

تأثیر سه ماه تمرین هوازی تناوبی بر بیان برخی از ژن‌های مسیر میتوکندریایی آپوپتوز عضله اسکلتی موش‌های صحرایی

دکتر مسعود اصغرپور ارشد^۱، پروفیسور معرفت سیاه‌کوهیان^۲، دکتر لطفعلی بلیلی^۳، دکتر افشار جعفری^۴، دکتر فرزاد شیخ زاده حصار^۵

چکیده

سابقه و هدف: آپوپتوز یک فرآیند سلولی محافظت‌کننده است که نقش مهمی در توسعه و هومئوستاز بافت طبیعی و نیز عوامل پیدایش بیماری‌ها بازی می‌کند. برخی شواهد حاکی است که تمرینات ورزشی ممکن است مسیرهای پیام‌رسانی آپوپتوز در عضله اسکلتی را تحت تأثیر قرار دهد. بنابراین، مطالعه حاضر با هدف تعیین تأثیر سه ماه تمرین هوازی تناوبی بر برخی از شاخص‌های آپوپتوز عضله نعلی موش‌های صحرایی نر انجام گردید.

مواد و روش‌ها: در یک مطالعه تجربی، ۲۰ سر موش صحرایی نر سه ماهه به شکل تصادفی به دو گروه همگن تمرین تناوبی و کنترل (هر گروه ۱۰ سر) تقسیم شدند. گروه تمرین به مدت سه ماه در برنامه‌ی تمرین هوازی تناوبی شرکت کردند. جراحی آزمودنی‌ها ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه‌ی تمرین انجام و بیان ژن‌های Bax، Bcl-2 و کاسپاز-۳ عضله نعلی با استفاده از روش Real Time-PCR بررسی شد. داده‌ها با استفاده از آزمون t مستقل در سطح معنی‌داری $P \leq 0.05$ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: یافته‌ها نشان داد که بیان ژن Bcl-2 در گروه تمرین به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود ($P=0.002$) و نسبت Bax به Bcl-2 در گروه تمرین به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود ($P=0.048$). این در حالی است که بیان ژن Bax و کاسپاز-۳ در دو گروه تفاوت معنی‌داری نداشت، با این حال بیان این پروتئین‌ها در گروه تمرین تناوبی به ترتیب ۴۴ و ۲۱ درصد کمتر از گروه کنترل بود. **نتیجه‌گیری:** به طور کلی به نظر می‌رسد سه ماه تمرین هوازی بر افزایش پروتئین ضد آپوپتوز میتوکندریایی عضله نعلی تأثیر قابل‌توجهی دارد. با این حال و با توجه به عدم تغییر معنی‌دار بیان ژن کاسپاز-۳، اظهار نظر قطعی در مورد تأثیر تمرینات ورزشی بر شاخص‌های مربوط به آپوپتوز عضله اسکلتی، منوط به انجام مطالعات بیشتری می‌باشد.

واژگان کلیدی: تمرین هوازی تناوبی، عضله اسکلتی، آپوپتوز، کاسپاز-۳.

۱. استادیار گروه تربیت بدنی، دانشگاه علوم انتظامی امین، تهران، ایران

۲. استاد گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روان‌شناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران (نویسنده مسئول)، m_siahkohian@uma.ac.ir

۳. دانشیار گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روان‌شناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۴. دانشیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۵. دانشیار گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

مقدمه

آپوپتوز یک فرآیند سلولی محافظت‌کننده است که نقش مهمی در توسعه و هومئوستاز بافت طبیعی و نیز عوامل پیدایش بیماری‌ها بازی می‌کند. این پدیده در شرایط طبیعی باعث می‌شود که سلول‌های پیر، آسیب‌دیده، اضافی و مضر حذف شود و برای تکامل و ترمیم بافت ضروری است. هرگونه اختلال در روند آپوپتوز، کاهش یا افزایش نامتعارف مرگ سلولی و در نهایت بیماری را موجب می‌شود (۱-۴). پیام‌های آپوپتوزی به طور عمده توسط دو مسیر کنترل می‌شوند. مسیر داخلی شامل پیام‌رسانی و متعاقب آن آزادسازی عوامل آپوپتوزی مانند AIF، Smac و سیتوکروم c از میتوکندری می‌باشد. این عوامل مشتق از میتوکندری هم می‌تواند آشناری از آنزیم‌های پروتئولیتیک را که کاسپاز نامیده می‌شوند فعال نماید و هم به طور مستقیم وارد هسته شده و قطعه قطعه شدن DNA را تحریک کند و نهایتاً منجر به آپوپتوز شود. مسیر خارجی نیز با فعال‌سازی چندین گیرنده‌ی مرگ مثل $TNF-\alpha$ می‌تواند به فعال‌سازی کاسپاز، قطعه قطعه شدن DNA و آپوپتوز منجر شود (۳). نهایت مسیرهای آپوپتوزی فعال‌سازی کاسپازهای اثر کننده‌ی متداول از جمله کاسپاز-۳ می‌باشد که باعث تخریب احتمالی سلول می‌شود (۵-۹). رویدادهای مولکولی که منجر به فعال‌سازی و اجرای برنامه‌ی آپوپتوتیکی می‌شوند، اغلب به واسطه‌ی تعادل بین پروتئین‌های پیش و ضدآپوپتوزی کنترل می‌شوند (۷، ۱۰). خانواده‌ی پروتئین‌های Bcl-2 به عنوان تنظیم‌کننده‌های بالا دست آپوپتوز شامل پروتئین‌های Bax و Bcl-2 به عنوان پروتئین‌های کلیدی مشهور در شکل‌گیری کانال‌های آپوپتوزی و تنظیم پیام‌های آپوپتوز میتوکندریایی شناخته شده‌اند (۵، ۷، ۹). اگر چه اکثر مسیرها و مولکول‌های کنترل کننده‌ی آپوپتوز در همه‌ی بافت‌ها مشابه است، اما عضله‌ی اسکلتی از چند جنبه منحصر به فرد می‌باشد. در اکثر موارد آپوپتوز باعث از بین رفتن سلول می‌شود، اما عضله‌ی اسکلتی یک بافت چند هسته‌ای می‌باشد که در آن فقط یک هسته می‌تواند دستخوش قطعه قطعه شدن DNA شود. بنابراین، آپوپتوز در عضله‌ی اسکلتی ضرورتاً موجب از بین رفتن کل سلول نمی‌شود، بلکه یک هسته‌ی خاص را از بین می‌برد که به آن آپوپتوز هسته می‌گویند (۳). پیام‌رسانی آپوپتوز عضله‌ی اسکلتی در طول پیری و چندین حالت بیماری تغییر پیدا می‌کند. بیماری‌های مزمن زیادی از قبیل دیابت، چاقی، کمبود ویتامین D، کمبود هورمون رشد و ... ممکن است با اختلال در تنظیم آپوپتوز باعث تسریع کردن کاهش توده و قدرت عضلانی و در نتیجه افزایش خطر ناتوانی جسمانی شود (۷، ۱۱). بنابراین پژوهشگران همواره به دنبال اتخاذ راهکارهای مناسب برای پیشگیری از آپوپتوز و بیماری‌های مختلف عضلانی مرتبط با آن هستند. در دهه‌ی اخیر، تاثیر فعالیت‌ها و تمرینات ورزشی بر آپوپتوز مورد علاقه‌ی محققان حوزه‌ی ورزش قرار گرفته است (۹). در این زمینه، تعدادی از محققان عنوان کردند که انجام تمرینات ورزشی با شدت متوسط و مداوم احتمالاً موجب کاهش آپوپتوز در بافت‌های مختلف می‌شود (۳، ۵، ۷، ۱۲، ۱۳). این در حالی است که بر خلاف تمرینات ورزشی، یک جلسه فعالیت ورزشی شدید تا ۴۸ ساعت می‌تواند موجب تسریع در فرآیند آپوپتوز شود (۹، ۱۴). کیم و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که تمرین هوازی میزان پروتئین ضدآپوپتوزی Bcl2 را افزایش و پروتئین Bax، نسبت Bax/Bcl2 و فعالیت کاسپاز-۳ را در عضله‌ی دوقلوی موش‌های صحرایی کاهش می‌دهد (۱۵). همچنین مک‌میلان و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که شش هفته تمرین استقامتی موجب کاهش قطعه قطعه شدن DNA، رهايش سيتوکروم c و پروتئین Bax می‌شود (۵). با این حال و برخلاف نتایج مطالعات مذکور، لیو و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که ۹ هفته تمرین استقامتی موجب افزایش معنی‌دار پروتئین Bax و نسبت Bax/Bcl2 در عضله‌ی اسکلتی موش‌های

صحرائی می‌شود (۱۶). باید به این نکته توجه نمود که تفاوت در نوع، شدت و مدت تمرینات هوازی مورد استفاده در مطالعات مختلف باعث به دست آمدن نتایج متناقضی در آپوپتوز عضله اسکلتی شده است. تمرینات تناوبی نوعی از تمرینات ورزشی است که شامل دوره‌های متغیری از فعالیت‌های ورزشی هوازی شدید با دوره‌های ریکاوری غیرفعال یا فعالیت با شدت متوسط می‌باشد (۱۷). با توجه به تأثیر بهتر تمرینات تناوبی بر برخی شاخص‌ها از جمله ظرفیت هوازی و افزایش استفاده از این تمرینات توسط ورزشکاران و افراد عادی و حتی برخی بیماران، تأثیر این نوع از تمرینات بر آپوپتوز موضوعی است که می‌تواند ذهن پژوهشگران ورزشی را به خود جلب کند. با توجه به این که تاکنون مطالعه جامعی در زمینه تأثیر تمرینات تناوبی بر آپوپتوز عضله اسکلتی انجام نشده است و اغلب مطالعات تأثیر فعالیت ورزشی حاد و تمرینات تداومی را بر آپوپتوز عضله اسکلتی مورد آزمایش قرار داده‌اند، هدف تحقیق حاضر تعیین تأثیر تمرینات تناوبی هوازی بر برخی شاخص‌های مسیر میتوکندریایی یا داخلی آپوپتوز عضله اسکلتی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی

در پژوهش تجربی - آزمایشگاهی حاضر که با مدل حیوانی انجام گردید، ۲۸ سر موش صحرائی نر از سوبه‌ی ویستار با ژنوم ۱۴۸۴۸ شرکت داشتند. در مراحل مختلف پژوهش، ضمن رعایت مسائل اخلاقی، مطابق دستورالعمل کمیته‌ی اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی مستخرج از دستورالعمل هلسینکی از هرگونه آزار جسمی و روش‌های غیرضروری کار با حیوانات اجتناب گردید. این حیوانات در سن هشت هفتگی از انستیتو پاستور ایران خریداری و به آزمایشگاه حیوانات منتقل شدند. حیوانات مورد آزمایش در این مطالعه به صورت دوتایی در قفس‌های پلی‌کربنات شفاف ساخت شرکت رازی راد و در محیطی با دمای 22 ± 3 درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت ۴۰ تا ۶۰ درصد و تحت چرخه‌ی روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲ نگهداری شدند. جهت جلوگیری از استرس و تغییر شرایط فیزیولوژیکی، آزمودنی‌ها به مدت دو هفته تحت شرایط جدید نگهداری شدند. آزمودنی‌ها به صورت آزادانه از غذای استاندارد و آب در طول دوره‌ی پژوهش استفاده کردند.

طرح تحقیق و پروتکل تمرینی

در ابتدا ۸ سر از موش‌ها به عنوان گروه پایه (کنترل سه ماهه) از بقیه جدا شدند. قبل از اجرای پروتکل تمرینی، ۲۰ سر موش باقیمانده به مدت ۲ هفته و ۵ روز در هفته تحت برنامه‌ی آشنایی با نحوه‌ی فعالیت روی نوارگردان قرار گرفتند. برنامه‌ی آشنایی شامل دویدن با سرعت ۱۰ الی ۱۵ متر بر دقیقه و به مدت ۱۰-۵ دقیقه در روز در شیب صفر درصد بود. در پایان این دوره، موش‌ها پس از مطابقت وزنی به طور تصادفی به دو گروه کنترل شش ماهه و تمرین تناوبی (هرگروه ۱۰ سر) جایگزین شدند. گروه تمرین با رعایت اصل اضافه بار و به مدت ۱۲ هفته و ۵ روز در هفته در برنامه‌ی تمرین هوازی تناوبی با شدت و مدت پیش‌رونده روی نوارگردان الکترونیکی هوشمند حیوانی شرکت کردند (۱۷-۱۹). برای گرم کردن، آزمودنی‌ها در ابتدای هر جلسه‌ی تمرینی به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰ الی ۱۵ متر در دقیقه می‌دویدند و سرعت نوار گردان به صورت تدریجی افزایش می‌یافت تا به مقدار مورد نظر برسد. همچنین بعد از تمرین، با کاهش تدریجی سرعت نوارگردان ۵ دقیقه سرد کردن انجام می‌گرفت.

کل برنامه‌ی تمرینی روی نوار گردان با شیب ۱۵ درصد و در طی چرخه‌ی تاریکی به صورت تناوبی و به شرح جدول ۱ انجام گردید.

جدول ۱. جزئیات پروتکل تمرین هوازی تناوبی سه ماهه‌ی مورد استفاده در پژوهش (۵ جلسه در هفته)

هفته‌های تمرین												
اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم	هفتم	هشتم	نهم	دهم	یازدهم	دوازدهم	
سرعت	۲۶	۲۶	۲۷	۲۷	۲۸	۲۹	۳۰	۳۱	۳۲	۳۳	۳۴	۳۵
نوارگردان (متر بر دقیقه)	۲۶	۲۶	۲۷	۲۷	۲۸	۲۹	۳۰	۳۱	۳۲	۳۳	۳۴	۳۵
تناوب شدید	۳	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴
زمان تناوب (دقیقه)	۳	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴
سرعت	۱۴	۱۵	۱۷	۲۰	۲۱	۲۲	۲۲	۲۳	۲۴	۲۵	۲۶	۲۷
نوارگردان (متر بر دقیقه)	۱۴	۱۵	۱۷	۲۰	۲۱	۲۲	۲۲	۲۳	۲۴	۲۵	۲۶	۲۷
تناوب کم	۳	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴
زمان تناوب (دقیقه)	۳	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴	۴
تعداد تکرار	۲	۳	۵	۶	۸	۸	۸	۸	۸	۸	۸	۸
مدت کل تمرین (دقیقه در روز)	۱۲	۲۴	۴۰	۴۸	۶۴	۶۴	۶۴	۶۴	۶۴	۶۴	۶۴	۶۴
شیب نوارگردان (درصد)	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵

جراحی و استخراج نمونه‌ها

موش‌های گروه کنترل سه ماهه جهت کنترل پارامترهای پایه و لحاظ شدن به عنوان گروه مرجع در روش RT-PCR قبل از شروع پروتکل تمرینی اصلی کشته شدند. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه‌ی تمرین نیز، موش‌های صحرائی گروه‌های تمرین تناوبی و کنترل شش ماهه تحت جراحی قرار گرفتند. موش‌ها ابتدا توسط تزریق درون صفاقی کتامین (۸۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) بی‌هوش شدند (۲۱). سپس توسط متخصصین کارآموده جراحی انجام و عضله‌ی نعلی آنها استخراج و در مایع فیزیولوژیک

انداخته شد. عضله‌ی نعلی موش‌ها برای بررسی میزان بیان ژنی یا mRNA پروتئین‌های Bax، Bcl-2 و کاسپاز-۳ در دمای ۷۰- درجه نگهداری شد.

استخراج RNA

برای استخراج RNA از نمونه‌ها، طبق روش پیشنهادی کیت (Thermo, K0731, USA) حدود ۵۰ میلی‌گرم از بافت عضله‌ی نعلی با استفاده از یک میلی‌لیتر AccuZol (Bioneer, South Korea) هموژنه شده و در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه انکوبه گردید. پس از اضافه کردن ۰/۲ میلی‌لیتر کلروفورم به هر میکروتیوب و تکان دادن آن با دست به مدت ۱۵ ثانیه، میکروتیوب ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه انکوبه گردید و در ادامه به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط ۴ درجه و ۱۳۷۰۰g سانتریفیوژ شد. سپس به دقت و بدون تکان دادن تیوب، قسمت بالایی که حاوی RNA بود، جدا شده و به میکروتیوب دیگری انتقال داده شد. به محلول جدا شده حجم مساوی از ایزوپروپانول سرد اضافه گردید و برای ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه انکوبه شد. سپس، میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه و ۱۳۷۰۰g سانتریفیوژ شده، مایع روئی بیرون ریخته شد و یک میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد به میکروتیوب اضافه گردید. بلافاصله میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه در شرایط ۴ درجه و ۱۳۷۰۰g سانتریفیوژ شده، مایع رویی آن بیرون ریخته شد و به دقت اتانول خالی شد و حدود ۲۰ دقیقه اجازه داده شد تا الکل تبخیر گردد. سپس در آب تیمار شده با دی اتیل پیروکربنات (DEPC) حل شد. پس از استخراج RNA، مقدار و خلوص آن توسط روش اسپکتروفوتومتری (Bio-Rad, CA, USA) تعیین گردید. همچنین، RNA تام به وسیله الکتروفورز روی ژل آگاروز حاوی اتیدیوم بروماید قرار گرفت و دو باند مشخص ۱۸s و ۲۸s مربوط به RNA ریبوزومی مشاهده و کنترل شد. RNA استخراج شده جهت استفاده در مراحل بعدی در دمای ۸۰- درجه نگهداری شد.

ساخت cDNA

طبق دستورالعمل کیت Revert AID™ First Standard cDNA synthesis (Fermentas, Canada) یک میکرولیتر RNA و یک میکرولیتر از DNase I reaction buffer 10X در یک تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شده و توسط DEPC-treated water به حجم ۹ میکرولیتر رسید. برای از بین بردن آلودگی احتمالی با DNA، یک میکرو-لیتر 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 ۱۴۰۰۰g سانتریفیوژ شد و پس از آن، در زیر هود به دقت اتانول آن خالی شده و حدود ۱۰ دقیقه اجازه داده شد تا الکل تبخیر گردد. به تیوب یک میکرولیتر DEPC-treated water و یک میکرولیتر پرایمر oligo (dt) یا پرایمر Random hexamer افزوده شد و ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه بر روی Dry block انکوبه گردید. چهار میکرولیتر 5X reaction buffer و دو میکرولیتر dNTP 10mM mix و یک میکرولیتر Ribo lock Ribo nuclease Transcription Inhibitor به تیوب افزوده شد و پس از سانتریفیوژ مختصر، به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه گردید. یک میکرولیتر Rverert Aid™ H Minus M-MuLV به تیوب اضافه گردید. در ادامه در صورت استفاده از پرایمر oligo (dt)، ۶ دقیقه در ۴۲ درجه و در صورت استفاده از پرایمر Random hexamer، ابتدا ۵ دقیقه در ۲۵ درجه و به دنبال آن ۹۰ دقیقه در ۴۲ درجه انکوباسیون

صورت گرفت. واکنش با قرار دادن تیوب به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه پایان پذیرفت و نمونه در فریزر ۷۰- درجه نگهداری شد.

Real-time PCR

اندازه گیری میزان بیان ژنی پروتئین‌های Bax، Bcl-2 و کاسپاز-۳ با استفاده از دستگاه Corbett-Rotor gene-6000 (Corbett Research Australia) انجام گردید. جفت پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از نرم افزار Primer 3 طراحی و توسط بایونیر (Bioneer-Germany) سنتز شد و با غلظت نهایی ۸۰nm مورد استفاده قرار گرفت.

پرایمرها

واکنش‌ها بر مبنای استفاده از رنگ Syber green انجام شد. رنگ Syber green طی واکنش Real-time PCR به DNA دو رشته‌ای متصل شده و نور فلورسنت ساطع می‌کند. در جدول ۲ توالی پرایمرهای بیان ژنی برای موش‌های صحرایی مشخص شده است. به عنوان بالانک از تیوبی که حاوی همه مواد موجود در واکنش به جز cDNA بود، استفاده شد و به جای cDNA، به تیوب مربوطه DEPC water اضافه گردید. پس از اتمام واکنش تکثیر، برای هر واکنش PCR یک نمودار رسم و سپس بر این اساس C_T تعیین شد. در پایان قبل از آنالیز داده‌ها، منحنی ذوب (Melting curve) 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، ΔC_T ژن در هر نمونه از افتراق C_T ژن مربوطه و C_T β -actin به عنوان رفرنس محاسبه شد. فرمول‌ها برای محاسبه به ترتیب زیر می‌باشد:

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

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

جدول ۲. توالی پرایمرهای بیان ژنی عضله‌ی نعلی موش‌های صحرایی

genes	Primer sequence Product	length (bp)
Bcl2	F: 5'TATATGGCCCCAGCATGCGA3' R: 5'GGGCAGGTTTGTCTCGACCTCA3	136
Bax	F: 5'ATCCAAGACCAGGGTGGCTG3' R: 5'CACAGTCCAAGGCAGTGGGA3'	150
Caspase3	F: 5'GGAGCTTGGAAACGGTACGCT3' R: 5'AGTCCACTGACTTGCTCCCA3'	118
β -actin	F: 5'CTCTGTGTGGATCGGTGGCT3' R: 5'GCAGCTCAGTAACAGTCCGC3'	138

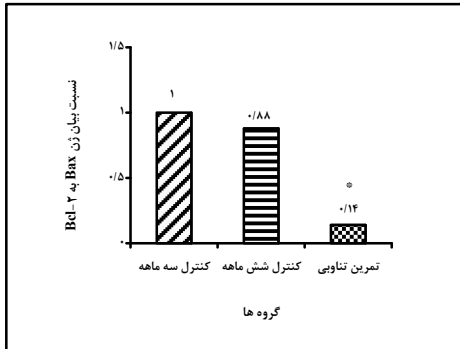
تجزیه و تحلیل آماری

توزیع طبیعی داده‌ها و برابری واریانس‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف و لون مشخص شد. سپس برای تعیین اختلاف میزان شاخص‌های مورد نظر بین دو گروه کنترل و تمرین تناوبی از آزمون تی مستقل

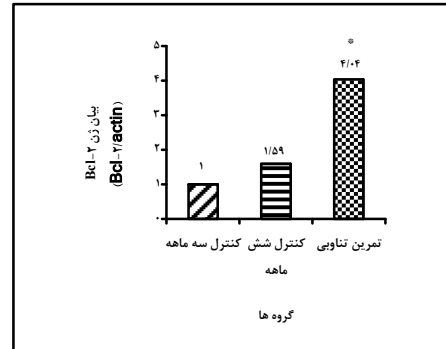
استفاده گردید. تمامی محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ در سطح معنی‌داری $P \leq 0.05$ انجام شد.

یافته‌ها

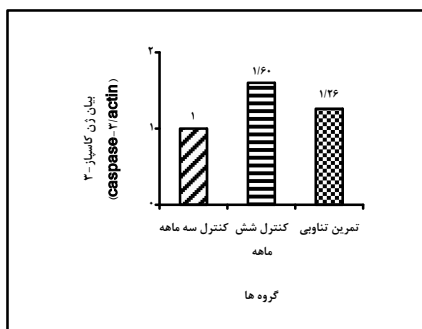
نتایج آزمون تی مستقل نشان داد که پس از ۱۲ هفته تمرین تناوبی، بیان ژن Bcl-2 در گروه تمرین تناوبی به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل شش ماهه بود ($P=0.002$) (شکل ۱). همچنین، نسبت Bax به Bcl-2 در گروه تمرین تناوبی به طور معنی‌داری (۸۴٪) کمتر از گروه کنترل شش ماهه بود ($P=0.048$) (شکل ۲).



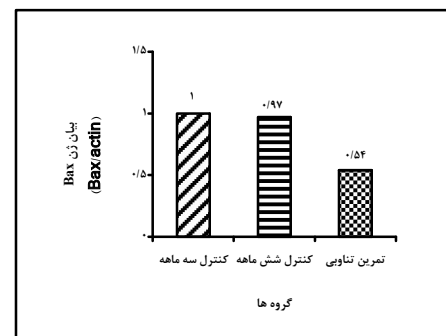
شکل ۲. نسبت بیان ژن Bax به Bcl-2 در عضله‌ی نعلی گروه‌های تمرین و کنترل (*): تفاوت معنی‌دار با گروه‌های کنترل)



شکل ۱. مقادیر بیان ژن Bcl-2 در عضله‌ی نعلی گروه‌های تمرین و کنترل (*): تفاوت معنی‌دار با گروه‌های کنترل)



شکل ۴. مقادیر بیان ژن کاسپاز-۳ در عضله‌ی نعلی گروه‌های تمرین و کنترل



شکل ۳. مقادیر بیان ژن Bax در عضله‌ی نعلی گروه‌های تمرین و کنترل

اما تفاوت معنی‌داری بین دو گروه تمرین و کنترل در رابطه با بیان ژن Bax و کاسپاز-۳ مشاهده نشد ($P > 0.05$), تمرین‌ها در گروه تمرین تناوبی به ترتیب ۴۴ و ۲۱ درصد کمتر از گروه کنترل بود. (شکل ۳ و ۴).

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق در رابطه با تعیین تاثیر سه ماه تمرین هوازی تناوبی بر برخی شاخص‌های آپوپتوز عضله اسکلتی شامل Bax، Bcl-2، نسبت Bax به Bcl-2 و کاسپاز-۳ در موش‌های صحرایی نر نشان داد که پس از سه ماه تمرین هوازی بیان پروتئین ضد آپوپتوزی Bcl-2 در عضله نعلی گروه تمرین به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود. البته با وجود نبود تفاوت در بیان پروتئین Bax بین دو گروه، نسبت Bax به Bcl-2 به طور معنی‌داری در گروه تمرین تناوبی کمتر از گروه کنترل بود. در چندین مطالعه گزارش شده است که فعالیت ورزشی منظم پروتئین Bcl-2 عضله اسکلتی را افزایش و پروتئین Bax را کاهش می‌دهد و نسبت Bax به Bcl-2 را به سمت یک محیط ضد آپوپتوزی تغییر می‌دهد (۲۰،۲۱،۲۲،۲۳،۲۴). برای نمونه، مک‌میلان و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که شش هفته تمرین روی نوارگردان باعث افزایش Bcl-2 و کاهش Bax و نسبت Bax به Bcl-2 در موش‌های صحرایی می‌شود (۵). همچنین، وینشتین و همکاران (۲۰۱۱) نیز در مطالعه‌ی خود اشاره کردند که پس از هشت الی ۱۰ هفته تمرین هوازی نسبت Bax به Bcl-2 در آزمودنی‌های گروه تمرین کمتر از گروه کنترل بود (۲۰). چندین سازوکار برای اثرات محافظتی تمرینات ورزشی روی آپوپتوز عضله مطرح شده است که شامل تغییر مستقیم در بیان پروتئین‌های مربوط به آپوپتوز، کاهش آزادسازی عوامل آپوپتوژنیک میتوکندری و تغییرات تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و وضعیت ضداکسایشی می‌باشد (۵). به نظر می‌رسد میتوکندری نقش مهمی در تنظیم آپوپتوز سلول‌های عضله اسکلتی بازی می‌کند. نسبت Bax به Bcl-2 شاخصی برای نشان دادن پتانسیل آپوپتوز میتوکندریایی می‌باشد که Bcl-2 با فعالیت پیش‌آپوپتوزی Bax به وسیله‌ی جلوگیری از جابجایی آن به میتوکندری مخالفت می‌کند. هنگامی که Bax وارد میتوکندری می‌شود، منافذی را در غشای میتوکندری شکل می‌دهد که در نتیجه پروتئین‌هایی از جمله سیتوکروم c آزاد شده و وارد سیتوزول می‌شود و باعث شروع پیام‌رسانی آپوپتوتیک آبشارهای کاسپاز پایین دستی می‌شود (۷). اهمیت نفوذپذیری میتوکندری در مطالعه‌ی فانگ و همکاران (۲۰۰۸) نشان داده شده است. آن‌ها بیان کردند که مسدود کردن منافذ نفوذپذیری میتوکندری میزان آپوپتوز را کاهش می‌دهد (۲۲). این نتایج همراستا با ایده‌ای است که کاهش نسبت Bax به Bcl-2 در اثر تمرینات ورزشی می‌تواند آپوپتوز را به وسیله‌ی به حداقل رساندن نفوذپذیری میتوکندری کاهش دهد (۲۳،۷). علاوه بر این، اعتقاد بر این است که ROS نیز یک محرک قوی برای فعال کردن آپوپتوز در انواع مدل‌های آزمایشی و سلول‌های مختلف می‌باشد (۱۴). ROS آپوپتوز را به طور عمده از طریق تعدیل مسیر مربوط به میتوکندری تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۲،۹). احتمالاً استرس اکسایشی بالا هومئوستاز غشای میتوکندری را بی‌ثبات کرده و بنابراین تشکیل منافذ نفوذپذیر غشای میتوکندری را تحریک می‌کند و باعث آزادسازی فاکتورهای پیش‌آپوپتوزی مثل سیتوکروم c می‌شود (۱۶،۱۲). اعتقاد بر این است که تمرینات ورزشی با افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و تعدیل استرس اکسایشی باعث کاهش ژن‌های پیش‌آپوپتوزی از جمله Bax می‌شوند (۲۴،۱۲،۷). البته ذکر این نکته ضروری است که اندازه‌گیری شاخص‌هایی از قبیل سیتوکروم c، ROS و شاخص‌های مربوط به ظرفیت آنتی‌اکسیدانی جز محدودیت‌های مطالعه‌ی حاضر بودند.

با این حال، نتایج پژوهش حاضر و مطالعات مذکور با برخی از تحقیقات انجام شده همسو نمی‌باشد (۲۵،۱۶). لیو و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که ۹ هفته تمرین استقامتی موجب افزایش معنی‌دار نسبت Bax/Bcl2 در عضله اسکلتی موش‌های صحرایی می‌شود (۱۶). علت مغایرت در این نتایج را می‌توان به عواملی مانند تفاوت

در پارامترهای تمرینی و نوع تمرین نسبت داد. زیرا تمرینات ورزشی شدیدتر و طولانی‌تر ممکن است پیام‌رسانی آپوپتوتیک عضلات اسکلتی را افزایش دهد (۷). در مطالعه‌ی لیو و همکاران سرعت نوارگردان با افزایشی نسبتاً سریع در هفته‌ی هشتم تمرین به ۳۵ متر در دقیقه (با شیب ۱۵ درصد) رسیده بود و آزمودنی‌ها ۳۰ دقیقه به صورت مداوم با این سرعت می‌دویدند، در حالی که در پژوهش حاضر سرعت نوارگردان به صورت تدریجی افزایش یافته و در هفته‌ی آخر تمرین به ۳۵ متر در دقیقه (با شیب ۱۵ درصد) رسید و دویدن آزمودنی‌ها با این سرعت در تناوب‌های ۴ دقیقه‌ای انجام می‌شد که با تناوب‌هایی با سرعت ۲۷ متر در دقیقه از هم جدا شده بود. به علاوه، علت این تناقض ممکن است ناشی از زمان برداشت بافت باشد (۷). چون اندازه‌گیری‌ها در مطالعه کنونی، روی بافت‌هایی انجام شد که ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین استخراج شده بودند، اما در پژوهش لیو و همکاران استخراج بافت ۳۶ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین انجام شده بود.

در تحقیق حاضر پس از سه ماه تمرین تناوبی، اختلاف معنی‌داری در میزان بیان ژن کاسپاز-۳ عضله‌ی نعلی موش‌های صحرایی در دو گروه تمرین تناوبی و کنترل مشاهده نشد، اما این شاخص در آزمودنی‌های گروه تمرین ۲۱ درصد کمتر از گروه کنترل بود. این یافته‌ها با نتایج برخی مطالعات همسو می‌باشد (۲۳،۱۵،۱۲). سیو و همکاران اشاره کردند که سطح پروتئین کاسپاز-۳ عضله‌ی نعلی پس از هشت هفته تمرین در آزمودنی‌های گروه تمرین و کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت، اما در گروه تمرین کمتر از گروه کنترل بود (۲۶). همچنین، کیم و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که بین گروه‌های تمرین و کنترل در بیان پروتئین کاسپاز-۳ پس از ۸ هفته تمرین روی نوارگردان تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (۱۵). علت پایین بودن کاسپاز-۳ در گروه تمرین ممکن است ناشی از کاهش نسبت Bax به Bcl-2 باشد، چون کاهش این نسبت می‌تواند با جلوگیری از تشکیل منافذ میتوکندری، آزادسازی فاکتورهای مستقر در میتوکندری از جمله سیتوکروم c به سیتوزول را کمتر کرده و فعالیت کاسپاز-۹ و متعاقب آن کاسپاز-۳ را کاهش دهد (۷،۱۰).

علیرغم توضیحات ذکر شده در بالا، یافته‌های پژوهش حاضر در رابطه با تغییرات کاسپاز-۳ پس از تمرینات ورزشی با نتایج برخی مطالعات از جمله چای و همکاران (۲۰۱۱) در تناقض می‌باشد. چای و همکاران گزارش کردند که فعالیت کاسپاز-۳ پس از شش هفته تمرین روی نوارگردان در موش‌های دیابتی تمرین کرده به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل دیابتی بود (۲۶). عدم وجود کاهش در فعالیت و بیان کاسپاز-۳ در اثر تمرینات ورزشی ممکن است نتیجه‌ی کاهش چشمگیر سطوح XIAP (مهار کننده‌ی قوی کاسپاز-۳) و افزایش سطوح Smac (مهار کننده‌ی XIAP) باشد (۲۷،۵) که در مطالعه حاضر به دلیل برخی محدودیت‌ها مورد اندازه‌گیری قرار نگرفته‌اند. همچنین این احتمال وجود دارد که افزایش TNF- α و IL-6 پلازما با فعال کردن مستقیم کاسپاز-۳ از طریق مسیر خارجی میانجی‌گری کرده و باعث حفظ کاسپاز-۳ گردد (۹). این مطالعات پیشنهاد می‌کنند که افزایش سطوح TNF- α گردش خون، منجر به افزایش لیگاند متصل شونده به گیرنده TNF- α در سارکولمای عضله اسکلتی شده و باعث افزایش آپوپتوز از طریق مسیر خارجی می‌شود. همه این اثرات ممکن است باعث فعال شدن کاسپاز-۸ و کاسپاز-۳ از طریق مسیر خارجی شود. به علاوه رابطه بالقوه دیگر بین استرس اکسایشی و آپوپتوز، کنترل فعالیت کاسپاز ۳ می‌باشد. کنترل کاسپاز-۳ فرآیند پیچیده‌ای است و چندین مسیر پیام‌رسانی آپوپتوز را درگیر می‌کند. نشان داده شده است که کاسپاز-۳ به وسیله‌ی فعال شدن کاسپاز-۱۲ از طریق مسیر آزادسازی کلسیم یا به وسیله‌ی فعال شدن کاسپاز-۹ در مسیر داخلی و یا افزایش TNF- α سرم در مسیر خارجی

فعال می‌شود (۹). همچنین، کاسپاز-۳ نقش مهمی در تغییر حالت عضله‌ی اسکلتی بازی می‌کند و برای تفکیک سلولی عضله‌ی اسکلتی ضروری می‌باشد. بنابراین، حفظ شدن فعالیت کاسپاز-۳ پس از تمرینات ورزشی که در برخی مطالعات به آن اشاره شده است، ممکن است برای سایر اعمال سلولی از قبیل تغییر حالت ناشی از فعالیت ورزشی و تفکیک سلول‌های ماهواره‌ای مورد نیاز باشد (۵) که هنوز مورد بررسی و تحقیق قرار نگرفته‌اند. با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق و کاهش معنی‌دار نسبت Bax به Bcl-2 و عدم تغییر معنی‌دار بیان ژن کاسپاز-۳ پس از انجام تمرینات هوازی تناوبی منظم، اظهار نظر قطعی در مورد تاثیر تمرینات ورزشی تناوبی بر شاخص‌های مربوط به آپوپتوز عضله‌ی اسکلتی، نیازمند انجام تحقیقات و مطالعات بیشتر می‌باشد.

سپاسگزاری

در پایان از تمامی کسانی که در انجام پژوهش حاضر ما را یاری نمودند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References:

- ##Marfe G, Tafani M, Pucci B, Di Stefano C, Indelicato M, Andreoli A, et al. (2010). The effect of marathon on mRNA expression of anti-apoptotic and pro-apoptotic proteins and sirtuins family in male recreational long-distance runners. *BMC physiology*; 10(1), 7.
- ##Tsalouhidou S, Petridou A, Mougios V. (2009). Effect of chronic exercise on DNA fragmentation and on lipid profiles in rat skeletal muscle. *Experimental physiology*; 94(3), 362-370.
1. Quadrilatero J, Bombardier E, Norris SM, Talanian JL, Palmer MS, Logan H, et al. (2010). Prolonged moderate-intensity aerobic exercise does not alter apoptotic signaling and DNA fragmentation in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*; 298(3), E534-E547.
 2. Siu PM. Muscle apoptotic response to denervation, disuse, and aging. (2009). *Medicine and science in sports and exercise*; 41(10), 1876-1886.
 3. McMillan EM, Graham DA, Rush JW, 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), 1048-1057.
 4. Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. (2012). Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)*; 4(5), 330.
 5. Peterson JM, Bryner RW, Sindler A, Frisbee JC, Alway SE. (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), 1934-1943.
 6. Cury-Boaventura MF, Levada-Pires AC, Folador A, Gorjão R, Alba-Loureiro TC, Hirabara SM, et al. (2008). Effects of exercise on leukocyte death: prevention by hydrolyzed whey protein enriched with glutamine dipeptide. *European journal of applied physiology*; 103(3), 289-294.
 7. Koçtürk S, Kayatekin BM, Resmi H, Açıkgöz O, Kaynak C, Özer E. (2008). The apoptotic response to strenuous exercise of the gastrocnemius and soleus muscle fibers in rats. *European journal of applied physiology*; 102(5), 515-524.
 8. Song W, Kwak HB, Lawler JM. (2006). Exercise training attenuates age-induced changes in apoptotic signaling in rat skeletal muscle. *Antioxidants & redox signaling*; 8(3-4), 517-528.

9. Kalyani RR, Corriere M, Ferrucci L. (2014). Age-related and disease-related muscle loss: the effect of diabetes, obesity, and other diseases. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*; 2(10), 819-829.
10. Siu PM, Bryner RW, Martyn JK, Alway SE. (2004). Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles. *The FASEB journal*; 18(10), 1150-1152.
11. Alway SE, Siu PM. (2008). Nuclear apoptosis contributes to sarcopenia. *Exercise and sport sciences reviews*; 36(2), 51.
12. Phaneuf S, Leeuwenburgh C. (2001). Apoptosis and exercise. *Medicine and science in sports and exercise*; 33(3), 393-396.
13. Kim KB, Kim YA, Park JJ. (2010). Effects of 8 week exercise on bcl-2, bax, caspase-8, caspase-3 and HSP70 in mouse gastrocnemius muscle. *Journal of Life Science*; 20(9), 1409-1414.
14. Liu WY, He W, Li, H. (2013). Exhaustive training increases uncoupling protein 2 expression and decreases Bcl-2/Bax ratio in rat skeletal muscle. *Oxidative medicine and cellular longevity*.
15. Guiraud T, Nigam A, Gremeaux V, Meyer P, Juneau M, Bosquet L. (2012). High-intensity interval training in cardiac rehabilitation. *Sports medicine*; 42(7), 587-605.
16. Naito H, Powers SK, Demirel HA, Junichiro A. (2001). Exercise training increases heat shock protein in skeletal muscles of old rats. *Medicine and science in sports and exercise*; 33(5), 729-734.
17. Haram PM, Kemi OJ, Lee SJ, Bendheim MØ, Al-Share QY, Waldum HL, Wisløff U. (2008). Aerobic interval training vs. continuous moderate exercise in the metabolic syndrome of rats artificially selected for low aerobic capacity. *Cardiovascular research*.
18. Vainshtein A, Kazak L, Hood DA. (2011). Effects of endurance training on apoptotic susceptibility in striated muscle. *Journal of applied physiology*; 110(6), 1638-1645.
19. Adihetty PJ, Taivassalo T, Haller RG, Walkinshaw DR, Hood DA. (2007). The effect of training on the expression of mitochondrial biogenesis-and apoptosis-related proteins in skeletal muscle of patients with mtDNA defects. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*; 293(3), E672-E680.
20. Fang J, Wu L, Chen L. (2008). Postconditioning attenuates cardiocyte ultrastructure injury and apoptosis by blocking mitochondrial permeability transition in rats. *Acta cardiologica*; 63(3), 377-387.
21. Marzetti E, Lawler JM, Hiona A, Manini T, Seo AY, Leeuwenburgh C. (2008). Modulation of age-induced apoptotic signaling and cellular remodeling by exercise and calorie restriction in skeletal muscle. *Free Radical Biology and Medicine*; 44(2), 160-168.
22. Musumeci G, Imbesi R, Szychlinska MA, Castrogiovanni P. (2015). Apoptosis and Skeletal Muscle in Aging. *Open Journal of Apoptosis*; 4(02), 41.
23. Ziaaldini MM, Koltai E, Csende Z, Goto S, Boldogh I, Taylor AW, Radak Z. (2015). Exercise training increases anabolic and attenuates catabolic and apoptotic processes in aged skeletal muscle of male rats. *Experimental gerontology*; 67, 9-14.
24. Chae CH, Jung SL, An SH, Jung CK, Nam SN, Kim HT. (2011). Treadmill exercise suppresses muscle cell apoptosis by increasing nerve growth factor levels and stimulating p-phosphatidylinositol 3-kinase activation in the soleus of diabetic rats. *Journal of physiology and biochemistry*; 67(2), 235-241.
25. Siu PM, Bryner RW, Murlasits Z, Alway SE. (2005). Response of XIAP, ARC, and FLIP apoptotic suppressors to 8 wk of treadmill running in rat heart and skeletal muscle. *Journal of applied physiology*; 99(1), 204-209.