به نتایج مورد انتظار و عدم امکان جمع بندی دقیق یافته ها؛ نقش داشته اند. از طرفی، در مطالعه حاضر میزان بیان ژن Bax در گروه کنترل شش‌ماه افزایش زیادی را نسبت به گروه کنترل سه‌ماهه نشان داد؛ نتیجه ای که ممکن است بر اثر افزایش سن رت‌ها باشد.

نتیجه‌گیری: با استناد به یافته‌های تحقیق حاضر، تمرینات هوازی منظم اجرا شده به مدت ۱۲ هفته و هر هفته ۵ جلسه با مدت زمان ۱۰ الی ۶۰ دقیقه و با شدت ۸۰ -۷۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی، می توانند در کنترل آپوپتوزیس عضله قلبی نقش مهمی ایفا کنند. با این حال، اظهار نظر قطعی در مورد اثربخشی تمرینات ورزشی مختلف بر شاخص‌های مرتبط با آپوپتوزیس بافت قلبی، نیازمند اجرای تحقیقات مختلف بخصوص در حیطه بافت قلبی می‌باشد. پیشنهاد می‌شود در رابطه با تاثیر تمرینات هوازی بر آپوپتوزیس بافت قلبی، تحقیقاتی انجام شوند که در آنها امکان اندازه‌گیری تمامی شاخص‌های مرتبط با آپوپتوزیس، وجود داشته باشد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می دارند که هیچ گونه تعارض منافعی ندارند.

قدردانی و تشکر

بدین وسیله از همکاری صمیمانه مسئولین محترم دانشگاه محقق اردبیلی و دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز تشکر می شود.

1. Cofilin- 2
2. Klamt
3. Silent information regulator 1
4. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator -1alpha
5. Lai
6. Interleukin-6

منابع

Alexandra, K., Adams, M. D., Thomas, M., & Best, M. D. (2002). The role of antioxidants in exercise and disease prevention. *The Physician and Sports Medicine, 30***(5), 37-44.**

Aryamloo, P., Asgarian-Omran, H., Aslani, N., Hossein-Nataj, H., Shokohi, T., Badali, H., & Moazeni, M. (2019). Cellular apoptosis: An alternative mechanism of action for caspofungin against Candida glabrata. *Current Medical Mycology, 5***(2), 9.**

Berghe, T. V., Hulpiau, P., Martens, L., Vandenbroucke, R. E., Van Wonterghem, E., & Perry, S. W. (2015). Passenger mutations confound interpretation of all genetically modified congenic mice. *Immunity, 43***(1), 200-9.**

Blander, J. M. (2014). A long-awaited merger of the pathways mediating host defence and programmed cell death. *Nature Reviews Immunology, 14***(9), 601-18.**

Bredesen, D. E., Rao, R. V., & Mehlen, P. (2006). Cell death in the nervous system. *Nature,* **(443), 796-802.**

Chen, D. Q., Deng, S. X., & Peng, F. L. (2008). Effects of interval exercise on Bax, Bcl-2 and correlated factors in rats' skeletal muscles. *Journal of Beijing Sport University,* **7-19.**

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology, 35***(4), 495-516.**

Garcia-Saez, A. J. (2012). The secrets of the Bcl-2 family. *Cell Death & Differentiation, 19***(11), 1733-40.**

Gharakhanlou, R., & Mollanouri, M. (2016). *A look at cellular and molecular adaptations to exercise***. Hatmi Publications. [Persian]**

Ghased, F., & Bashiri, J. (2020). The effect of twelve weeks aerobic training with Rose damascene supplementation on expression of Caspase 3 and 9 genes of soleus muscle in male rats. *Pars Medical Sciences Magazine, 17***(1), 42-51. [Persian]**

Hasani, S., & Habibian, M. (2018). The effect of regular intermittent exercise on some apoptotic indicators in the brain tissue of old female rats. *Faze Publisher,* **22(3), 128-33. [Persian]**

Kile, B. T. (2014). The role of apoptosis in megakaryocytes and platelets. *British Journal of Haematology,* **165(2), 217-26.**

Klamt, F., Zdanov, S., Levine, R. L., Pariser, A., Zhang, Y., Zhang, B., ... & Shacter, E. (2009). Oxidant-induced apoptosis is mediated by oxidation of the actin-regulatory protein cofilin. *Nature Cell Biology, 11***(10), 1241-1246.**

Ko, I. G., Kim, S. E., Kim, C. J., & Jee, Y. S. (2013). Treadmill exercise alleviates aging-induced apoptosis in rat cardiac myocytes. *International Journal of Gerontology, 7***(3), 152-7.**

Konstantinidis, K., Whelan, R. S., & Kitsis, R. N. (2012). Mechanisms of cell death in heart disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 32***(7), 1553-62.**

Korsmeyer, S. J. (1999). Programmed cell death and the regulation of homeostasis. *Harvey Lectures, 95***, 21-40.**

Kwak, H. B. (2013). Effects of aging and exercise training on apoptosis in the heart. *Journal of Rehabilitation, 9***(2), 209-12.**

Lai, C. H., Ho, T. J., Kuo, W. W., Day, C. H., Pai, P. Y., Chung, L. C., ... & Huang, C. Y. (2014). Exercise training enhanced SIRT1 longevity signaling replaces the IGF1 survival pathway to attenuate aging-induced rat heart apoptosis. *Age, 36***(5), 1-13.**

Li, Q., Zhou, L. Y., Gao, G. F., Jiao, J. Q., & Li P. F. (2012). Mitochondrial network in the heart. *Protein & Cell, 3***(6), 408-10.**

Li, X., Lu, J., & Wu, W. (2009). Effect of long-term endurance exercise on cardiac apoptosis. *Journal of Mainyang Normal University, 71***(11), 031.**

Liao, P. H., Hsieh, D. J. Y., Kuo, C. H., Day, C. H., Shen, C. Y., Lai, C. H., ... & Huang, C. Y. (2015). Moderate exercise training attenuates aging-induced cardiac inflammation, hypertrophy and fibrosis injuries of rat hearts. *Oncotarget, 6***(34), 35383.**

Liu, M., Zhang, P., Chen, M., Zhang, W., Yu, L., Yang, X. C., & Fan, Q. (2012). Aging might increase myocardial ischemia/ reperfusion-induced apoptosis in humans and rats. *Age, 34***(3), 621-632.**

McMillan, E.M., Graham, D.A., Rush, J.W., & Quadrilatero, J. (2012). Decreased DNA fragmentation and apoptotic signaling in soleus muscle of hypertensive rats following 6 weeks of treadmill training. Journal of *Applied Physiology, 113***(7), 1048-57.**

Mirdar, S., Moghadasi, N., & Hamidian, Gh. (2020). The effect of increasing interval exercise on cardiac apoptosis in young rats. *Journal of Sport Biological Sciences, 11***(1), 49-61. [Persian]**

Morton, J. P., Kayani, A. C., McArdlr, A., & Drust, B. (2009). The exercise-induced stress response of skeletal muscle, with specific emphasis on humans. *Sports Medicine, 39***(8), 643-62.**

Nagata, S., &Tanaka, M. (2017). Programmed cell death and the immune system. *Nature Reviews Immunology, 17***(5), 333-40.**

Naito, H., Powers, S. K., Demirel, H. A., & Aoki, J. (2001). Exercise training increases heat shock protein in skeletal muscles of old rats. *Medicine and Science in Sports and Exercise, 33***(5), 729-34.**

Ola, M. S., Nawaz, M., & Ahsan, H. (2011). Role of Bcl-2 family proteins and caspasesin the regulation of apoptosis. *Molecular and Cellular Biochemistry, 351***(1-2), 41-58.**

Peterson, J. M., Bryner, R. W., Sindler, A., Frisbee, J. C., & Always, S. E. (2008). Mitochondrial apoptotic signaling is elevated in cardiac but not skeletal muscle in the obese Zucker rat and is reduced with aerobic exercise. *Journal of Applied Physiology, 105***(6), 1934-43.**

Quadrilatero, J., Alway, S. E., & Dupont-Versteegden, E. E. (2011). Skeletal muscle apoptotic response to physical activity: potential mechanisms for protection. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism, 36***(5), 608-617.**

Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M.,& Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. *Free Radical Biology and Medicine, 49***(11), 1603-16.**

Roh, J., Rhee, J., Chaudhari, V., & Rosenzweig, A. (2016). The role of exercise in cardiac aging. *Circulation Research, 118***(2), 279-95.**

Santana, E. T., Serra, A. J., Silva Junior, J. A., Bocalini, D. S., Barauna, V. G., Krieger, J. E., & Tucci, P. J. F. (2014). Aerobic exercise training induces an anti-apoptotic milieu in myocardial tissue. *Motriz: Revista de Educação Física, 20***(2), 233-38.**

Santos, B. A., Machado, M. V., Menezes, A. C., Velasco, L. L., Fragoso, V. S., & Vieira, A. B. (2019). Exercise-induced cardiac opioid system activation attenuates apoptosis pathway in obese rats. *Life Sciences, 231***(6), 116542.**

Saraste, A., Pulkki, K., Kallajoki, M., Heikkila, P., Laine, P., & Mattila, S. (1999). Cardiomyocyte apoptosis and progression of heart failure to transplantation. *European Journal of Clinical Investigation, 29***(5), 380-6.**

Sari-Sarraf, V. (2016). Effect of creatine supplementation on the factors involved in apoptosis-related process (Bax, Bcl-2) and their ratio (Bcl-2/Bax) during acute resistance exercise in middle-aged men. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences, 21***(4), 17-28. [Persian]**

Scott, I. (2010). The role of mitochondria in the mammalian antiviral defense system. *Mitochondrion, 10***(4), 316-20.**

Siahkohian, M., Asgharpour-Arshad, M., Bolboli, L., Jafari, A., & Sheikhzadeh-Hesari, F. (2018). Effect of 12-week aerobic training on some indices of skeletal muscle apoptosis in male rats. *Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services, 39***(6), 35-43. [Persian]**

Souri, R., Yar, A., Shabkhiz, F., & Eskandari, A. (2019). The effect of aerobic exercise on apoptosis and growth indices in the heart of old rats. *University of Tehran Biological Sciences Journal, 10***(4), 435-47. [Persian]**

Tanoursaz, S., Behpour, N., & Tadibi, V. (2019). The effect of mid-term aerobic training on apoptotic markers in the muscle cells of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Fasa University of Medical Sciences, 7***(4), 488-97. [Persian]**

Tower, J. (2015). Programmed cell death in aging. *Ageing Research Reviews, 23*, **90-100.**

Vainshtein, A., Kazak, L., & Hood, D. A. (2011). Effects of endurance training on apoptotic susceptibility in striated muscle. *Journal of Applied Physiology, 110*(**6**), **1638-45.**

Ziaaldini, M. M., Koltai, E., Csende, Z., Goto, S., Boldogh, I., & Taylor, A. W. (2015). Exercise training increases anabolic and attenuates catabolic and apoptotic processes in aged skeletal muscle of male rats. *Experimental Gerontology, 67*(**3**), **9-14.**