



دانشگاه شهید بهشتی

## فیزیولوژی ورزش و فعالیت بدنی

پاییز و زمستان ۱۳۹۷، دوره ۱۱، شماره ۲، صفحه‌های: ۱۳-۲۴

# تأثیر تمرین تناوبی پر شدت بر بیان ژن‌های پرو و آنتی‌آپوپتیک در بافت قلبی موش‌های نر پیر نژاد C57BL/6

رحمان سوری\*، مریم زارع شحنه، سیروس چوبینه، اعظم رمضان خانی

گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده تربیت‌بدنی و علوم ورزشی دانشگاه تهران، تهران، ایران.

دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۷/۱۹ اصلاح مقاله: ۱۳۹۶/۱۱/۱۶ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۲/۱۸

**هدف:** ژن‌های Bax و Bcl-2 از جمله ژن‌های مهم مسیر داخلی آپوپتوز می‌باشند. از طرفی، تأثیر فعالیت‌های ورزشی تناوبی و پر شدت روی سازوکارهای دخیل در فرآیند پیری کمتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. لذا، پژوهش حاضر باهدف تعیین تأثیر تمرین تناوبی پر شدت بر بیان ژن‌های پرو و آنتی‌آپوپتیک (Bax و Bcl2) در بافت قلبی موش‌های نر پیر انجام شد.

**روش‌ها:** این مطالعه تجربی روی ۲۰ سر موش نر ۲۴ ماهه نژاد C57BL/6 انجام شد. حیوانات به‌طور تصادفی به دو گروه کنترل (۱۰ سر) و آزمایش (۱۰ سر) تقسیم شدند. گروه آزمایش به مدت ۴ هفته و هر هفته ۵ جلسه به تمرین تناوبی پر شدت پرداختند. در ابتدا تمرین تناوبی با شدتی برابر با ۸۵ درصد سرعت بیشینه شروع شده و در ادامه برنامه تناوبی، هفته‌ای پنج درصد به سرعت افزوده شد و دو هفته آخر با ۹۵ درصد سرعت خاتمه یافت. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، بافت قلبی جدا شد. بیان ژن‌های Bcl-2 و Bax به‌وسیله SYBR-Green Real-time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

**نتایج:** نتایج حاصل از Real Time-PCR نشان داد که میانگین میزان بیان نسبی ژن پروآپوپتوتیک Bax در گروه آزمایش به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود ( $0.618 \pm 0.022$  واحد در مقابل ۱ واحد،  $P < 0.05$ ). همچنین، میانگین میزان بیان ژن آنتی‌آپوپتوتیک Bcl2 در گروه آزمایش، به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود ( $1.824 \pm 0.084$  واحد در مقابل ۱ واحد،  $P < 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد که تمرین تناوبی پر شدت با تعدیل بیان ژن‌های پرو و آنتی‌آپوپتیک (Bax و Bcl2) در کاهش مرگ برنامه‌ریزی شده در بافت قلبی موش‌های پیر مؤثر است.

**واژه‌های کلیدی:** آپوپتوز میوکارده، تمرین تناوبی پر شدت، Bcl-2، Bax.

## مقدمه

پیری یک موضوع بسیار مهم و مرتبط با کارایی اندام‌های بدن موجودات زنده است. با افزایش سن، موجود زنده تحت تأثیر عوامل مختلف مانند پرتوها، مواد شیمیایی و مخصوصاً فشارهای اکسایشی با منشأ داخلی و خارجی قرار می‌گیرد. اغلب در سنین پیری، بطن چپ دچار هایپرتروفی گشته و این امر باعث کاهش قطر داخلی بطن چپ و برون‌ده قلب می‌گردد (۹). تجمع فراوان ماده خارج سلولی (ماتریکس) در بافت قلب متعاقب مرگ سلول‌های قلبی اتفاق می‌افتد و این موضوع باعث می‌شود سلول‌های باقی‌مانده برای جبران، بزرگ (دچار هایپرتروفی) شوند. به این ترتیب، تعداد سلول‌های قلبی کمتر شده و این موضوع باعث کاهش قابل توجه برون‌ده قلب و کارایی آن می‌گردد و احتمال اینکه تعداد بسیاری از سلول‌های قلبی دچار آپوپتوز شوند، وجود دارد. در این حالت نسبت شاخص Bax به Bcl-2، افزایش می‌یابد (۱۰). در زمینه فشارهای اکسایشی و آپوپتوز بافت قلب در دوران پیری، نتایج مطالعات نیز نشان دادند که با پیر شدن موش‌ها، میزان آپوپتوز به شکل قابل توجهی در قلب افزایش می‌یابد که احتمالاً به علت افزایش فشار اکسایشی، افزایش بیان ژن‌های مولد P53<sup>۱</sup> و کاهش بیان Bcl-2 می‌باشد و این داده‌ها نشان می‌دهد که قلب پیر بیشتر از قلب جوان مستعد ابتلا به آپوپتوز است (۱۱).

فعالیت ورزشی سبب ایجاد تغییر در هم‌ایستایی محیط داخلی بدن ما می‌شود که به معنی ایجاد چالش حفظ بقا در شرایط پرتنش برای سلول‌ها است. در طول دهه گذشته درباره اثر فعالیت ورزشی بر آپوپتوز سلولی مطالعات زیادی انجام گرفته که اغلب بیانگر کاهش سطح آپوپتوز بافت قلبی به دنبال فعالیت ورزشی استقامتی با شدت متوسط هستند (۱۰، ۱۱). در همین زمینه، پدرسون و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که ۹ هفته فعالیت ورزشی با شدت متوسط بر روی نوار گردان، سطوح پروتئین Bax، فعالیت کاسپاز و

آپوپتوز یا مرگ سازمان‌یافته و برنامه‌ریزی شده سلول، یکی از سازوکارهای اصلی در تکامل و هم‌ایستایی بافت‌های بالغ در جهت حذف سلول‌های ناخواسته، آلوده، جهش‌یافته و یا آسیب‌دیده از طریق مسیرهای خودکشی داخلی است (۱). آپوپتوز به‌طور کلی از دو مسیر خارجی و داخلی سلول را تحت تأثیر قرار داده و از بین می‌برد (۲). در مسیر خارجی، زمانی که گیرنده‌های مرگ غشاء سلولی (TNF- $\alpha$ )<sup>۵</sup>، لیگاند Fas (FasL)<sup>۶</sup> و غیره متصل می‌شوند، موجب فعال‌سازی کاسپازها شده و در نهایت مرگ سلولی اتفاق می‌افتد (۳). تحریک مسیر داخلی آپوپتوز با افزایش نفوذپذیری غشای خارجی و انتقال سیتوکروم c، عامل القاکننده آپوپتوز (AIF)<sup>۷</sup> و یا Smac/Diablo<sup>۸</sup> پیش می‌رود که منجر به پیام‌رسانی سیتوزولی وابسته با کاسپاز یا مستقل از کاسپاز می‌گردد (۴). فرایند آپوپتوز توسط برخی پروتئین‌های میتوکندریایی شامل پروتئین‌های خانواده B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) تنظیم می‌گردد (۵). خانواده Bcl-2 شامل هر دو عضو پیش‌آپوپتوزی مانند Bid ، bcl-2-like protein 4 (Bax) و اعضای آنتی‌آپوپتوزی مانند: Bcl-w، Bcl-xl و Bcl-1 است (۶). فرایند آپوپتوز به‌طور دقیق به کنش و برهم‌کنش این محصولات ژنی بستگی دارد که فرایند خودکشی سلول را مهار یا فعال می‌کنند. بدین معنی که آپوپتوز توسط رونویسی ژن پیش‌آپوپتوزی Bax و ممانعت ژن آنتی‌آپوپتوزی Bcl-2 تعیین می‌گردد (۷). Bcl-2 در پوشش هسته و میتوکندری قرار گرفته است که باعث جلوگیری از آزادسازی سیتوکروم c از میتوکندری می‌گردد. پروتئین Bax از لحاظ ساختاری هم‌تا (همولوگ) Bcl-2 بوده و پیش‌برنده آپوپتوز است، بنابراین از نظر عملکردی، این پروتئین آنتاگونیست نقش حفاظتی برای Bcl-2 دارد (۸).

Bax و Bcl-2 قلبی وجود دارد. از این رو این سؤال مطرح می‌گردد که آیا تمرینات HIIT می‌تواند به‌عنوان جایگزینی کارآمد از لحاظ زمانی، همچون تمرینات استقامتی سنتی با اثر بر شاخص‌های آپوپتوز قلبی همانند Bax و Bcl2 در حفظ سلامت قلبی مؤثر باشد؛ بنابراین هدف مطالعه حاضر، بررسی تأثیر تمرین HIIT بر بیان ژن‌های پرو و آنتی‌آپوپتیک در میوکارد موش‌های نر پیر نژاد C57BL/6 بود.

### روش پژوهش

#### نمونه‌های پژوهش

این مطالعه تجربی روی ۲۰ سر موش نر C57BL/6 ۲۴ تا ۲۶ ماهه (با وزن تقریبی ۳۰ تا ۳۵ گرم) تهیه شده از انستیتو پاستور ایران در سال ۱۳۹۵ انجام گردید. جهت جلوگیری از فشار و تغییر شرایط فیزیولوژیک، موش‌ها به مدت دو هفته در حیوان‌خانه مرکزی آزمایشگاه دانشگاه تهران تحت شرایط جدید شامل دمای  $22 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد، رطوبت محیط  $50 \pm 5$  درصد و چرخه روشنایی- تاریکی ۱۲:۱۲ ساعته نگهداری شدند. در طی این دوره، موش‌ها به‌صورت آزادانه از غذای استاندارد حیوانی (پلت) و آب استفاده می‌کردند. اصول اخلاقی مطالعه مطابق با اصول کار با حیوانات مصوب دانشگاه تهران موردتوجه قرار گرفت. کد تصویب این پژوهش در دانشگاه تهران ۴۵۰۱۴۵۱ می‌باشد. بعد از سازگاری محیط جدید، حیوانات به‌طور تصادفی به دو گروه ۱۰ تایی کنترل (میانگین وزن  $32/80 \pm 1/64$  گرم) و آزمایش (میانگین وزن  $30/70 \pm 3/96$  گرم) تقسیم شدند.

#### پروتکل پژوهش

در ابتدای پژوهش به‌منظور کاهش فشار و همچنین آشنایی با دویدن روی نوار گردان، موش‌های گروه آزمایش به مدت یک هفته در یک برنامه تمرینی

قطعه‌قطعه شدن DNA را کاهش می‌دهد (۱۲). همین نتایج در مطالعه لی و همکاران (۲۰۱۳) نیز به‌دست آمده است. این محققان نشان دادند که ۳ ماه دویدن روی نوار گردان به مدت یک ساعت در روز، منجر به کاهش سطح FasL، نسبت Bax به Bcl-2 و کاسپاز ۹ در بافت قلبی موش‌های فعال می‌گردد (۱۳). جعفری و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که ۱۲ هفته فعالیت ورزشی با شدت ۷۵-۸۰ درصد  $VO_2max$ ، منجر به کاهش بیان ژن Bax و نسبت Bax به Bcl-2 در بافت قلب موش‌ها گردید (۱۴). اگرچه به دلیل نقش تمرینات استقامتی در حفظ سلامت جسمانی استفاده از این‌گونه تمرینات بسیار توصیه شده است اما یکی از دلایل اصلی نپرداختن به این شیوه تمرینی، زمان طولانی آن می‌باشد. از این رو، ایجاد روش تمرینی مناسب با صرف زمان کوتاه که دارای خاصیت تمرینات استقامتی تداومی باشد، موردتوجه محققین رشته علوم ورزشی قرار گرفته است. یکی از روش‌های تمرینی که توسط عده‌ای از پژوهشگران این عرصه توصیه می‌گردد، تمرین تناوبی پر شدت (HIIT) است (۱۵). این نوع تمرینات، ترکیبی از دوره‌های پر شدت هوازی به همراه دوره‌های بازیابی فعال یا غیرفعال با شدت متوسط است (۱۶). تحقیقات بسیاری نشان داده‌اند که تمرینات HIIT نسبت به تمرینات استقامتی تداومی از لحاظ زمانی دارای مزیت هستند. علاوه بر آن، شناخت روش‌های جدید تمرینی که بتواند آپوپتوز را در پیری تعدیل کند و از افزایش آپوپتوز در دوران کهولت سن که موجب از دست رفتن بیش از حد سلول‌ها شده و عملکرد بافت‌ها را تحت تأثیر قرار دهد، با ارزش هستند. با توجه به اثر مثبت فعالیت بدنی به نظر می‌آید درک فرایندهای سلولی و مولکولی متأثر از ورزش بتواند به استفاده از فعالیت بدنی به‌عنوان یک درمان هدفمند و بدون عوارض در آینده منجر شود. با توجه به دانسته‌های ما، اطلاعات اندکی در مورد اثر فعالیت HIIT بر بیان ژن

شدید بر اساس سرعت بیشینه به دست آمده طراحی و به مدت چهار هفته و پنج جلسه در هفته روی گروه آزمایش اعمال شد. در ابتدا تمرین تناوبی با شدتی برابر با ۸۵ درصد سرعت بیشینه شروع و در ادامه، هر هفته پنج درصد به سرعت افزوده شد و دو هفته آخر با ۹۵ درصد سرعت خاتمه یافت (جدول ۲). هر تناوب شامل دو دقیقه فعالیت بافاصله استراحتی غیرفعال یک دقیقه‌ای بود. هفته اول شش مرحله تمرینی انجام شد که در هفته چهارم به ده مرحله رسید (۱۹). در این مدت، گروه کنترل فعالیت ورزشی انجام ندادند.

با سرعت ۱۰ تا ۱۸ متر در دقیقه و هر بار به مدت ده دقیقه شرکت کردند. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه آشناسازی، آزمون ورزشی فزاینده تا مرز خستگی انجام شد. این آزمون با سرعت ده متر بر دقیقه شروع شد و به ازای هر دو دقیقه، دو متر بر سرعت آن افزوده شد (۱۸). زمان رسیدن به خستگی با ناتوانی موش‌ها در دویدن روی نوار گردان با وجود اعمال محرک‌های مختلف مانند شوک بادی و ایجاد صدا با زدن ضربه روی درپوش نوار گردان مشخص شد (میانگین سرعت بیشینه  $29/33 \pm 3/26$  متر بر دقیقه). تمرین تناوبی

جدول ۱. برنامه تمرین ورزشی ۴ هفته‌ای متناوب با شدت بالا بر روی نوار گردان در موش‌های پیر فعال

هفته تمرینی	اول	دوم	سوم	چهارم
تعداد جلسات تمرین در هفته	۶	۸	۱۰	۱۰
سرعت میانگین در هفته (درصد سرعت بیشینه)	۸۵	۹۰	۹۵	۹۵
سرعت میانگین در هفته (متر بر دقیقه)	۲۴/۹	۲۶/۴	۲۸	۲۸

### روش‌های آزمایشگاهی

جهت استخراج RNA از نمونه‌ها، حدود ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت بطن چپ در ۱ میلی‌لیتر معرف لیز کننده<sup>۱۱</sup> کیزول<sup>۱۲</sup> (کمپانی کیزاژن<sup>۱۳</sup>، ساخت کشور آلمان) همگن و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. آنگاه به هر میکروتیوب، ۰/۲ میلی‌لیتر کلروفرم افزوده و میکروتیوب به شدت با دست به مدت ۱۵ ثانیه تکان داده شد و ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید؛ در ادامه محلول به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط ۴ درجه سانتی‌گراد و در ۱۲۰۰۰ برابر جاذبه (g) سانتریفیوژ گردید. سپس به دقت و بدون تکان دادن تیوب، بخش رویی که حاوی RNA بود، جدا شده و به میکروتیوب دیگر منتقل شد و به آن ۰/۵ میلی‌لیتر ایزوپروپانول سرد اضافه گردید. بعد از هم زدن ملایم در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای یک‌شب نگهداری شد. روز بعد،

به منظور استخراج RNA و سنتز DNA، پس از گذشت ۴۸ ساعت از آخرین جلسه تمرینی، موش‌ها با استفاده از تزریق درون صفاقی کتامین (۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) بی‌هوش شدند (به طوری که به تحریک اعمال شده پاسخی ندادند) و پس از آن، بخش اعظم خون (حدود ۴-۵ میلی‌لیتر) از قسمت سینوس چشمی و به وسیله لوله‌های موئینه جمع‌آوری شد. سپس، موش‌ها بلافاصله توسط متخصصین کارآزموده، در محیطی کاملاً استریل جراحی شده و قلب آن‌ها در مایع فیزیولوژیک قرار داده شد. پس از تخلیه خون قلب و وزن کردن آن، بلافاصله دهلیزها از بطن جدا و بخشی از بافت بطن چپ موش‌ها در کرایوتیوب گذاشته و در نیتروژن مایع سرد شدند و سپس تا انجام آزمایش‌های سلولی-مولکولی در فریزر ۸۰- نگهداری شدند.

درجه سانتی‌گراد بر روی Dry block انکوبه گردید. ۴ میکرولیتر 5X Reaction buffer، ۲ میکرولیتر dNTP 10mM mix و ۱ میکرولیتر Ribolock Ribonuclease Transcription Inhibitor به تیوب افزوده شد و پس از سانتی‌گراد مختصر به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. در ادامه ۱ میکرولیتر آنزیم RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse قبل افزوده شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۹۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون صورت گرفت. واکنش با قرار دادن تیوب به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد پایان یافت و نمونه برای نگهداری در فریزر -۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

برای ارزیابی بیان ژن از روش Real Time PCR و دستگاه شرکت Applied Biosystem (ساخت کشور آمریکا) استفاده شد. برنامه زمانی - گرمایی سه مرحله‌ای برای دستگاه Real Time PCR تنظیم شد. مرحله اول در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، منجر به واسرشته شدن مولکول DNA و فعال شدن آنزیم پلیمرز می‌گردد؛ مرحله دوم در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و سپس ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه (۴۰ سیکل متوالی) و مرحله نهایی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، جهت ترسیم منحنی تفکیک یا منحنی ذوب انجام شد. واکنش‌های Real Time PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر به صورت دوتایی در پلیت‌های ۹۶ چاهکی انجام شدند. مخلوط هر واکنش شامل ۱۲/۵ میکرولیتر SYBR Green master mix با Cat #4309155 (ساخت کشور انگلیس)، یک میکرولیتر (۱۰ پیکومول) از پرایمرهای مستقیم (Forward) و معکوس (Reverse) اختصاصی هر ژن، ۵ میکرولیتر DNA ژنومیک (۲۰ نانوگرم) و آب

میکروتیوب به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط ۴ درجه سانتی‌گراد و ۱۲۰۰۰g سانتی‌تریفیوژ و مایع رویی بیرون ریخته شد. آنگاه، ۱ میلی‌لیتر اتانول خالص به میکروتیوب اضافه گردید. بعد از تکان دادن مختصر به مدت ۵ دقیقه در شرایط ۴ درجه سانتی‌گراد و ۷۵۰۰g سانتی‌تریفیوژ و مایع رویی محتوی اتانول به دقت بیرون ریخته شد و برای حذف الکل باقی‌مانده، حدود ۲۰ دقیقه اجازه داده شد تا الکل تبخیر گردد. سپس در ۲۰ میکرولیتر آب RNase-free حل شد. غلظت RNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر اپندورف<sup>۱۴</sup> (ساخت کشور آلمان) مورد سنجش قرار گرفت و نسبت جذب نوری<sup>۱۵</sup> RNA کل در طول موج‌های ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر سنجیده شد. نمونه‌هایی که نسبت جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر آنها بین ۱/۸ تا ۲ بود، برای سنتز DNA مکمل استفاده گردید.

ساخت cDNA با استفاده از کیت RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Cat #K1631 (شرکت فرمنتاز<sup>۱۶</sup>، ساخت کشور کانادا) و طبق دستورالعمل کیت انجام گردید. بدین صورت که ۱ میکرولیتر RNA و ۱ میکرولیتر از DNase I reaction buffer 10X در یک تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری استریل ریخته شد و توسط DEPC-treated eater به حجم ۹ میکرولیتر رسید. سپس ۱ میکرولیتر DNase (Deoxyribonuclease) (برای از بین بردن آلودگی احتمالی با DNA) و ۱ میلی‌لیتر اتانول مطلق به تیوب اضافه شد. تیوب به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر -۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. تیوب به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط ۴ درجه سانتی‌گراد و ۱۴۰۰۰g سانتی‌تریفیوژ شد، پس از آن اتانول به دقت در زیر هود خالی شده و حدود ۱۰ دقیقه اجازه داده شد تا باقی‌مانده الکل تبخیر گردد. به تیوب مربوط، ۱۱ میکرولیتر آب تیمار شده با دی اتیل پیروکربنات (DEPC)<sup>۱۷</sup> و ۱ میکرولیتر Random hexamer primer افزوده شد و ۵ دقیقه در دمای -۷۰

(۱۷)، برای کنترل تغییرپذیری در مقدار mRNA برای هر نمونه، عدد طبیعی شده با استفاده از فرمول  $\Delta Ct = Ct_{(Bax)} - Ct_{(\beta-actin)}$  محاسبه و بیان نسبی با روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  اندازه‌گیری شد. طراحی پرایمرها بر اساس اطلاعات ژن‌های Bax، Bcl-2 و بتا‌کتین<sup>۱۸</sup> انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ گزارش شده است، ضمن اینکه به‌عنوان ژن کنترل از بتا‌کتین استفاده شد.

جدول ۲. توالی پرایمرهای استفاده‌شده

(5'-3')		نام
Reverse	Forward	
GCCACAAAGATGGTCACTGTCTGCC	AAGCTGAGCGAGTGTCTCCGGCG	Bax
GCATCCCAGCTCCGTTAT	TGAGTACCTGAACCGGCATCT	Bcl-2
GCCACAGATTCCATACCC	GCCCTGAGGCTCTTTCCAG	$\beta$ -actin

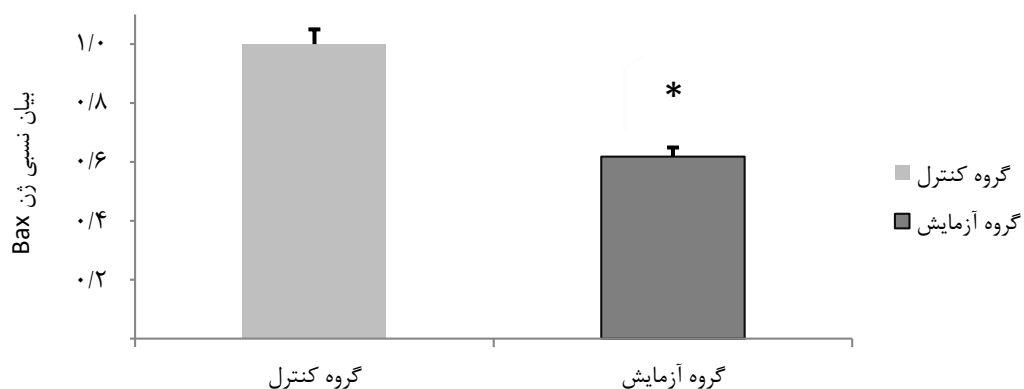
شد. برای رسم شکل از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

### نتایج

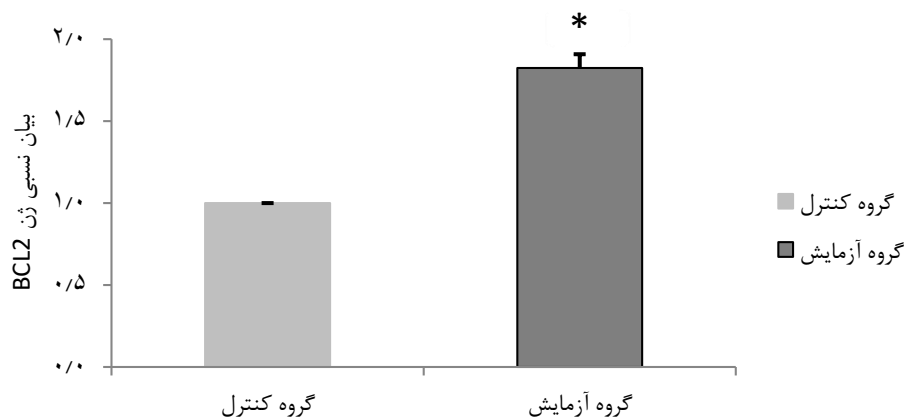
بر اساس نتایج پژوهش، پس از ۴ هفته تمرین تناوبی، میانگین میزان بیان نسبی ژن پرو‌آپوپتوتیک Bax در موش‌های پیر فعال کمتر از گروه کنترل بود (به ترتیب  $0.22 \pm 0.06$  و  $1$  واحد) ( $P=0.018$ ) و میانگین میزان بیان نسبی ژن آنتی‌آپوپتوتیک BCL-2 در موش‌های پیر فعال بیشتر از گروه کنترل بود (به ترتیب  $0.84 \pm 0.124$  و  $1$  واحد) ( $P=0.001$ ) و (شکل‌های ۱ و ۲).

### تحلیل آماری

داده‌های به‌دست‌آمده از دستگاه Real Time PCR که به‌صورت CT (میانگین CT برای هر نمونه) بودند، با استفاده از نرم‌افزار اکسل به  $\Delta\Delta Ct$  تبدیل شدند، سپس با استفاده از فرمول  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  اعداد نهایی به دست آمد. با انتقال این اعداد به نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ ابتدا طبیعی بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو-ویلک تعیین و مشخص شد که داده‌ها از توزیع طبیعی برخوردار هستند. برای بررسی اثر تمرین بر متغیرهای وابسته از آزمون t مستقل استفاده شد. سطح معنی‌داری کمتر از  $0.05$  ( $P < 0.05$ ) در نظر گرفته



شکل ۱. میانگین ( $\pm$  انحراف معیار) میزان بیان نسبی ژن Bax نسبت به ژن بتا‌کتین در گروه‌های آزمایش و کنترل \* تفاوت معنی‌دار گروه آزمایش با کنترل ( $P < 0.05$ )



شکل ۲. میانگین ( $\pm$  انحراف معیار) میزان بیان نسبی ژن BCL2 نسبت به ژن بتا اکتین در گروه‌های آزمایش و کنترل \* تفاوت معنی‌دار گروه آزمایش با کنترل ( $P < 0.05$ )

## بحث و نتیجه‌گیری

در زمان پیری به علت کاهش بیان Survivin و Bcl-2 و افزایش بیان ژن‌های مولد p53 و Bax القا آپوپتوز اتفاق می‌افتد (۲۰،۲۱). ورزش و فعالیت بدنی با شدت‌های خاص می‌تواند به‌عنوان یک نسخه درمانی به روند بهبود کیفیت زندگی در دوران میان‌سالی و سالمندی کمک کند (۱۳). نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که ۴ هفته تمرین HIIT باعث تغییر ژن‌های پرو و آنتی‌آپوپتیک (کاهش بیان Bax و افزایش بیان Bcl-2) در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل می‌شود. در این زمینه، نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعات پدرسون و همکاران، لی و همکاران و جعفری و همکاران همخوانی دارد (۱۴-۱۲). علاوه بر این، کواک و همکاران (۲۰۰۶) اظهار کردند که فعالیت ورزشی میزان افزایش‌یافته Bax/Bcl-2 در بافت قلبی موش‌های پیر را با کاهش بیان پروتئین Bax و افزایش سطح Bcl-2 قلبی کاهش می‌دهد (۲۲). در مطالعه دیگری کو و همکاران (۲۰۱۳) مشاهده کردند ۶ هفته دویدن روی تردمیل هر جلسه به مدت ۳۰ دقیقه منجر به کاهش بیان فسفو- $^{38}p$  و Bax و افزایش بیان Bcl-2 و پروتئین شوک حرارتی ۷۰ (HSP70) در بافت سلول‌های قلبی موش‌های پیر می‌شود (۲۳). نتایج مطالعه هوانگ و همکاران (۲۰۱۶) نیز حاکی از اثر

آنتی‌آپوپتیک فعالیت ورزشی بر سلول‌های قلبی بود که این مسئله تأیید دیگری بر نقش حمایتی فعالیت ورزشی در کاهش روند مرگ برنامه‌ریزی شده بافت‌های بدن است (۲۴).

به نظر می‌رسد میتوکندری نقش اصلی و مهمی در تنظیم آپوپتوز در سلول‌های عضله قلبی ایفا نماید، زیرا حرکت پروتئین‌های پروآپوپتوتیک به سمت غشای میتوکندری، منجر به آغاز فرایند آپوپتوز می‌شود (۲۵). در بیان اهمیت نفوذپذیری میتوکندری، فنگ و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که مسدود نمودن منافذ نفوذپذیری میتوکندری باعث کاهش میزان آپوپتوز پس از سکته قلبی می‌گردد. این مسئله نشان می‌دهد احتمالاً کاهش بیان Bax و یا نسبت Bax/Bcl-2 با به حداقل رساندن نفوذپذیری میتوکندری، آپوپتوز را کاهش می‌دهد (۲۶). اگرچه سازوکارهای دقیق فعالیت ورزشی بر تنظیم مسیر آپوپتوزی پیری به‌درستی مشخص نشده است. نتایج مطالعه فرنچ و همکاران (۲۰۰۸) نشان داد که این مسئله ممکن است تا حدودی در نتیجه بهبود فعالیت آنزیم‌های ضد اکسایشی از جمله سوپراکسیددیسموتاز باشد (۲۷). مطالعات دیگری نیز نشان دادند که فعالیت ورزشی از طریق تنظیم پروتئین‌هایی از جمله ایزوفرم منگنز سوپراکسیددیسموتاز<sup>۱</sup>، NFkB، گیرنده واسطه کیناز

اثرگذاری بر ژن‌های پرو و آنتی‌آپوپتیک قلبی همانند Bax و Bcl2 مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به بررسی‌های انجام‌شده احتمالاً مطالعه حاضر جزو اولین تحقیقات در خصوص اثر فعالیت ورزشی تناوبی با شدت بالا بر دو شاخص آپوپتوز در بافت قلبی موش‌های پیر است؛ بنابراین، افزایش یا کاهش میزان متغیرهای تحقیق حاضر در نتیجه این نوع روش تمرینی باید با احتیاط تفسیر گردد و انجام بررسی‌های بعدی برای تأیید این نتایج ضروری هستند. تحقیق حاضر دارای محدودیت‌های دیگری هم بود به‌عنوان مثال سایر عوامل القاکننده و ضدآپوپتوز سلولی و نیز فعالیت آنزیم‌های ضد اکسایشی اندازه گرفته نشد. لذا پیشنهاد می‌گردد مطالعات آینده به بررسی اثر فعالیت ورزشی تناوبی پر شدت بر موارد مذکور صورت پذیرد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که فعالیت ورزشی تناوبی پر شدت در موش‌های پیر موجب کاهش فرایند آپوپتوز قلبی از طریق تعدیل بیان ژن Bax و Bcl-2 می‌گردد. این نتایج اثر مثبت فعالیت تناوبی پر شدت در حفظ حیات سلول و تعدیل آپوپتوز آن در دوران پیری را نشان می‌دهد.

### تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر برگرفته از پایان‌نامه و بدون حمایت مالی انجام‌گرفته است. محققین از تمامی افرادی که در اجرای این پژوهش یاری رساندند، تشکر می‌نمایند.

### پی‌نوشت‌ها

- 1 Tumor necrosis factor receptor 1
- 2 TRAIL receptor 1
- 3 TRAIL receptor 2
- 4 Interleukin 1 $\beta$
- 5 Tumor necrosis factor alpha
- 6 Fas Ligand
- 7 Apoptosis-inducing factor
- 8 Tumor protein p53
- 9 maximal oxygen uptake
- 10 High intensity interval training
- 11 Lysis Reagent
- 12 Qiazol

مرتبط خارج سلولی (ERK)<sup>۲۲</sup>، مسیر IGF/Akt، مسیر سیرتوئین‌ها<sup>۲۳</sup> و پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs)<sup>۲۴</sup> که تنظیم‌کننده‌های بالادست آپوپتوز هستند، فرایند آپوپتوز را کاهش می‌دهند (۲۸-۳۲). علاوه بر آن، فعالیت ورزشی از رخداد فیبروز قلبی وابسته به افزایش سن، با کاهش تولید فیبر از طریق تنظیم منفی عامل رشد تغییردهنده بتا ۱ (TGF- $\beta$ 1)<sup>۲۵</sup> که عامل مهمی در فیبروز قلبی می‌باشد، جلوگیری می‌نماید (۳۳). در تحقیقات دیگری نیز مشاهده شده که فعالیت ورزشی می‌تواند از طریق کاهش پروتئین پروآپوپتوتیک Bax و افزایش پروتئین آنتی‌آپوپتوتیک Bcl-2 و Apaf-1، با تحکیم دیواره میتوکندری و مهار آزادسازی سیتوکروم c، مانع فعال شدن کاسپاز ۹ شود. کاسپاز ۹ نیز با فعال ساختن کاسپاز ۳ می‌تواند به تنظیم مثبت روند آپوپتوز کمک کند (۳۶-۳۴). در تحقیق حاضر سطوح قلبی کاسپازهای ۹ و ۳ تعیین نشد که می‌تواند از محدودیت‌های پژوهش حاضر محسوب گردد ولی در تحقیقات دیگر مشاهده شد که فعالیت ورزشی با کاهش فعالیت کاسپاز آغازگر ۹ و کاسپاز اجرایی ۳ می‌تواند از دو مسیر داخلی و خارجی مانع آپوپتوز و قطعه‌قطعه شدن DNA شود (۱۰، ۳۷).

اکثر مطالعاتی که به بررسی تأثیر فعالیت ورزشی بر آپوپتوز قلبی پرداخته‌اند، از فعالیت‌های ورزشی هوازی با شدت متوسط استفاده کرده‌اند. تنها در یک مطالعه لو و همکاران (۲۰۱۵)، به مقایسه تأثیر حفاظتی تمرین تناوبی پر شدت و فعالیت هوازی با شدت متوسط بر شاخص‌های آپوپتوز قلبی در موش‌های مبتلا به سکتة قلبی پرداخته‌اند که نتایج بیانگر تغییر معنادار در میزان شاخص‌های آپوپتوز قلبی (کاهش بیان Bax و افزایش بیان Bcl-2) نسبت به گروه کنترل در هر دو نوع روش تمرینی بود و هیچ تفاوتی بین دو گروه فعالیت در میزان این عوامل مشاهده نشد (۳۸). مطالعه حاضر نیز نشان داد که تمرینات HIIT می‌تواند به‌عنوان جایگزینی کارآمد از لحاظ زمانی به‌جای تمرینات استقامتی سنتی با توجه به



- sarcopenia of aging. *Scientific World Journal*. 2010; 10: 340-349.
7. Gross A. BCL-2 family proteins as regulators of mitochondria metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 2016; 1857(8): 1243-1246.
  8. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014; 15: 49-63.
  9. Strait JB, Lakatta EG. Aging-associated cardiovascular changes and their relationship to heart failure. *Heart Fail Clin*. 2012; 8: 143-164.
  10. Kwak HB. Effects of aging and exercise training on apoptosis in the heart. *J Exerc Rehabil*. 2013; 9: 212-219.
  11. Fannin J, Rice KM, Thulluri S, Arvapalli RK, Wehner P, Blough ER. The Effects of aging on indices of oxidative stress and apoptosis in the female fischer 344/Nnia X brown Norway/BiNia rat heart. *Open Cardiovasc Med J*. 2013; 7: 113-121.
  12. 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*. 2008; 105: 1934-1943.
  13. Lee SD, Shyu WC, Cheng IS, Kuo CH, Chan YS, Lin YM, Tasi CY, Tsai CH, Ho TJ, Huang CY. Effects of exercise training on cardiac apoptosis in obese rats. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2013; 23: 566-73.
  14. Jafari A, Pourrazi H, Nikookheslat S, Baradaran B. Effect of exercise training on Bcl-<sup>13</sup> Qiagen
  - <sup>14</sup> Effendrof
  - <sup>15</sup> Optical Density: OD
  - <sup>16</sup> Fermentas
  - <sup>17</sup> Diethylpyrocarbonate
  - <sup>18</sup>  $\beta$ -actin
  - <sup>19</sup> Phospho-p38
  - <sup>20</sup> Heat Shock Protein 70
  - <sup>21</sup> Mn-SOD
  - <sup>22</sup> Extracellular signal-regulated kinases
  - <sup>23</sup> Sirtuins
  - <sup>24</sup> Heat shock protein
  - <sup>25</sup> Transforming growth factor beta
- ### منابع
1. Seo H, Park CH, Choi S, Kim W, Jeon BD, Ryu S. Effects of voluntary exercise on apoptosis and cortisol after chronic restraint stress in mice. *J Exerc Nutrition Biochem*. 2016; 20: 16-23.
  2. Khan KH, Blanco-Codesido M, Molife LR. Cancer therapeutics: Targeting the apoptotic pathway. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2014; 90: 200-219.
  3. Pistrutto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*. 2016; 8: 603-619.
  4. Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol* 2011; 13: 184-190.
  5. Parrish AB, Freel CD, Kornbluth S. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013; 5: 1-25.
  6. Marzetti E, Privitera G, Simili V, Wohlgemuth SE, Aulisa L, Pahor M, Leeuwenburgh C. Multiple pathways to the same end: mechanisms of myonuclear apoptosis in

22. 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; 20:791-793.
23. Ko IG, Kim SE, Jee YS. Treadmill exercise alleviates aging-induced apoptosis in rat cardiac myocytes. *Gerontology*. 2013; 7: 152-157.
24. Huang CY, Lin YY, Hsu CC, Cheng SM, Shyu WC, Ting H Yang AL, Ho TJ, Lee SD. Antiapoptotic effect of exercise training on ovariectomized rat hearts. *J Appl Physiol*. 2016; 121: 457-465.
25. Wang Z, Liu D, Varin A, Nicolas V, Courilleau D, Mateo P, Caubere C, Rouet P, Gomez AM, Vandecasteele G, Fischmeister R, Brenner C. A cardiac mitochondrial cAMP signaling pathway regulates calcium accumulation, permeability transition and cell death. *Cell Death Dis*. 2016; 7: e2198.
26. Feng P, Li T, Guan Z, Franklin RB, Costello LC. The involvement of Bax in zinc-induced mitochondrial apoptosis in malignant prostate cells. *Mol Cancer*. 2008; 7: 1-6.
27. French JP, Hamilton KL, Quindry JC, Lee Y, Upchurch PA, Powers SK. Exercise-induced protection against myocardial apoptosis and necrosis: MnSOD, calcium-handling proteins, and calpain. *FASEB J*. 2008; 22: 2862-2871.
28. Cagnol S, Chambard JC. ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death-apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J*. 2010; 277: 2-21.
29. Lanneau D, Brunet M, Frisan E, Solary E, Fontenay M, Garrido C. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *J Cell Mol Med*. 2008; 12: 743-761.
- 2 and Bax gene expression in the rat heart. *Gene Cell Tissue*. 2015; 2: e32833.
15. Gibala MJ, Ballantyne C. High-intensity interval training: New insights. *Sports Science Exchange*. 2007; 20(2): 1-5.
16. Gibala MJ, Little JP, Macdonald MJ, Hawley JA. Physiological adaptations to low-volume, high-intensity interval training in health and disease. *J Physiol*. 2012; 590(5): 1077-1084.
17. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 (Delta Delta C (T)) Method. *Methods*. 2001; 25(4): 402-408.
18. Gibala MJ, McGee SL, Garnham AP, Howlett KF, Snow RJ, Hargreaves M. Brief intense interval exercise activates AMPK and p38 MAPK signaling and increases the expression of PGC-1alpha in human skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2009; 106: 929-934.
19. Thomas C, Bishop D, Moore-Morris T, Mercier J. Effects of high-intensity training on MCT1, MCT4, and NBC expressions in rat skeletal muscles: influence of chronic metabolic alkalosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007; 293: E916-922.
20. Yuan Q, Chen Z, Santulli G, Gu L, Yang ZG, Yuan ZQ, Zhao YT, Xin HB, Deng KY, Wang SQ, Ji G. Functional role of Calstabin2 in age-related cardiac alterations. *Sci Rep*. 2014; 4: 1-9.
21. Lee BS, Kim SH, Jin T, Choi EY, Oh J, Park S, Lee SH, Chung JH, Kang SM. Protective effect of survivin in Doxorubicin-induced cell death in h9c2 cardiac myocytes. *Korean Circ J*. 2013; 43:400-407.

37. Habibi P, Alihemmati AR, NourAzar AR, Yousefi H, Mortazavi S, Ahmadiasl N. Expression of the Mir-133 and Bcl-2 could be affected by swimming training in the heart of ovariectomized rats. *IJBMS*. 2016; 19: 381-387.
38. Lu K, Wang L, Wang C, Yang Y, Hu D, Ding R. Effects of high-intensity interval versus continuous moderate-intensity aerobic exercise on apoptosis, oxidative stress and metabolism of the infarcted myocardium in a rat model. *Mol Med Rep*. 2015; 12(2): 2374-2382.
30. Trocoli A, Djavaheri-Mergny M. The complex interplay between autophagy and NF- $\kappa$ B signaling pathways in cancer cells. *Am J Cancer Res*. 2011; 1: 629-649.
31. Zhang X, Tang N, Hadden TJ, Rishi AK. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1813: 1978-1986.
32. Lai CH, Ho TJ, Kuo WW, Day CH, Pai PY, Chung LC, Liao PH, Lin FH, Wu ET, Huang CY. Exercise training enhanced SIRT1 longevity signaling replaces the IGF1 survival pathway to attenuate aging-induced rat heart apoptosis. *Age (Dordr)*. 2014; 36: 1-13.
33. Siu PM, Bryner RW, Martyn JK, Alway SE. Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles. *FASEB J*. 2004; 18: 1150-2. PMID: 15132982
34. Xiong S, Mu T, Wang G, Jiang X. Mitochondria-mediated apoptosis in mammals. *Protein Cell* 2014; 5: 737-749.
35. Hardwick JM, Soane L. Multiple functions of BCL-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013; 5: 1-22.
36. Bratton SB, Salvesen GS. Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome. *J Cell Sci*. 2010; 123: 3209-3214.



Shahid Beheshti University

## Sport and Exercise Physiology

Autumn & Winter 2019/ No.2/ Vol. 11/ Pages: 13-24

---

---

### Effect of high-intensity interval training on expression of pro and anti-apoptotic genes in myocard tissue of aged male C57BL/6 mice

Rahman Soori\*, Maryam Zare Shahneh, Sirus Choobineh, Azam Ramezankhani

Department of exercise physiology, Faculty of physical education and sport sciences, Tehran University, Tehran, Iran.

Received: 11/10/2017

Revised: 05/02/2018

Accepted: 08/05/2018

**Purpose:** Bax and BCL-2 genes are important genes that involve in the intrinsic pathway of apoptosis. Although the effects of interval and intensive exercises on the mechanisms involved in the gaining processes are less considered. So, the aim of the present study was to investigate the effect of high-intensity interval training on the expression of pro and anti-apoptotic genes (Bax and BCL-2) in myocard in aged male mice.

**Methods:** This experimental study was performed on twenty 24- months old C57BL/6 mice. Animals were randomly assigned to the control (n=10) and experimental groups (n=10). The experimental group performed high interval intensity training for four weeks (five sessions per week). At first, the interval training started at the intensity equal to 85 percent of maximum speed and in the continuation of interval training, 5 percent was added weekly and the last two weeks ended with 95 percent rate. Forty-eight hours after the last training session, myocardial muscle was removed. Bax and BCL-2 genes expression were investigated by SYBR-Green Real-time PCR analysis.

**Results:** The results of Real Time-PCR showed that the average relative expression of pro-apoptotic Bax gene was significantly lower in the experimental group than in the control group ( $0.618 \pm 0.022$  vs. 1 unit;  $P < 0.05$ ). Also, the average relative expression of Anti-apoptotic Bcl2 gene expression was higher in the experimental group than in the control group ( $1.824 \pm 0.084$  vs. 1 unit;  $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** The results showed that high-intensity interval training by modifying the expression of pro and anti-apoptotic genes (Bax and BCL-2) may be effective in reducing apoptosis in cardiac tissue of aged mice.

**Keywords:** Bax, BCL-2, High-intensity interval training, Myocard apoptosis.

---

\* Corresponding Author: Rahman Soori. Tel: 021-88351741. E-Mail: soori@ut.ac.ir