

تأثیر تعاملی تمرین هوازی در آب و مکمل کروسین بر بیان ژن‌های BAX و BCL-2 کاردیومیوسیتی در رت‌های نر تیمار شده با پراکسید هیدروژن

مینا اکبری^۱، فرشته شهیدی^۲، حمید رجبی^۳، مجید کاشف^۴، زهره مظاهری^۵

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: هدف از انجام پژوهش حاضر، تعیین اثر تعامل تمرین هوازی در آب و مکمل کروسین بر بیان ژن‌های BAX و BCL-2 کاردیومیوسیتی در رت‌های نر مسموم شده با H_2O_2 بود.

روش‌ها: ۳۶ سر رت جوان نژاد ویستار با میانگین وزنی ۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم به صورت تصادفی به شش گروه «شش» H_2O_2 ، H_2O_2 + کروسین، H_2O_2 + فعالیت در آب، H_2O_2 + فعالیت در آب + کروسین و گروه شاهد» تقسیم شدند. فعالیت در آب ۵ روز در هفته دقیقه، هر بار ۶۰ دقیقه و به مدت شش هفته صورت گرفت. ۱ میلی‌مول بر کیلوگرم H_2O_2 و ۱۲/۵ میلی‌مول بر کیلوگرم کروسین نیز به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. به منظور بیان ژن‌ها از دستگاه Real time polymerase chain reaction (Real Time PCR) و برای تأیید بروز آپوپتوز از روش Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) استفاده شد. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها آزمون‌های Scheffe, One-Way ANOVA, Levene, Kolmogorov-Smirnov مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: القای H_2O_2 با افزایش معنی‌دار بیان BAX همراه بود ($P = ۰/۰۰۱$). شش هفته فعالیت در آب منجر به کاهش بیان BCL-2 ($P = ۰/۰۲۳$) و القای کروسین نیز باعث کاهش معنی‌دار بیان BAX شد. تعامل بین فعالیت‌های القای کروسین و القای H_2O_2 اثر کاهنده‌ای بر بیان BCL-2 داشت که نشان دهنده‌ی تأثیر حفاظتی فعالیت منظم در کاهش آپوپتوز کاردیومیوسیتی می‌باشد.

نتیجه‌گیری: فعالیت منظم در آب و همچنین، مصرف کروسین به صورت جداگانه، منجر به کاهش معنی‌داری در بیان BAX و افزایش معنی‌داری در بیان BCL-2 می‌شود. از سوی دیگر، تلفیق فعالیت منظم و کروسین تأثیر هم‌افزایی و سینرژیک در مهار بیان BAX و افزایش بیان BCL-2 در رت‌های مسموم شده با H_2O_2 دارد.

واژگان کلیدی: تمرین هوازی در آب، کروسین، پروتئین BAX، پروتئین‌های BCL-2، پراکسید هیدروژن، کاردیومیوسیت

ارجاع: اکبری مینا، شهیدی فرشته، رجبی حمید، کاشف مجید، مظاهری زهره. تأثیر تعاملی تمرین هوازی در آب و مکمل کروسین بر بیان ژن‌های BAX و BCL-2 کاردیومیوسیتی در رت‌های نر تیمار شده با پراکسید هیدروژن. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۸؛ ۳۷ (۵۲۵): ۴۴۳-۴۴۳

مقدمه

بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی، علت عمده‌ی مرگ و میر در جهان تا سال ۲۰۲۰ ایسکمی میوکارد خواهد بود. بنابراین، آسیب‌های قلبی شیوع گسترده‌ای دارند و توسعه‌ی راهکارهای محافظتی در برابر این بیماری‌ها بسیار مهم است (۱-۳). عوامل متعددی در بروز بیماری‌های قلبی - عروقی (Cardiovascular disease یا CVDs) مشارکت دارند که از جمله این عوامل می‌توان به آلاینده‌های هوا اشاره نمود. به همین جهت، افزایش نگرانی در مورد اثرات نامطلوب آلودگی‌های مختلف بر سلامت انسان وجود دارد. در همین راستا، نتایج مطالعات اپیدمیولوژیک نشان می‌دهد که قرار گرفتن در معرض آلودگی هوا در درازمدت، موجب تولید رادیکال‌های آزاد می‌گردد (۴، ۵). بیشتر CVDs همراه با عدم تعادل بین تشکیل گونه‌های اکسیژن

مشارکت دارند که از جمله این عوامل می‌توان به آلاینده‌های هوا اشاره نمود. به همین جهت، افزایش نگرانی در مورد اثرات نامطلوب آلودگی‌های مختلف بر سلامت انسان وجود دارد. در همین راستا، نتایج مطالعات اپیدمیولوژیک نشان می‌دهد که قرار گرفتن در معرض آلودگی هوا در درازمدت، موجب تولید رادیکال‌های آزاد می‌گردد (۴، ۵). بیشتر CVDs همراه با عدم تعادل بین تشکیل گونه‌های اکسیژن

- ۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی علوم ورزشی، دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی، تهران، ایران
- ۲- استادیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی علوم ورزشی، دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی، تهران، ایران
- ۳- دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
- ۴- استاد، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی علوم ورزشی، دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی، تهران، ایران
- ۵- دکتری تخصصی، مرکز تحقیقات علوم پایه، شرکت هیستونوتک، تهران، ایران

نویسنده‌ی مسؤؤل: مینا اکبری

Email: akbariteach@gmail.com

است که به وسیله آن، مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو درازمدت افزایش می‌یابد و یک راهکار فیزیولوژیک ارزشمند جهت پیش‌آماده‌سازی میوکارد می‌باشد (۱۷-۱۶).

در مجموع، فعالیت بدنی دارای پتانسیلی است که تکثیر و مرگ سلولی را از طریق سیتوکین‌ها، هورمون‌ها، شاخص‌های رشد و مسیرهای متابولیک تعدیل می‌کند. نتایج تحقیق Ascensao و همکاران نشان داده است که تمرینات استقامتی طولانی مدت می‌تواند بیان ژن پروتئین‌های BAX و BCL-2 میوکارد را تغییر دهد و آپوپتوز قلبی را توسط استرس اکسیداتیو تحریک نماید (۹). Kwak و همکاران نیز به این نتیجه رسیدند که تمرینات ورزشی، سیگنالینگ پروآپوپتوز بالادست در خانواده‌ی BCL-2 را از طریق کاهش کاسپاز ۹، BAX و همچنین، افزایش BCL-2 که به کاهش نسبت BAX/BCL-2 ختم می‌شود، کاهش می‌دهد (۱۸). این یافته‌ها نشان می‌دهد که تمرینات ورزشی اثری محافظتی در قلب رت‌ها دارد. Melo و همکاران گزارش کردند که انجام ۱۰ هفته تمرینات منظم شنا در رت‌های نر، باعث افزایش پروتئین‌های ضد آپوپتوز (BCL-2) و BCL-x و کاهش پروتئین‌های محرک آپوپتوز (Bad) می‌گردد. بنابراین، به نظر می‌رسد که فعالیت ورزشی تا حدودی از طریق کاهش ROS و پیشگیری از رهاسازی سیتوکروم C درون میتوکندریایی، در کاهش آپوپتوز سلول قلبی مفید باشد. همچنین، آن‌ها پراکسیداسیون لیپید را به عنوان نشانگر آسیب اکسیداتیو به دنبال تجویز H_2O_2 اندازه‌گیری کردند (۱۹). با این حال، نتایج پژوهشی نشان داد که H_2O_2 به تنهایی پراکسیداسیون لیپید را ایجاد نمی‌کند (۲۰)، اما می‌تواند منجر به القای آسیب اکسیداتیو پروتئین شود (۱۲).

با توجه به توسعه‌ی روزافزون اکسیدان‌ها، سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی اندوژن توانایی خنثی‌سازی لازم را ندارد و باید از آنتی‌اکسیدان‌های اگزوژن استفاده نمود که از آن جمله می‌توان به زعفران که یک گیاه ایرانی شناخته شده در جهان است و البته ماده‌ی مؤثر آن به نام کروسین که خاصیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌آپوپتوتیک بسیار قوی دارد، اشاره کرد. کاتالاز، آنتی‌اکسیدانی است که به طور مستقیم در روند خنثی‌سازی H_2O_2 شرکت دارد. این آنزیم می‌تواند تعداد زیادی از این رادیکال‌های آزاد را خنثی و به اکسیژن و آب که مواد حیاتی برای بدن هستند، تبدیل کند. بنابراین، مجموعه‌ی آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase یا SOD) و کاتالاز، اولین خط دفاعی سلول‌ها در برابر سمیت ناشی از رادیکال‌های آزاد می‌باشند که در اغلب مطالعات، کروسین عامل افزایش دهنده‌ی آنزیم کاتالاز بوده است. همچنین، تحقیقات متعددی هم در حیوانات و هم در انسان‌ها به این نتیجه رسیده‌اند که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز در خون و در بافت‌ها، پس از

واکنش‌پذیر (Reactive oxygen species یا ROS) و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌باشند که باعث انحراف از حالت پایدار می‌شود (۳-۶). در حقیقت، استرس اکسیداتیو و رادیکال‌های آزاد در مسیرهای سیگنالی متداول و مشترکی سهیم می‌باشند و نقش محوری در مکانیسم‌های فیزیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک عملکرد قلب و اختلالات آن ایفا می‌کنند (۴، ۲). استرس اکسیداتیو با از بین رفتن تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و سمیت‌زدایی آن‌ها توسط عوامل آنتی‌اکسیدان بروز می‌کند (۸-۷) و می‌تواند از طریق پراکسیداسیون لیپیدها و پروتئین‌ها و همچنین، فعال کردن مسیرهایی که به آپوپتوزی ختم می‌گردد، باعث آسیب بافتی شود (۹).

آب اکسیژنه (پراکسید هیدروژن) (H_2O_2) یک اکسیدان ملایم و نسبتاً پایدار است که به طور گسترده‌ای به عنوان نشانگر ROS به منظور ارزیابی پاسخ سلول‌ها به استرس اکسیداتیو استفاده می‌شود (۱۱-۱۰). برخی شواهدی نشان می‌دهد که فشار اکسیداتیو اثر تخریبی خود بر سلول‌ها را از طریق ایجاد اختلال در مسیرهای سیگنالینگ درون سلولی آپوپتوز ایجاد می‌نماید (۱۲). نتایج چندین مطالعه حاکی از آن است که ایسکمی و ریپرفیوژن نیز باعث تولید رادیکال‌های آزاد (ROS) و به تدریج ترومبوزیس، مرگ سلولی و آسیب به عروق کرونری قلب در رت‌های نر می‌شود (۱۳). Li و همکاران با انجام پژوهشی به این نتیجه رسیدند که ROS نقشی اساسی در پاتوفیزیولوژیک بیماران قلبی دارد. همچنین، آن‌ها عنوان کردند که ROSهای مختلف، باعث تحریک مسیرهای سیگنالینگ آپوپتوزی درون سلول‌های میوکاردی می‌شود (۱۴).

H_2O_2 یکی از قوی‌ترین ROSها می‌باشد که بیشتر محققان از آن به عنوان یک روش شبیه‌سازی استرس اکسیداتیو استفاده می‌کنند. نتایج مطالعه‌ی Janero و همکاران نشان داد که H_2O_2 باعث آسیب جدی به سارکولمای سلول‌های قلبی می‌گردد (۱۵). در همین راستا، قرار گرفتن مختصر سلول‌های قلبی در معرض H_2O_2 می‌تواند مکانیسم‌های پاتولوژیک را که منجر به آسیب سلولی می‌شود، تحریک کند. همچنین، سبب انتشار سیتوکروم C به درون سیتوزول سلول‌های قلبی می‌گردد (۱۳). بنابراین، احتمال دارد که ایسکمی و ریپرفیوژن، ROS تولید کند و از طریق ایجاد اختلال در مسیرهای سیگنالینگ درون سلولی، آپوپتوز ایجاد شود و در همین راستا، H_2O_2 مسیر مشابهی را در ایجاد آپوپتوز فعال می‌کند. در مسیر داخلی، سیتوکروم C از فضای بین دو غشای میتوکندری به داخل سیتوپلاسم آزاد می‌شود. نفوذپذیری غشای میتوکندری به سیتوکروم C توسط نسبت واسطه‌های پروآپوپتوتیک مانند BAX یا Bak و آنتی‌آپوپتوتیک BCL-2 تعیین می‌شود. از طرف دیگر، تأثیر تحریکی فعالیت تمرینی بر روی تولید ROS، یک پدیده‌ی مهم از سازگاری ناشی از تمرین

فعالیت ورزشی هوازی افزایش می‌یابد (۲۱).

Sachdeva و همکاران با بررسی اثرات محافظتی عصاره‌ی آبی زعفران در مقابل آسیب‌های ایسکمی ناشی از ایزوپروترونول بر قلب، عنوان کردند که این عصاره عملکرد انقباضی و ساختار سلول‌های عضلانی و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی قلب را از آسیب‌های ایسکمی محافظت می‌کند و منجر به حفظ شاخص‌های همودینامیک و عملکردی بطن چپ و جلوگیری از آسیب به ساختار و یکپارچگی بطن چپ می‌شود و همچنین، تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی قلب را از طریق تحلیل استرس اکسیداتیو و شاخص‌های ذکر شده حفظ می‌نماید و ایسکمی را به تأخیر می‌اندازد (۲۲). در پژوهش دیگری، مهدی‌زاده و همکاران با بررسی اثرات محافظتی عصاره‌ی زعفران بر سکت‌های قلبی ناشی از ایزوپروترونول، گزارش نمودند که این عصاره از افزایش شاخص‌های آسیب قلبی در سرم [لاکتات دهیدروژناز (Lactate dehydrogenase یا LDH)، کراتین فسفوکیناز (Creatine phosphokinase یا CPK) میوکارد قلب] و مالون دی‌آلدئید (Malondialdehyde یا MDA) بافت قلب جلوگیری می‌کند که نشان دهنده‌ی اثرات محافظتی عصاره‌ی زعفران و سافرانال در مقابل سکت‌ها از طریق جلوگیری از تغییر در وضعیت ردوکس سلول می‌باشد که منجر به تحلیل استرس اکسیداتیو در بافت قلب می‌شود. این نتایج پیشنهاد می‌کند که مصرف کروسین به حد کافی می‌تواند به حفظ ساختار و عملکرد قلبی کمک نماید و در نتیجه، باعث کاهش عوامل خطرزای قلبی گردد (۲۳).

رضوی و همکاران با انجام مطالعه‌ای به این نتیجه رسیدند که مصرف ۲۵ تا ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن کروسین در روز از راه داخل صفاقی، سبب محافظت قلب در برابر آپوتوز ایجاد شده با دیاژینون گردید. کاهش لیپید پراکسیداسیون غشای بافت قلب، افزایش میزان گلوتاتیون، افزایش نسبت BCL-2/BAX، کاهش آزادسازی سیتوکروم C به داخل سیتوزول و مهار فعال‌سازی کاسپاز ۳ در قلب رت نیز از جمله مکانیسم‌های دخیل در اثرات آنتی‌آپوتوتیک کروسین در آپوتوز در قلب رت شناخته شد (۲۴).

در مجموع، نتایج تحقیقات نشان داده است که فعالیت بدنی با تغییرات در ژن‌های ضد آپوتوز و طرفدار آپوتوز و مداخله‌ی هر دو مسیر داخلی و خارجی یعنی مسیر وابسته به میتوکندری و مسیر وابسته به گیرنده‌ی مرگ، منجر به تغییرات در آپوتوز سلول می‌شود. همچنین، فعالیت ورزشی می‌تواند اثرات مطلوبی بر سطوح شاخص‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی داشته باشد. علاوه بر این، پژوهش‌های صورت گرفته حاکی از اثرات مفید کروسین از جمله خواص آنتی‌اکسیدانی، مهار رادیکال‌های آزاد و... می‌باشد. بنابراین، با توجه به اثرات مفید فعالیت بدنی و مصرف کروسین، به نظر

می‌رسد که انجام مطالعه‌ای با هدف تعیین تأثیر تمرین هوازی در آب و مکمل کروسین بر بیان ژن‌های BAX و BCL-2 کاردیومیوسیتی در رت‌های نر مسموم شده با پراکسید هیدروژن لازم و ضروری به نظر می‌رسد.

روش‌ها

۳۶ رت نر جوان صحرایی نژاد ویستار با محدوده‌ی وزنی ۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم از مرکز دانش‌بنیان شهید میرغنی و وارنا خریداری شدند و در حیوان‌خانه دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی تحت شرایط استاندارد نور، دما و رطوبت قرار گرفتند. بدین صورت که رت‌ها در یک اتاق به دور از هرگونه آلودگی در دمای ۲۲ تا ۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و با رطوبت ۴۰ تا ۶۰ درصد به مدت ۲۱ روز به مدت ۱۲ ساعت در معرض روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی به منظور سازگاری با محیط و همچنین، رسیدن به میانگین وزنی نگهداری شدند. رت‌ها دسترسی آزادانه به آب و غذا داشتند، غذای آنها، فشرده و آماده مخصوص رت‌ها و آب مصرفی نیز آب تصفیه شده‌ی شهری بود که در ظرف آبخوری از جنس Polyvinyl chloride (PVC) در دسترس گروه حیوانات قرار گرفت و پس از سه هفته جهت سازگاری با محیط جدید و به وزن رسیدن، رت‌ها به صورت تصادفی به شش گروه شش‌تایی شامل گروه شم تزریق (سالین)، گروه تزریق پراکسید هیدروژن، گروه پراکسید هیدروژن + کروسین، گروه پراکسید هیدروژن + فعالیت در آب، گروه پراکسید هیدروژن + فعالیت در آب + کروسین و گروه شاهد تقسیم شدند. با توجه به این که تحقیق حاضر از نوع نیمه تجربی بود، بر اساس موازین اخلاقی برای دریافت کد اخلاق مراحل داوری پروپوزال توسط داوران پژوهشگاه تربیت بدنی صورت گرفت و کد اخلاق به شماره‌ی ۱۱/۲۴۳۴۳، کد پیگیری ۴۵۳۰۶ و مشخصه‌ی IR.SSI.REC.1397.254 دریافت گردید.

پروتکل فعالیت: پروتکل فعالیت در آب در دو مرحله به صورت آموزش و تمرین برگزار شد. مرحله‌ی آموزش شامل هفته‌ی اول بود که در روز اول رت‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در یک مخزن استاندارد (۱۴۰ × ۶۰ × ۴۵ سانتی‌متر) (مدل KAHR0BA20A و شماره‌ی ۷۷۶۹۲۹۹۰۶، شرکت Electro) با درجه‌ی حرارت آب ۳۳ تا ۳۶ درجه‌ی سانتی‌گراد در آزمایشگاه دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی در آب متلاطم فعالیت داشتند. دوره‌ی فعالیت در آب متلاطم روزانه ۱۰ دقیقه تمدید گردید تا رت‌ها قادر به فعالیت کردن در آب برای ۶۰ دقیقه شدند. سپس مرحله‌ی تمرین در آب به مدت ۶۰ دقیقه در روز و ۵ روز در هفته (در مجموع به مدت ۶ هفته) اجرا شد. فعالیت در آب به دلیل این که یک فعالیت ذاتی در رت‌ها می‌باشد و همچنین، آسیبی به پاها نمی‌رساند و به صورت فیزیکی صدمه‌ی کمتری برای

رت‌ها دارد، انتخاب گردید (۲۵).

القای H_2O_2 ۳۰ دقیقه قبل از تمرین، ۱ میلی‌مول بر کیلوگرم H_2O_2 به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به مدت ۳ هفته و یک روز در میان به صورت داخل صفاقی در پای راست رت‌های گروه‌های القا تزریق گردید (۲۶). H_2O_2 تزریق شده ۳۰ درصد بود و از شرکت Merck (آلمان) توسط شرکت شیمی عناصر پاک سفارش داده شد. به منظور حذف اثر حاد آخرین جلسه‌ی فعالیت، ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه‌ی تمرین و پس از ۱۲-۱۰ ساعت ناشتایی، رت‌ها کشته شدند و قلب آن‌ها جدا گردید. سپس در نیتروژن مایع منجمد با دمای $-80^{\circ}C$ درجه‌ی سانتی‌گراد جهت تجزیه و تحلیل بعدی نگهداری شدند. در نهایت، نمونه‌ها برای سنجش‌های مختلف بیوشیمیایی هموژنیزه شد.

القای کروسین: کروسین با خلوص ۹۸ درصد از شرکت Sigma (آلمان) توسط شرکت کیمیاگستر سفارش داده شد. بدین ترتیب، روزانه ۱۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کروسین با ۵ سی‌سی آب مقطر رقیق و با کمک سرنگ انسولین به صورت تازه در ناحیه‌ی داخل صفاقی تزریق شد که این تزریق در گروه ترکیب القای کروسین + پراکسید هیدروژن، بلافاصله پس از تزریق پراکسید هیدروژن و در پای چپ رت‌ها صورت گرفت. این عمل به مدت ۳ هفته انجام گردید. با توجه به این که پراکسید هیدروژن در مطالعات تأثیر دوگانه‌ای نشان داده است (۲۷)، مداخله‌ای با تزریق کروسین نداشت. رت‌ها ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه‌ی فعالیت در آب و پس از ۱۲-۱۰ ساعت ناشتایی با استفاده از گاز CO_2 قربانی شدند و پس از شکافتن حفره‌ی شکمی، بافت قلب به دقت جدا گردید و پس از شستشو با آب مقطر و توزین وزن، بلافاصله در فریزر با دمای $-80^{\circ}C$ درجه‌ی سانتی‌گراد به منظور اندازه‌گیری سطوح BCL-2 و BAX مورد استفاده قرار گرفت. جهت تأیید بروز آپوپتوز، نمونه‌های بافتی با روش Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) بررسی شد.

جهت اندازه‌گیری تعداد سلول‌های آپوپتوز شده در مطالعه‌ی حاضر، از رنگ‌آمیزی TUNEL استفاده گردید. قطعه قطعه شدن، فرایند غیر قابل بازگشتی است که حتی قبل از این که تغییراتی در نفوذپذیری غشا روی دهد، صورت می‌گیرد. به نظر می‌رسد که فعال شدن آندونوکلاز هسته‌ای وابسته به کلسیم و منیزیم باعث این رویداد می‌شود. این آنزیم به طور انتخابی DNA را در محل بین واحدهای نوکلئوزومی می‌شکند و با نشاندار کردن آنزیمی با استفاده از TUNEL که قادر است انتهای شکست‌ها در زنجیره‌ی DNA را شناسایی کند، بررسی می‌شود. در تحقیق حاضر، رنگ‌آمیزی ناحیه‌ی آپوپتوز به کمک کیت (Roche In Situ Cell Death Detection Kit, POD، شرکت Merck، آلمان) انجام گرفت. به این ترتیب که پس از

پارافین‌زدایی، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در گزیرلول قرار گرفت. سپس لام‌ها به ترتیب در الکل‌های ۹۰، ۸۰ و ۷۰ درصد آبدهی شد. پس از آن، لام‌ها با استفاده از محلول Phosphate buffered saline (PBS) شسته شد و به مدت ۲۰ دقیقه در پروتئیناز k با دمای $37^{\circ}C$ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید. در ادامه، لام‌های بافتی مورد نظر به مدت ۱۰ دقیقه با محلول نفوذپذیرکننده انکوبه و مجدد با محلول PBS شستشو شد. در مرحله‌ی بعد، ۵۰ میکرولیتر محلول رنگ TUNEL روی هر نمونه‌ی بافتی ریخته شد و به مدت یک ساعت در دمای $37^{\circ}C$ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید و پس از شستشوی نهایی با میکروسکوپ فلورسنت (Zeiss LSM 5 آلمان) مشاهده گردید.

به منظور شمارش سلول‌های مرده، ۵ فیلد در هر گروه مورد شمارش قرار گرفت. سطحی معادل ۱ میلی‌متر مربع در هر گروه جهت شمارش در نظر گرفته شد. در این پروتکل، جهت رنگ‌آمیزی نمونه‌های شاهد مثبت، هر دو محلول TUNEL Enzyme و TUNEL Lable به نسبت ۱ به ۹ مورد استفاده قرار گرفت؛ در حالی که برای نمونه‌های شاهد منفی تنها از TUNEL Lable استفاده گردید. سلول‌های آپوپتوز شده در این بافت، نقطه‌های روشنی بودند که نمایانگر سلول‌های آپوپتوز شده‌ی نشاندار شده طی رنگ‌آمیزی TUNEL می‌باشند. هسته‌ی سلول‌ها با ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رنگ Propidium iodide (PI) به عنوان محلول ذخیره که به میزان ۵۰۰ برابر رقیق شده بود، به صورت قرمز درآمد و سلول‌های سبز رنگ TUNEL مثبت پس از ترکیب با رنگ قرمز، نارنجی رنگ شدند که از سلول‌های سالم قرمز رنگ قابل تفکیک و شمارش بودند. نمونه‌ها پس از جراحی بلافاصله به نیتروژن مایع انتقال داده شد. RNA به روش دستی با استفاده از محلول تریزول (شرکت Sigma، آلمان) استخراج گردید. جهت سنتز cDNA، از RNA استخراج شده از کیت سنتز cDNA و کیت فرمتاز و برای بیان ژن نیز از دستگاه Real time polymerase chain reaction (Real time PCR) (شرکت ABI Step One، آمریکا) استفاده شد. در این روش ابتدا طراحی پرایمر انجام و سپس RNA کل از بافت‌ها استخراج و به cDNA تبدیل گردید. در مرحله‌ی بعد، cDNA به روش PCR تکثیر شد و از نظر بیان ژن‌های مذکور مورد بررسی قرار گرفت.

این تکنیک از ۴ مرحله‌ی اساسی تشکیل شده است. RNA کل از سلول‌های جمع‌آوری شده در هر گروه استخراج گردید. با استفاده از آنزیم کپی‌برداری معکوس به cDNA تبدیل شد. cDNA حاصل جهت حذف DNA ژنومی با آنزیم DNase I تیمار گردید و در نهایت، به روش Real time PCR تکثیر شد.

اولین و مهم‌ترین مسأله در هنگام کار با RNA، دقت در

برداشته و در یک میکروتیوب DEPC شده قرار داده شد. سپس ۱ سی سی ایزوپروپانول بر روی RNA شفاف ریخته شد و به مدت ۱ دقیقه با دست به هم زده شد. ایزوپروپانول و RNA هر دو شفاف بود، اما وقتی این دو با هم مخلوط شوند، مایع کدروی را به وجود می‌آورند. بهتر است محلول به دست آمده یک شب در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار گیرد. پس از افزودن ایزوپروپانول، نمونه‌ها با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفوژ قرار داده شد. پس از خارج کردن از سانتریفوژ، مایع رویی تخلیه و روی آن ۱ سی سی الکل ۷۰ درصد اضافه گردید. پس از Vortex کردن، مخلوط در سانتریفوژ با سرعت ۷۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. سپس مایع رویی با سمپلر تخلیه و پلاک در داخل میکروتیوب خشک شد. به منظور حل کردن RNA، ۲۰ لاند آب مقطر ۶۰ درجه سانتی‌گراد بر روی پلاک داخل میکروتیوب ریخته شد. سپس کمی با سرسمپلر پیپتاژ و به مدت ۵ دقیقه بر روی صفحه‌ی ۶۰ درجه قرار داده شد. RNA استخراج شده تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. درجه‌ی خلوص RNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار گرفت.

ساخت cDNA پس از استخراج RNA با خلوص و غلظت بالا از تمام نمونه‌های مورد بررسی، مراحل سنتز cDNA طبق پروتکل شرکت سازنده (شرکت Fermenta، آمریکا) انجام گرفت و سپس cDNA سنتز شده جهت انجام واکنش رونویسی معکوس مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا کلیه‌ی پرایمرهای طراحی شده‌ی مربوط به تمامی ژن‌ها بررسی گردید و سپس بررسی بیان ژن‌ها با استفاده از روش کمی (quantitative RT PCR) انجام گرفت.

داده‌ها از نظر توزیع طبیعی با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov مورد بررسی قرار گرفت. سپس مفروضه‌های آماری با استفاده از آزمون Levene بررسی گردید و مشخص شد که مفروضه‌ها جهت استفاده از آزمون تحلیل واریانس برقرار بود. در نهایت، آزمون One-Way ANOVA و آزمون تعقیبی Scheffe (به دلیل این که تعداد نمونه‌ها در گروه‌ها برابر نبود) جهت بررسی فرضیه‌های آماری مورد استفاده گردید. داده‌هایی که توزیع نرمال نداشتند نیز با کمک آزمون‌های Kruskal-Wallis و Mann-Whitney U مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها

اثر تمرین و کروسین بر بیان ژن BAX در رت‌های قرار گرفته در معرض H_2O_2 در جدول ۱ و شکل ۱ ارایه شده است. داده‌های شکل ۱ نشان داد که میزان تغییرات بیان BAX در هنگام مصرف کروسین و

جلوگیری از آلودگی با Ribonuclease (RNase) می‌باشد. آنزیم RNase، نوکلئازی است که در هنگام پاره شدن سلول‌ها از بافت خارج می‌شود و روی سطح پوست و درون مایعاتی همچون عرق و بزاق به فراوانی وجود دارد. از طرف دیگر، RNase به دلیل دارا بودن باندهای دی‌سولفیدی درون زنجیره‌ای، در مقابل جوشاندن طولانی و دناتوراسیون ملایم به شدت مقاوم می‌باشد. بنابراین، بهترین راه جهت جلوگیری از بروز مشکل، اجتناب از آلودگی ظروف شیشه‌ای، لوله‌ها و سطوح با این آنزیم است. دقت در ساخت و استفاده از بافرها و پیپتورها نیز یکی از راه‌های جلوگیری از بروز مشکل می‌باشد. تنها راه در صورت آلودگی بافرها با میکروارگانیزم، تعویض بافر است؛ چراکه RNase با اتوکلاو کردن از بین نمی‌رود. بنابراین، هنگام کار با RNA رعایت برخی نکات ضروری به نظر می‌رسد که در ادامه به آن اشاره شده است.

۱- تمامی ظروف و پیپت‌های مورد استفاده باید به ترتیب زیر عاری از آنزیم RNase شوند؛ ابتدا به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و یا ۲۴ ساعت در دمای اتاق در محلول ۰/۱ درصد Diethyl pyrocarbonate (DEPC) قرار داده شوند تا DEPC از بین برود. وجود DEPC می‌تواند مانعی در روند بررسی و تجزیه و تحلیل RNA ایجاد کند.

۲- پوشیدن دستکش و زدن ماسک در تمامی مراحل کار با RNA الزامی است.

۳- تمام بافرها و محلول‌ها باید در آب مقطر تیمار شده با DEPC تهیه گردد.

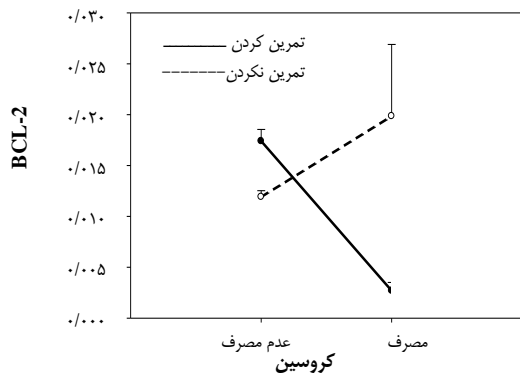
۴- مراحل استخراج RNA زیر هود که ۳۰ دقیقه قبل از آن با UV استریل شده باشد، انجام شود.

استخراج RNA کل: جهت بررسی‌های مولکولی در سطح بیان ژن، ابتدا RNA از بافت‌ها در همه‌ی گروه‌های مورد بررسی، طبق پروتکل شرکت سازنده (شرکت Qiagen، آلمان) استخراج شد. سپس به تخمک‌ها ۳۰۰-۲۰۰ لاند کیازول اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

پس از ۲۴ ساعت، پلاک موجود در کرایوتیوب در حالت نیمه انجاماد توسط سرسمپلر خرد و سپس کمی آن را پیپتاژ گردید. در مرحله‌ی بعد حدود ۱۰۰ لاند کلروفرم به نمونه اضافه شد تا سلول‌ها لیز شود. این محلول حدود ۱ دقیقه باید با سلول‌ها در تماس باشد. پس از ۱ دقیقه، محلول با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و سپس به سه فاز «قسمت بالایی لوله شفاف و حاوی RNA، قسمت وسطی لوله سفید رنگ و محتوی بافت لیز شده، قسمت پایینی لوله صورتی و حاوی کیازول» تقسیم گردید.

مایع شفاف قسمت بالایی لوله که حاوی RNA بود به آرامی

BCL-2 کمتری نسبت به گروه تمرین کرده داشت، اما در گروهی که کروسین مصرف می‌کرد، میانگین گروه تمرین کرده کمتر از گروه تمرین نکرده بود.



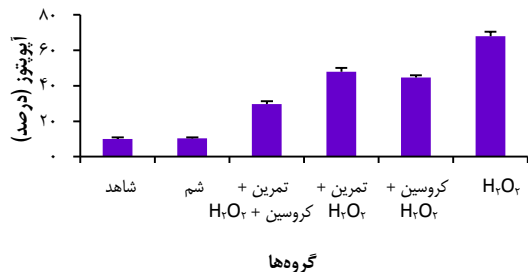
شکل ۲. بیان ژن BCL-2 در گروه‌های مورد بررسی

نتایج تأیید آپوپتوز به روش TUNEL بررسی گردید که داده‌های آن در جدول ۳ ارزیابی شده است.

جدول ۳. میزان آپوپتوز سلولی در گروه‌ها

گروه	میانگین ± انحراف معیار
تمرین + کروسین + H ₂ O ₂	۶۶/۲۹ ± ۱/۶۹
تمرین + H ₂ O ₂	۴۸/۰۰ ± ۲/۱۶
کروسین + H ₂ O ₂	۴۴/۶۶ ± ۱/۲۴
H ₂ O ₂	۶۸/۰۰ ± ۲/۴۴
شم دارو (شاهد)	۱۰/۳۳ ± ۰/۴۷
شاهد منفی	۱۰/۰۰ ± ۰/۸۱

همچنین، درصد آپوپتوز در تمام گروه‌های مورد مطالعه در شکل ۳ نشان داده شده است.



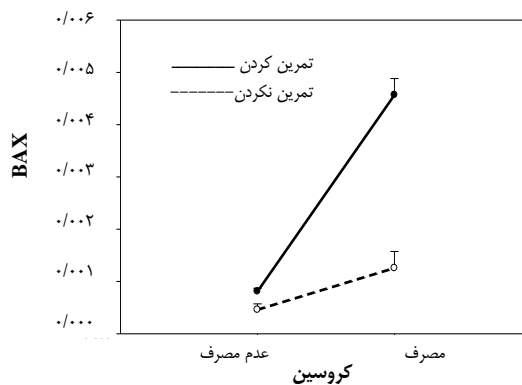
شکل ۳. میزان آپوپتوز در همه‌ی گروه‌های مورد بررسی به روش Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end (TUNEL) labeling

دارونما با توجه به تمرین کردن یا نکردن تغییر می‌کند.

جدول ۱. میانگین بیان ژن BAX در رت‌ها

گروه	میانگین ± انحراف معیار
تمرین + کروسین + H ₂ O ₂	۰/۰۰۰۳ ± ۰/۰۰۰۱
تمرین + H ₂ O ₂	۰/۰۰۱۱ ± ۰/۰۰۰۶
کروسین + H ₂ O ₂	۰/۰۰۰۷ ± ۰/۰۰۰۱
H ₂ O ₂	۰/۰۰۶۴ ± ۰/۰۰۱۵
شم دارو (شاهد)	۰/۰۰۰۱ ± ۰/۰۰۰۳
شاهد منفی	۰/۰۰۰۲ ± ۰/۰۰۰۱

به صورت کلی، گروهی که تمرین کرده بود، BAX بیشتری داشت، اما مصرف کروسین توانست اثر هم‌افزایی بر تمرین داشته باشد.



شکل ۱. بیان ژن BAX در گروه‌های مورد بررسی

اثر تمرین و کروسین بر بیان ژن BCL-2 در رت‌های قرار گرفته در معرض H₂O₂ در جدول ۲ و شکل ۲ آمده است.

جدول ۲. میانگین بیان ژن BCL-2 در رت‌ها

گروه	میانگین ± انحراف معیار
تمرین + کروسین + H ₂ O ₂	۰/۴۵۴۸ ± ۰/۰۰۶۵
تمرین + H ₂ O ₂	۰/۰۰۹۴ ± ۰/۰۰۵۴
کروسین + H ₂ O ₂	۰/۰۰۴۹ ± ۰/۰۰۰۹
H ₂ O ₂	۰/۰۰۲۸ ± ۰/۰۰۰۴
شم دارو (شاهد)	۰/۰۲۷۰ ± ۰/۰۱۰۱
شاهد منفی	۰/۰۱۷۸ ± ۰/۱۵۹۳

مطابق با شکل ۲، میزان تغییرات BCL-2 در هنگام مصرف کروسین و دارونما با توجه به تمرین کردن یا نکردن تغییر می‌کند. گروهی که دارونما دریافت کرده بود و تمرین انجام ن داده بود،

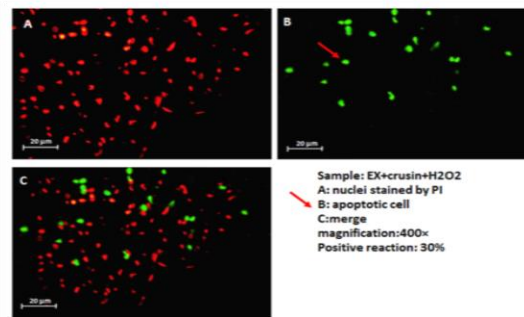
بافت میوکاردی رت‌ها گردید. تعامل بین فعالیت در آب، القای کروسین و القای H_2O_2 دارای اثر کاهنده بر بیان ژن آپوپتوتیک BAX و اثر افزایش‌دهنده بر بیان ژن آنتی‌آپوپتوتیک BCL-2 بود که بیان‌کننده‌ی تأثیر حفاظتی فعالیت منظم در کاهش آپوپتوز کاردیومیوسیتی می‌باشد. میزان آپوپتوز ایجاد شده با القای H_2O_2 ۶۸ درصد بود که این مقدار در تعامل فعالیت ورزشی و مصرف کروسین به ۲۸ درصد رسید. بنابراین، می‌تواند موجب پیشگیری عوارض احتمالی ناشی از آن شود. فعالیت منظم و مصرف کروسین نیز به صورت جداگانه منجر به کاهش معنی‌دار بیان ژن آپوپتوتیک BAX و افزایش معنی‌دار بیان ژن آنتی‌آپوپتوتیک BCL-2 در بافت میوکارد رت‌ها شد.

از سوی دیگر، تلفیق تمرین منظم و کروسین تأثیر هم‌افزایی و سینرژیک در مهار بیان ژن آپوپتوتیک BAX و همچنین، افزایش بیان ژن آنتی‌آپوپتوتیک BCL-2 در رت‌های مسموم شده با H_2O_2 دارد. تاکنون مطالعه‌ای به بررسی اثر فعالیت در آب، کروسین و این روش القای استرس اکسیداتیو در بیان ژن‌های BAX و BCL-2 به منظور تعیین اثر در آپوپتوز کاردیومیوسیتی نپرداخته است. از این‌رو، پژوهش حاضر اولین تحقیق صورت گرفته در این زمینه به شمار می‌رود؛ هرچند مطالعات مختلفی به بررسی BAX و BCL-2 پرداخته‌اند.

نتایج مطالعه‌ی Kwak و همکاران نشان داد که تمرینات ورزشی، سیگنالینگ پروآپوپتوز بالادست در خانواده‌ی BCL-2 را از طریق کاهش کاسپاز ۹، BAX و افزایش BCL-2 که به کاهش نسبت BAX/BCL-2 ختم می‌شود، کاهش می‌دهد. این یافته‌ها حاکی از آن است که تمرینات ورزشی اثری محافظتی در قلب رت‌ها دارد (۱۸). Melo و همکاران گزارش کردند که ۱۰ هفته تمرینات منظم شنا در رت‌های نر، باعث افزایش پروتئین‌های ضد آپوپتوز (BCL-2 و BCL-x) و کاهش پروتئین‌های محرک آپوپتوز (Bad) می‌گردد. بنابراین، به نظر می‌رسد فعالیت ورزشی تا حدودی از طریق کاهش ROS و پیشگیری از رهاسازی سیتوکروم C درون میتوکندریایی، در کاهش آپوپتوز سلول قلبی مفید باشد (۱۹).

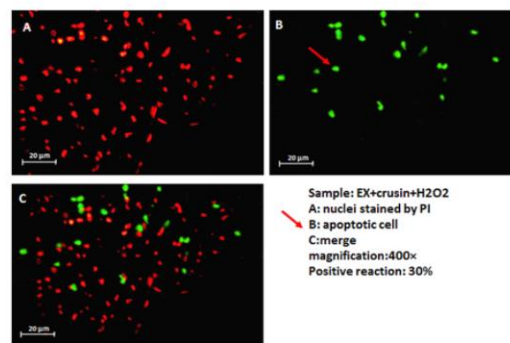
H_2O_2 برون‌زا با غلظت ۲ و ۵ میلی‌مول بر لیتر و نه میلی‌مول بر لیتر، باعث تغییرات معنی‌داری بر روی متابولیسم انرژی در رتیکولوسیت رت‌ها می‌شود (۲۸). تجویز طولانی مدت H_2O_2 پس از فعالیت ورزشی، منجر به کاهش گروه‌های کربونیل زیر سطح پایه می‌شود و عملکرد پروتئازوم و DT-دیاپوراز را در عضله قلبی تحریک می‌کند. بنابراین، عملکرد تحریکی ورزش فیزیکی در تولید رادیکال‌های آزاد، پدیده‌ی مهمی در سازش حاصل از فعالیت ورزشی است؛ چرا که مقاومت به استرس اکسیداتیو را افزایش می‌دهد. فعالیت ورزشی منظم، ابزار فیزیولوژیک مناسبی برای میوکاردیوم در برابر استرس اکسیداتیو طولانی مدت دارد (۱۶). نتایج پژوهش

درصد آپوپتوز ایجاد شده با القای H_2O_2 به روش TUNEL در شکل ۴ نشان داده شده است که این میزان ۷۰ درصد بیان گردید.



شکل ۴. درصد آپوپتوز ایجاد شده توسط القای H_2O_2 در بافت کاردیومیوسیتی

میزان آپوپتوز ایجاد شده با القای H_2O_2 و تعامل تمرین منظم و مصرف کروسین در شکل ۵ نشان داده شده است که با استفاده از روش TUNEL به میزان ۳۰ درصد کاهش یافت.



شکل ۵. کاهش درصد آپوپتوز ایجاد شده با القای H_2O_2 توسط تعامل تمرین منظم و مصرف کروسین در بافت کاردیومیوسیتی

بحث

در پژوهش حاضر، تأثیر شش فعالیت در آب به همراه القای کروسین در رت‌های مسموم شده با H_2O_2 که نوعی القای استرس اکسیداتیو برون‌زاد می‌باشد، بر بیان ژن‌های آپوپتوتیک و آنتی‌آپوپتوتیک در بافت قلب رت‌های نر نژاد ویستار مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده، القای H_2O_2 با افزایش معنی‌داری در بیان ژن آپوپتوتیک BAX همراه بود و شش هفته فعالیت در آب نیز منجر به کاهش معنی‌دار بیان ژن آنتی‌آپوپتوتیک BCL-2 در بافت میوکاردی رت‌ها شد. علاوه بر این، القای کروسین به عنوان آنتی‌اکسیدان برون‌زاد، سبب کاهش معنی‌داری در بیان ژن آپوپتوتیک BAX

در تحقیق دیگری، میزان آپوپتوز در عضلات رت‌های طبیعی پس از یک مرحله فعالیت هوازی طولانی مدت بررسی گردید. اندازه‌گیری پروتئین‌های پروآپوپتیک و آپوپتیک، کاهش سطوح BCL-2 را نسبت به BAX بلافاصله پس از فعالیت هوازی نشان داد؛ در حالی که نسبت آن ۹۶ ساعت پس از یک نوبت فعالیت هوازی معکوس شد. بنابراین، یک نوبت فعالیت هوازی، موجب افزایش مرگ سلول بلافاصله پس از فعالیت هوازی می‌شود؛ در حالی که ۴ روز پس از آن، بقای سلول افزایش می‌یابد (۳۰). بر این اساس، می‌توان بیان کرد که فعالیت هوازی طولانی شاید بتواند تأثیر مثبتی بر بقای سلول داشته باشد. بنابراین، آپوپتوز در پاسخ به تقاضاهای عملکردی، بیش از حد رخ می‌دهد (۹). مطالعه‌ی دیگری با کاربرد ژل الکتروفورز در عضلات رت دارای فقر دیستروفین، به این نتیجه دست یافت که ۴۸ ساعت پس از دویدن روی چرخ، DNA تخریب می‌شود و سطوح BCL-2 کاهش می‌یابد. سطوح پایین این پروتئین میتوکندریایی ضد آپوپتوزی ممکن است بخشی از درگیری بیشتر آپوپتوز پس از فعالیت حاد را توضیح دهد. علاوه بر این، یوبیکیتیناسیون مایونوکلئار (افزایش یوبیکیتینون در هسته‌ی عضله) در هر دو رت دهنده‌ی سالم و X-linked muscular dystrophy (mdx) در مقایسه با رت‌های بی‌تحرک سالم افزایش یافت (۳۰).

کروسین در شرایط وجود فرآورده‌های نهایی گلیکوزیلاسیون در مجاورت سلول‌های اندوتلیال آنورت گاو در شرایط *In vitro*، با افزایش فعالیت SOD و کاهش غلظت MDA و رادیکال‌های اکسیژن و همچنین، یون کلسیم آزاد داخل سلولی در سلول‌های اندوتلیال، آپوپتوز این سلول‌ها را مهار و از چسبیدن گلبول‌های سفید به آن‌ها جلوگیری می‌کند. کروسین ممکن است به این طریق از پیدایش عوارض عروقی دیابت مانند اتروسکلروز پیشگیری نماید (۳۱). نتایج پژوهش Xu و همکاران نشان داد که کروسین با افزایش نسبت بیان BCL-2/BAX، سبب مهار آپوپتوز سلول‌های اندوتلیال آنورت گاوی القا شده با H_2O_2 می‌شود (۳۲). همچنین، آن‌ها در تحقیق دیگری که بر روی سلول‌های اندوتلیال آنورت گاوی انجام دادند، دریافتند که کروسین اثر پیشگیری‌کننده‌ای بر آپوپتوز سلولی القا شده با H_2O_2 دارد. کروسین در غلظت‌های گاوی ۱ تا ۱۰ میکرومول، به صورت معنی‌داری از تغییرات مورفولوژیک سلولی ایجاد شده در اثر آپوپتوز القا شده با H_2O_2 که به شکل متراکم شدن هسته، ایجاد جوانه در سطح غشا و تشکیل اجسام آپوپتوتیک می‌باشد، جلوگیری می‌نماید و در گروه دریافت‌کننده‌ی ۱۰ میکرومول کروسین، حالت نزدبانی (DNA Ladder) مشاهده نشده است. همچنین، به نقش حفاظت‌کنندگی کروسین در آپوپتوز ایجاد شده با محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته در سلول‌های اندوتلیال آنورت گاوی اشاره شده

و همکاران نشان داد که H_2O_2 باعث آسیب جدی به سارکولمای سلول‌های قلبی می‌گردد. این اختلالات شامل پراکسیداسیون فسفولیپید، اکسایش تیول و کاهش آلفاتوکوفرول [پروتئین ضد پراکسیداسیون و کاهش Adenosine triphosphate (ATP)] می‌باشد. بنابراین، به نظر می‌رسد H_2O_2 باعث تغییر معنی‌داری در ترکیبات غشای سلولی می‌شود (۱۵). در همین راستا، قرار گرفتن مختصر سلول‌های قلبی در معرض H_2O_2 می‌تواند مکانیسم‌های پاتولوژیکی را که منجر به آسیب سلولی می‌شود، تحریک کند. همچنین، باعث انتشار سیتوکروم C به درون سیتوزول سلول‌های قلبی می‌گردد (۵). ایسکمی و ریپرفیوژن، به احتمال زیاد ROS تولید می‌کند که از طریق ایجاد اختلال در مسیرهای سیگنالینگ درون سلولی، آپوپتوز ایجاد می‌نماید و در همین راستا، H_2O_2 مسیر مشابهی را در ایجاد آپوپتوز فعال می‌کند. در مسیر داخلی، سیتوکروم C از فضای بین دو غشای میتوکندری به داخل سیتوپلاسم آزاد می‌شود. نفوذپذیری غشای میتوکندری به سیتوکروم C توسط نسبت واسطه‌های پروآپوپتوتیک و آنتی‌آپوپتوتیک تعیین می‌گردد. مولکول‌های پروآپوپتوتیک مانند BAX یا Bak، سبب افزایش نفوذپذیری غشای میتوکندری می‌شوند. جفت شدن مولکول‌های پروآپوپتوتیک با شاخص‌های آنتی‌آپوپتوتیک (Bcl2 و BAX)، اثر آنتی‌آپوپتوتیک آن‌ها را خنثی می‌کند (۱۱، ۱). هرگونه اختلال در این روند، منجر به بروز بیماری می‌شود (۹) که می‌تواند ناشی از کاهش مرگ سلولی و ایجاد و رشد سلول‌های سرطانی و یا اختلالات خودایمنی گردد.

Cheng و همکاران به بررسی اثرات تمرینات ورزشی بر شاخص‌های Akt, Phosphoinositide 3-kinases (PI3Ks) و Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) قلب و پروتئین خانواده‌ی BCL-2 وابسته به مسیر بقا در رت‌های صحرایی دیابتی شده با استرپتوزوتوسین پرداختند. ۴۸ سر رت صحرایی نژاد ویستار به صورت تصادفی در سه گروه شاهد، دیابتی شده و فعالیت ورزشی + دیابتی شده قرار گرفتند. گروه تمرین، تمرینات هوازی متوسط بر روی تردمیل را به مدت ۱۰ هفته، ۵ روز در هفته و هر روز به مدت ۶۰ دقیقه اجرا نمودند. شاخص‌های IGF-1, IGF-1R, PI3Ks و Akt قلب و پروتئین خانواده‌ی BCL-2 موافق بقا (pBAD, BCL-XL و BCL-2) به طور معنی‌داری در گروه دیابتی شده در مقایسه با گروه شاهد کاهش داشت؛ در حالی که گروه فعالیت هوازی افزایش در این شاخص‌ها را نشان داد. اجزای کلیدی آپوپتوز (کاسپاز ۳) به طور معنی‌داری در گروه دیابتی نسبت به گروه شاهد افزایش یافت؛ در حالی که در گروه فعالیت هوازی + دیابتی شده کاهش گزارش گردید (۲۹).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که استرس اکسیداتیو موجب افزایش آپوپتوز کاردیومیوسیتی می‌شود. علاوه بر این، فعالیت منظم در آب و مصرف آنتی‌اکسیدان کروسین می‌تواند اثر حفاظتی خود از میوکارد را در مقابل آپوپتوز کاردیومیوسیتی از طریق تغییر در مسیر آبشار سیگنالینگ و تنظیم منفی بیان ژن آپوپتوتیک BAX و تنظیم مثبت بیان ژن آنتی‌آپوپتوتیک BCL-2 در بافت قلب میانجی‌گری نماید.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از استادانی که در انجام این پژوهش همکاری و راهنمایی نمودند، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

است (۳۳). Xiang و همکاران گزارش کردند که کروسین اثر حفاظتی خود را با کاهش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و کاهش غلظت کلسیم داخل سلولی اعمال می‌نماید (۳۴).

رومزیار و آذربایجانی در مطالعه‌ی خود، اثر مکمل کروسین بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی طی یک جلسه فعالیت برون‌گرا در مردان فعال را بررسی کردند. بر اساس نتایج به دست آمده، مکمل‌گیری با کروسین قبل از انجام فعالیت‌های برون‌گرا، یک اقدام پیشگیرانه در جهت کاهش بروز فشار اکسیداتیو ناشی از فعالیت می‌باشد. علاوه بر این، ترکیب کروسین و فعالیت بدنی می‌تواند اثر آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری بر مایوسیت‌های قلبی اعمال کند (۳۵).

References

- Halliwell B, Gutteridge J. Free Radicals in Biology and Medicine. New York, NY: Oxford University Press; 2015.
- Persson T, Popescu BO, Cedazo-Minguez A. Oxidative stress in Alzheimer's disease: Why did antioxidant therapy fail? *Oxid Med Cell Longev* 2014; 2014: 427318.
- Valko M, Jomova K, Rhodes CJ, Kuca K, Musilek K. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch Toxicol* 2016; 90(1): 1-37.
- Kelly FJ. Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects. *Occup Environ Med* 2003; 60(8): 612-6.
- Faria A, Persaud SJ. Cardiac oxidative stress in diabetes: Mechanisms and therapeutic potential. *Pharmacol Ther* 2017; 172: 50-62.
- Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem* 2015; 97: 55-74.
- Lajoie C, Calderone A, Beliveau L. Exercise training enhanced the expression of myocardial proteins related to cell protection in spontaneously hypertensive rats. *Pflugers Arch* 2004; 449(1): 26-32.
- Oruc S, Gonul Y, Tunay K, Oruc OA, Bozkurt MF, Karavelioglu E, et al. The antioxidant and antiapoptotic effects of crocin pretreatment on global cerebral ischemia reperfusion injury induced by four vessels occlusion in rats. *Life Sci* 2016; 154: 79-86.
- Ascensao A, Ferreira R, Magalhaes J. Exercise-induced cardioprotection--biochemical, morphological and functional evidence in whole tissue and isolated mitochondria. *Int J Cardiol* 2007; 117(1): 16-30.
- Mohsenizadeh N, Azarbayjani MA, Najafipour H, Matin Homae H, Keshtkar A. The simultaneous effect of regular exercise and vitamin d on NF-kBp65 levels in male rats exposed to hydrogen peroxide. *Knowledge Health* 2017; 12(3): 55-62. [In Persian].
- Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol* 2015; 6: 524-51.
- Roy S, Nicholson DW. Cross-talk in cell death signaling. *J Exp Med* 2000; 192(8): F21-F25.
- Ghavami S, Hashemi M, Kadkhoda K, Alavian SM, Bay GH, Los M. Apoptosis in liver diseases--detection and therapeutic applications. *Med Sci Monit* 2005; 11(11): RA337-RA345.
- Li PF, Dietz R, von Harsdorf R. p53 regulates mitochondrial membrane potential through reactive oxygen species and induces cytochrome c-independent apoptosis blocked by Bcl-2. *EMBO J* 1999; 18(21): 6027-36.
- Janero DR, Hreniuk D, Sharif HM. Hydrogen peroxide-induced oxidative stress to the mammalian heart-muscle cell (cardiomyocyte): Lethal peroxidative membrane injury. *J Cell Physiol* 1991; 149(3): 347-64.
- Radak Z, Sasvari M, Nyakas C, Pucsok J, Nakamoto H, Goto S. Exercise preconditioning against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in proteins of rat myocardium. *Arch Biochem Biophys* 2000; 376(2): 248-51.
- Sallam N, Laher I. Exercise modulates oxidative stress and inflammation in aging and cardiovascular diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 7239639.
- Kwak HB, Song W, Lawler JM. Exercise training attenuates age-induced elevation in Bax/Bcl-2 ratio, apoptosis, and remodeling in the rat heart. *FASEB J* 2006; 20(6): 791-3.
- Melo SF, Fernandes T, Barauna VG, Matos KC, Santos AA, Tucci PJ, et al. Expression of microRNA-29 and Collagen in cardiac muscle after swimming training in myocardial-infarcted rats. *Cell Physiol Biochem* 2014; 33(3): 657-69.
- Aruoma OI. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *J Amer Oil Chem Soc* 1998; 75(2): 199-212.
- Verma SK, Bordia A. Antioxidant property of Saffron in man. *Indian J Med Sci* 1998; 52(5): 205-7.
- Sachdeva J, Tanwar V, Golechha M, Siddiqui KM, Nag TC, Ray R, et al. Crocus sativus L. (saffron) attenuates isoproterenol-induced myocardial injury via preserving cardiac functions and strengthening antioxidant defense system. *Exp Toxicol Pathol* 2012;

- 64(6): 557-64.
23. Mehdizadeh R, Parizadeh MR, Khooei AR, Mehri S, Hosseinzadeh H. Cardioprotective effect of saffron extract and safranal in isoproterenol-induced myocardial infarction in wistar rats. *Iran J Basic Med Sci* 2013; 16(1): 56-63.
24. Razavi BM, Imenshahidi M, Abnous K, Hosseinzadeh H. Cardiovascular effects of saffron and its active constituents: A review article. *Saffron agronomy and technology* 2014; 1(2): 3-13. [In Persian].
25. Arshadi S, Azarbayjani MA, Hajaghaalipor F, Yusof A, Peeri M, Bakhtiyari S, et al. Evaluation of *Trigonella foenum-graecum* extract in combination with swimming exercise compared to glibenclamide consumption on type 2 Diabetic rodents. *Food Nutr Res* 2015; 59: 29717.
26. Radak Z, Sasvari M, Nyakas C, Pucsok J, Nakamoto H, Goto S. Exercise preconditioning against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in proteins of rat myocardium. *Arch Biochem Biophys* 2000; 376(2): 248-51.
27. Lari P, Rashedinia M, Abnous K, Hosseinzadeh H. Crocin improves lipid dysregulation in subacute diazinon exposure through ERK1/2 pathway in rat liver. *Drug Res (Stuttg)* 2014; 64(6): 301-5.
28. Maletic SD, Dragicevic-Djokovic LM, Ognjanovic BI, Zikic RV. Alterations of rat reticulocyte (anti)oxidant status and energy metabolism influenced by hydrogen-peroxide [1999]. *Acta Biologica Iugoslavica* 2004; 35(3): 129-38.
29. Cheng M, Chen Y, Xiao W, Sun R, Tian Z. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cell Mol Immunol* 2013; 10(3): 230-52.
30. Siu PM, Bryner RW, Martyn JK, Alway SE. Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles. *FASEB J* 2004; 18(10): 1150-2.
31. Xiang M, Qian ZY, Zhou CH, Liu J, Li WN. Crocetin inhibits leukocyte adherence to vascular endothelial cells induced by AGEs. *J Ethnopharmacol* 2006; 107(1): 25-31.
32. Xu G, Gong Z, Yu W, Gao L, He S, Qian Z. Increased expression ratio of Bcl-2/Bax is associated with crocin-mediated apoptosis in bovine aortic endothelial cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2007; 100(1): 31-5.
33. Xu G, Gong Z, Yu W, Gao L, He S, Qian Z. Increased expression ratio of Bcl-2/Bax is associated with crocin-mediated apoptosis in bovine aortic endothelial cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2007; 100(1): 31-5.
34. Xiang M, Yang M, Zhou C, Liu J, Li W, Qian Z. Crocetin prevents AGEs-induced vascular endothelial cell apoptosis. *Pharmacol Res* 2006; 54(4): 268-74.
35. Varmazyar M, Azarbayjani M. The effect of saffron supplementation of antioxidant enzymes activities during a session eccentric exercise in active Males. *J Med Plants* 2014; 2(50): 54-63. [In Persian].

The Interactive Effect of Forced Swimming and Crocin Supplementation on the Expression of BAX and BCL-2 Cardiomyocyte Genes in Male Rats Infected with Hydrogen Peroxide

Mina Akbari¹, Fereshteh Shahidi², Hamid Rajabi³, Majid Kashef⁴, Zohreh Mazaheri⁵

Original Article

Abstract

Background: The aim of this study was to determine the interaction effect of forced swimming and crocin supplementation on the expression of BAX and BCL-2 cardiomyocyte genes in male rats poisoned by hydrogen peroxide (H₂O₂).

Methods: 36 male Wistar rats were randomly divided into six groups of sham, H₂O₂, H₂O₂ and crocin, H₂O₂ and forced swimming, H₂O₂ and crocin and forced swimming, and control. The forced swimming protocol was 60 minutes, 5 days a week, for 6 weeks. H₂O₂ (1 mg/kg for 3 weeks) and crocin (12.5 Mm/kg daily with 5 cc of distilled water) were injected intraperitoneally. Real time polymerase chain reaction (PCR) device was used to assess gene expression, and apoptosis was assessed using terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) method. Statistical analysis was done using Kolmogorov-Smirnov, Levene, one-way ANOVA and, the Scheffe post hoc tests.

Findings: H₂O₂ induction was associated with a significant increase in the apoptosis of BAX (P < 0.001). Six weeks of exercise in water tended to reduction in the BCL-2 expression (P = 0.023), and induction of crocin resulted in significant decrease in BAX expression. The interaction between swimming, crocin and H₂O₂ decreased BAX and increased BCL-2 expression, which indicated the protective effect of regular activity in reducing cardiomyocyte apoptosis.

Conclusion: Forced swimming as well as the use of crocin separately led to a significant reduction in BAX gene expression and a significant increase in BCL-2 gene expression. On the other hand, the combination of exercise and crocin had synergistic and synergistic effects in inhibiting the apoptotic expression of BAX and also enhancing the expression of the anti-apoptotic gene of BCL-2 in rats poisoned by H₂O₂.

Keywords: Forced swimming, Crocin, BAX protein, BCL2 proteins, Hydrogen peroxide, Cardiomyocyte

Citation: Akbari M, Shahidi F, Rajabi H, Kashef M, Mazaheri Z. **The Interactive Effect of Forced Swimming and Crocin Supplementation on the Expression of BAX and BCL2 Cardiomyocyte Genes in Male Rats Infected with Hydrogen Peroxide.** J Isfahan Med Sch 2019; 37(525): 443-53.

1- PhD Student, Department of Exercise Physiology, School of Sport Sciences, Shahid Rajaei Teacher Training University, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Department of Exercise Physiology, School of Sport Sciences, Shahid Rajaei Teacher Training University, Tehran, Iran

3- Associate Professor, Department of Exercise Physiology, School of Physical Education and Sport Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

4- Professor, Department of Exercise Physiology, School of Sport Sciences, Shahid Rajaei Teacher Training University, Tehran, Iran

5- PhD, Basic Medical Science Research Center, Histogenotech Company, Tehran, Iran

Corresponding Author: Mina Akbari, Email: akbariteach@gmail.com