

## اثر تمرینات مقاومتی به همراه مصرف عصاره‌ی زعفران بر بیان ژن‌های Bax، Bcl-2 و Caspase-3 در بافت هیپوکامپ رت‌های نر آلزایمری القا شده

فاضل بازیار<sup>۱</sup>، رامین شعبانی<sup>۲</sup>، علیرضا علمیه<sup>۳</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** آلزایمر، یک بیماری مخرب با اختلالات پیشرونده است که با کاهش حافظه همراه و عدم وجود درمان قطعی برای آن می‌باشد، هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر تمرینات مقاومتی به همراه مصرف عصاره‌ی زعفران بر بیان ژن‌های Bax، Bcl-2 و Caspase-3 در بافت هیپوکامپ رت‌های نر آلزایمری القا شده بود.

**روش‌ها:** در مطالعه‌ی تجربی حاضر، ۳۲ سر رت نر بالغ به صورت تصادفی به ۴ گروه آلزایمری شامل گروه‌های شاهد، تمرینات هوازی، تمرینات هوازی + عصاره‌ی زعفران و عصاره‌ی زعفران تقسیم شدند. آلزایمر با تزریق آمیلوئید بتا ۱-۴۲ در هیپوکامپ ایجاد شد. تمرینات مقاومتی شامل ۳ جلسه در هفته به مدت ۸ هفته انجام گردید. برای تعیین میزان بیان ژن‌های مورد نظر از روش Real Time PCR و جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و از آزمون تعقیبی Tom Hen استفاده شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد، بعد از ۸ هفته تمرین مقاومتی، بیان ژن Bax در گروه‌های مداخله نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌دار یافت. همچنین بیان ژن Bcl-2 در گروه شاهد و تمرینات مقاومتی و گروه تمرینات مقاومتی و عصاره نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری را نشان داد. بیان ژن Caspase3 در گروه شاهد + تمرینات مقاومتی و گروه تمرینات مقاومتی و عصاره نسبت به گروه شاهد، کاهش معنی‌داری را نشان داد.

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد تمرین مقاومتی و مصرف عصاره‌ی زعفران موجب کاهش بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوز رت‌های نر مبتلا به آلزایمر می‌گردد.

**واژگان کلیدی:** آلزایمر؛ Bcl-2؛ Bax؛ Caspase3؛ تمرینات مقاومتی

**ارجاع:** بازیار فاضل، شعبانی رامین، علمیه علیرضا. اثر تمرینات مقاومتی به همراه مصرف عصاره‌ی زعفران بر بیان ژن‌های Bax، Bcl-2 و Caspase-3

در بافت هیپوکامپ رت‌های نر آلزایمری القا شده. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۲؛ ۴۱ (۷۱۳): ۲۱۴-۲۰۶

جهش در ژن‌ها، التهاب عصبی، هاپرفسفریلاسیون پروتئین تائو (Tau protein) و آپوپتوز (Apoptosis) است (۳).

آپوپتوز، یک رخداد طبیعی سلولی است که به کمک آن میزان ر شد و تکثیر سلول‌های بدن تنظیم و از ایجاد سرطان جلوگیری می‌کند. گفته می‌شود سیستم ایمنی با به کارگیری این فرایند بسیاری از اعمال ضدآنتی‌ژنی خود را انجام می‌دهد (۲).

هنگام آپوپتوز مشخصات اصلی سلول عبارت است از: تراکم کروماتین درون هسته، چروکیدگی سیتوپلاسم، قطعه قطعه شدن DNA به قطعه‌های ۱۰۰ تا ۲۰۰ جفت و ایجاد حالت نردبانی در ژل الکتروفورز، از دست دادن چسبندگی سلول و تخریب اسکلت سلولی،

### مقدمه

بیماری آلزایمر، یک بیماری نورودژنراتیو است که با اختلالات عمیق عملکردهای حافظه و شناختی همراه بوده و همچنین از علل بسیار شایع دمانس می‌باشد که به خصوص در افراد پیر دیده می‌شود (۱). خصوصیات بالینی بیماری آلزایمر شامل افت عملکردهای شناختی، اختلال در فعالیت‌های عادی روزمره و تغییر در اعمال رفتاری فرد می‌باشد (۲). دلایل متفاوتی برای به وجود آمدن آلزایمر وجود دارد از جمله آن، وجود استرس اکسیداتیو، رسوب پلاک‌های آمیلوئید خارج سلولی بتا (Amyloid beta، Ab)، تشکیل گره‌های عصبی الیاف داخل سلولی (Neuro fibrillary tangles، NFT)، مسمومیت عصبی،

۱- دانشجوی دکترای تخصصی فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی علوم انسانی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

۲- استاد فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی علوم انسانی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

۳- دانشیار، دانشکده‌ی علوم انسانی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: رامین شعبانی: استاد فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی علوم انسانی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

Email: ramini.shabani@iau.ac.ir

از انتقال فسفاتیدیل سرین از نیمه داخلی به نیمه خارجی غشای سلول، بالونی شدن سطح سلول و تولید اجسام آپوپتوزی (۴) همچنین به عنوان روشی محافظت شده تحت کنترل ژن‌ها می‌باشد (۵) که در آن سلول با دریافت محرک‌های مشخص به شدت به سمت مرگ سلولی پیش می‌رود (۶). میتوکندری به عنوان بازیگر اصلی تولید آدنوزین تری فسفات (ATP (Adenosine triphosphate) به طور فعال درگیر ادغام و اجرای محرک‌های مختلفی هستند که منجر به مرگ سلول می‌شوند (۶).

آپوپتوز توسط واسطه‌هایی مانند p38, p21 پروتئین کیناز فعال شده با میتوزن (MAPK (Mitogen-activated protein kinase) پروتئین کیناز ترمینال، p53، کاسپازهای (Caspases) ۲، ۳، ۸ و ۹، Bax, Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-2، فاکتور القاکننده آپوپتوز و Par-4 ایجاد می‌شود. البته پروتئین نفوم/لوسمی و ژن‌های Bcl-2, Bcl-XL و سایر واسطه‌ها آنتی آپوپتوز هستند، که نقشی اساسی در رشد طبیعی، هموستاز بافت و از بین بردن سلول‌های آلوده یا آسیب دیده پدیدارند (۷). همچنین آپوپتوز در هیپوکامپ بر عملکرد حافظه تأثیر می‌گذارد و بسیاری از رفتارهای هیجانی افراد را نیز تحت تأثیر قرار داده و سبب بروز ناراحتی‌هایی از قبیل علائم افسردگی (شامل فقدان احساس لذت، بی‌قراری، افسردگی، کاهش اشتها و وزن، عدم وجود تمرکز) و علائم روانی شامل (توهم، هذیان، سوءظن) و نیز رفتارهایی مثل (آشفته‌گی، سرگردانی، پرخاشگری و خشونت) در این بیماران می‌گردد (۷).

دسته‌ای از پروتئین‌های سیستین مانند کاسپازها در این مسیرها نقش دارند. کاسپاز ۳، یکی از اعضای خانواده کاسپازها است که به طور گسترده مورد مطالعه قرار می‌گیرد و یکی از آغازگرهای اصلی آپوپتوز می‌باشد (۸). لذا با توجه به مطالعات اندک در استفاده‌ی همزمان مصرف زعفران و تمرینات ورزشی مقاومتی، مطالعه‌ی حاضر اثر تمرینات مقاومتی به همراه عصاره‌ی زعفران بر بیان ژن‌های Bax, Bcl-2 و Caspase-3 در بافت هیپوکامپ رت‌های نر آلزایمری القا شده را مورد بررسی قرار داد.

**نحوه‌ی القاء آلزایمر:** در این پژوهش برای القاء آلزایمر از آمیلوئید بتا ۴۲-۱ خریداری شده از شرکت سیگما-آلدریج آمریکا (Sigma-Aldrich, USA) که در آب مقطر دوبار استریل حل شده و به مدت یک هفته در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شده بود، استفاده گردید (۶، ۱۱). سپس تریپتولن با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در ۰/۵ سی‌سی آب مقطر دوبار استریل حل شد و از طریق سرنگ انسولینی به صورت تزریق درون صفاقی به رت تزریق گردید (۱۲). موش‌ها توسط تزریق درون صفاقی کتامین (Ketamine) (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند و مورد جراحی استریوتاکسی قرار گرفتند. سپس بتا آمیلوئید توسط سرنگ همیلتون متصل به پمپ انفوزیون (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) به منطفه‌ی CA1 در هیپوکامپ با مختصات قدامی-خلفی ۳/۸، طرفی ۲/۴ و پشتی ۲/۷ میلی‌متر بر اساس اطلس پاکسینوس (Paxinus) و واتسون (Watson) تزریق شد (۶، ۱۳). در ادامه رت‌ها به ۴ گروه آلزایمری شامل شاهد، تمرینات مقاومتی، تمرینات مقاومتی-عصاره‌ی زعفران و عصاره‌ی زعفران، تقسیم شدند.

**طرز تهیه‌ی عصاره‌ی آبی زعفران:** کلاله‌ی خشک زعفران خوراکی معروف به زعفران پوشالی قانئات تهیه شد. سپس برای آماده کردن عصاره‌ی آبی زعفران از روش خیساندن استفاده گردید. به این ترتیب که پس از ریختن کلاله‌های خشک شده‌ی زعفران در داخل شیشه استوانه‌ای به ازای هر یک گرم کلاله‌ی زعفران، ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر به ظروف اضافه شد و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد روی دستگاه چرخاننده به آرامی مخلوط شد تا استخراج به خوبی صورت گیرد. سپس مخلوط حلال و گیاه توسط صافی از هم جدا شد تا عصاره‌ی اولیه بدست آید. عصاره‌ی اولیه وارد دستگاه تقطیر در خلأ شده و در دمای ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد حلال آن‌ها به آرامی تبخیر شد و عصاره‌ی تلغیظ شده به دست آمد. محلول حاصل به مدت دو هفته در دستگاه بن‌ماری با دمای ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت تا حلال عصاره نیز به آرامی تبخیر

## روش‌ها

این پژوهش از نوع تجربی با ۴ گروه به صورت پس‌آزمون بود که توسط کمیته‌ی اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت با کد IR.IAU.RASHT.REC.1401.043 به تصویب رسید. نمونه‌های تحقیق شامل ۳۲ سر رت نر بالغ ۶ الی ۷ ماهه با وزن ۲۶۰ الی ۲۷۰ گرم بودند که از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. جامعه‌ی آماری رت‌های نر از روش نمونه‌گیری به صورت تصادفی از طریق نرم‌افزار G POWER بر اساس روش آماری تحلیل واریانس و سطح خطای ۰/۵۰ و توان ۰/۸۵ برابر با ۳۲ سر رت تعیین شد (۹). حیوانات پس

ی آستانه (Cycle threshold) (CT)، نسبت بیان ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه، ارزیابی شدند (۱۸) (جدول ۱).

**روش تجزیه و تحلیل داده‌ها:** تجزیه و تحلیل داده‌ها و ترسیم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۰ (version 20, IBM Corporation, Armonk, NY) انجام گرفت. برای توصیف داده‌ها از آمار توصیفی و برای تجزیه تحلیل داده‌ها از آمار استنباطی استفاده گردید. برای نرمال بودن داده‌ها از آزمون Shapiro-Wilk استفاده شد و با توجه به نتایج بدست آمده، تمام داده‌ها از توزیع طبیعی برخوردار بودند. جهت مقایسه‌ی نتایج آزمایش‌های مورد نظر از آنالیز واریانس یک طرفه استفاده گردید. ابتدا واریانس داده‌ها با استفاده از آزمون آماری Levene سنجیده و در صورت نابرابری واریانس‌ها از آزمون Wilch استفاده و در مواردی که اختلاف معنی‌داری وجود داشتند جهت ارزیابی دقیق‌تر از آزمون تعقیبی Tom Hen استفاده شد.

جدول ۱. توالی پرایمرها متغیرهای تحقیق

BAX F	TGGCGATGAACTGGACAACAAC	65
BAX R	CCCGAAGTAGGAAAGGAGGC	
BCL2 F	CTGGTGGACAACATCGCTCTG	66
BCL2 R	GGTCTGCTGACCTCACTTGTG	
Casp-3 F	GTTAACACGAGTGAGGATGTG	62
Casp-3 R	TACCCTGAAATGGGCTTGTGT	
GAPDH F	GCAAGAGAGAGGCCCTCAG	60

### یافته‌ها

به منظور مشاهده‌ی وزن آزمودنی‌ها، وزن‌کشی در زمان ورود آزمودنی‌ها به تحقیق، انجام شد. میانگین و انحراف معیار تغییرات وزن گروه‌ها در طول ۸ هفته در جدول ۲ نشان داده شده است.

در ابتدا جهت بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون Shapiro-Wilk استفاده و با توجه به توزیع طبیعی تمامی متغیرها از آزمون آنالیز واریانس برای بررسی فرضیه‌ها با پیش‌فرض کاربرد آزمون آنالیز واریانس ۲ راهه به شرط برابری خطای واریانس‌ها در این راستا و در جهت بررسی برابری واریانس از آزمون Levene استفاده شد و نتایج آن بیانگر نابرابری واریانس‌ها بود. از آزمون Wilch جهت بررسی داده‌ها استفاده شد (جدول ۳).

جدول ۲. میانگین تغییرات وزن متغیرهای تحقیق

متغیر	شاهد	مکمل	تمرین	مکمل و تمرین
وزن هفته‌ی اول تمرین (گرم)	۲۶۵/۵ ± ۱۲/۳	۲۷۲/۳ ± ۹/۷	۲۷۱/۳ ± ۹/۷	۲۷۸/۲ ± ۷/۸
وزن هفته‌ی هشتم تمرین (گرم)	۲۸۰/۷ ± ۱۵/۵	۲۷۶/۴ ± ۹/۹	۲۶۸/۴ ± ۹/۹	۲۷۳/۰ ± ۵/۴

شده و پودر عصاره به جا بماند، پودر عصاره تا زمان استفاده در فریزر و در دمای منفی ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. عصاره به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در ۲ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. سپس موش‌های صحرایی، عصاره را برای تمام روزهای هفته، یک‌بار در روز رأس ساعت ۸ صبح به مدت هشت هفته از طریق گاواژ دریافت کردند (۱۴، ۱۵).

**برنامه‌ی تمرینات مقاومتی:** تمرینات شامل ۳ جلسه تمرین در هفته (شنبه، دو شنبه و چهارشنبه) به مدت ۸ هفته می‌باشد که شامل ۳ نوبت و هر نوبت شامل ۴ بار بالا رفتن از نردبان مخصوص به ارتفاع یک متر و بیست و شش پله است با فاصله‌ی ۴ سانتی‌متر پله‌ها از هم. بین هر نوبت ۳۰ ثانیه استراحت برای حیوانات در نظر گرفته شده است. پس از بستن وزنه به دم حیوانات، وادار به صعود از نردبان عمود می‌شوند. در هفته‌ی اول میزان وزنه بسته شده به دم حیوان ۳۰ درصد وزن بدن آن‌ها خواهد بود و به تدریج از هفته‌ی دوم ۷۰ درصد، هفته‌ی سوم ۱۰۰ درصد، هفته‌ی چهارم ۱۲۰ درصد، هفته‌ی پنجم ۱۴۰ درصد و هفته‌ی ششم تا هشتم ۱۶۰ درصد وزن بدن آن‌ها بود (۱۶).

**بافت‌برداری:** ۴۸ ساعت پس از آخرین مداخله، تمامی رت‌ها به مدت ۸-۱۰ ساعت ناشتا شده و قبل از شروع بافت‌برداری، وزن‌کشی انجام شد. سپس بی‌هوشی به شکل استنشاقی و با ماده‌ی کلروفورم انجام شد، پس از بی‌هوشی کامل و تست درد و اطمینان از عدم هوشیاری، خون‌گیری از بطن چپ قلب انجام گردید. بافت‌برداری انجام و جهت ارزیابی داخل فریزر ۸۰- سلسیوس نگهداری شد (۱۷).

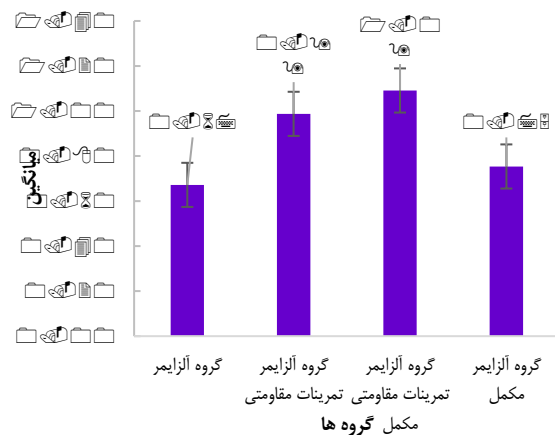
بیان ژن‌های BAX، BCL-2 و کاسپاز ۳ به روش Real Time PCR جهت بررسی بیان ژن، استخراج RNA در تمامی گروه‌ها، مطابق با پروتکل شرکت سازنده (کیژن، آلمان) انجام شد. مراحل سنتز cdNA پس از استخراج RNA با خلوص و غلظت بالا از تمامی نمونه‌ها انجام گرفت، سپس cdNA سنتز شده جهت انجام واکنش رونویسی معکوس مورد استفاده قرار گرفت. از روش کمی Real Time-PCR برای اندازه‌گیری سطوح بیان ژن‌ها استفاده شد. طراحی پرایمرها بر اساس اطلاعات ژن‌های فوق در بانک ژنی NCBI انجام گرفت. از ژن گلیسرآلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز (GAPDH) به عنوان ژن کنترل استفاده گردید. با استفاده از روش مقایسه‌ای چرخه

جدول ۳. نتایج آزمون آنالیز واریانس متغیرهای تحقیق

ANOVA (نتایج آزمون Wilch)	آزمون	درجه آزادی ۱	درجه آزادی ۲	معنی‌داری آزمون
BAX	۹/۲۹	۷	۱۴/۴۴	۰/۰۰۱*
BCL-2	۳۴/۸۰	۷	۱۴/۱۳	۰/۰۰۲*
Caspase-3	۶۱/۷۶	۷	۱۴/۳۰	۰/۰۰۰*

\* اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل ( $P < 0/05$ )

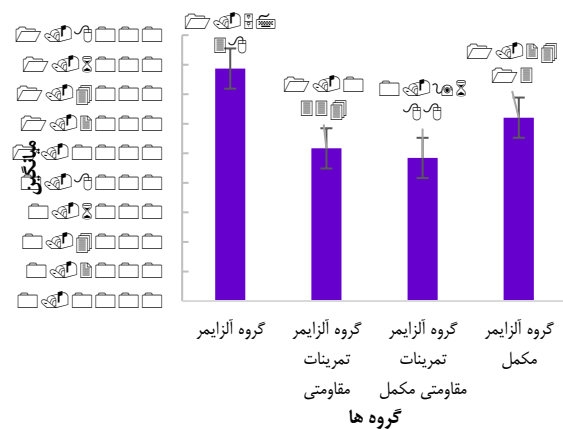
های مبتلا به آرایمر که تمرینات مقاومتی و گروه رت‌هایی که تمرینات مقاومتی به همراه مصرف عصاره زعفران داشتند وجود دارد و با گروه رت‌های مبتلا به آرایمر که فقط مکمل مصرف کرده بودند اختلاف معنی‌دار نمی‌باشد. یعنی تمرینات مقاومتی و تمرین به همراه مصرف عصاره باعث کاهش بیان ژن Bcl-2 می‌شود. البته لازم بذکر است که این کاهش بیان ژن در گروه رت‌هایی که فقط عصاره مصرف کرده بودند وجود ولی اختلاف با گروه رت‌های مبتلا به آرایمر که هیچ‌گونه فعالیتی نداشتند معنی‌دار نمی‌باشد. همچنین باید اشاره کرد، کاهش بیان ژن Bcl-2 در گروه رت‌هایی که تمرینات مقاومتی به همراه عصاره مصرف کرده بودند کمتر از گروه رت‌هایی بود که فقط تمرین کرده بودند ولی این اختلاف معنی‌دار نمی‌باشد ولی با گروه رت‌هایی که فقط عصاره مصرف کرده‌اند، اختلاف معنی‌دار می‌باشد (شکل ۳).



شکل ۲. تغییرات میانگین بیان ژن Bcl-2 به نسبت گروه آرایمر در گروه‌های تحقیق

با توجه به یافته‌های بدست آمده از نتایج مطالعه حاضر در بیان ژن caspase 3 در گروه‌های مورد بررسی، اختلاف معنی‌داری در بین گروه رت‌های مبتلا به آرایمر که هیچ‌گونه فعالیتی نداشتند با گروه رت‌های مبتلا به آرایمر که تمرینات مقاومتی و گروه رت‌هایی که تمرینات مقاومتی به همراه مصرف عصاره زعفران داشتند وجود دارد و با گروه رت‌های مبتلا به آرایمر که فقط مکمل مصرف کرده

نتایج آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (آزمون Wilch در حالت نابرابر واریانس‌ها) نشان داد که بین گروه‌های پژوهش تفاوت معنی‌داری وجود داشت و لذا برای تعیین تفاوت بین گروه‌ها از آزمون Tom Hen در حالت نابرابری واریانس‌ها استفاده شد (جدول ۴، شکل ۱).



شکل ۱. تغییرات میانگین بیان ژن BAX به نسبت گروه آرایمر در گروه‌های تحقیق

با توجه به یافته‌های بدست آمده از نتایج مطالعه حاضر در بیان ژن BAX در گروه‌های مورد بررسی، اختلاف معنی‌داری در بین گروه رت‌های مبتلا به آرایمر که هیچ‌گونه فعالیتی نداشتند با گروه رت‌های مبتلا به آرایمر که تمرینات مقاومتی، گروه رت‌هایی که تمرینات مقاومتی به همراه مصرف عصاره زعفران و گروه رت‌هایی که فقط عصاره مصرف کرده‌اند وجود دارد. یعنی تمرینات مقاومتی و تمرینات مقاومتی به همراه مصرف عصاره و مصرف عصاره به تنهایی باعث کاهش بیان ژن BAX می‌شود. همچنین باید اشاره کرد کاهش بیان ژن BAX در گروه رت‌هایی که تمرینات مقاومتی به همراه عصاره مصرف کرده بودند، کمتر از گروه رت‌هایی بود که فقط تمرین کرده بودند که این اختلاف معنی‌دار نمی‌باشد ولی با گروه رت‌هایی که فقط عصاره مصرف کرده‌اند اختلاف معنی‌دار می‌باشد (شکل ۲).

با توجه به یافته‌های بدست آمده از نتایج مطالعه حاضر در بیان ژن Bcl-2 در گروه‌های مورد بررسی اختلاف معنی‌داری در بین گروه رت‌های مبتلا به آرایمر که هیچ‌گونه فعالیتی نداشتند با گروه رت

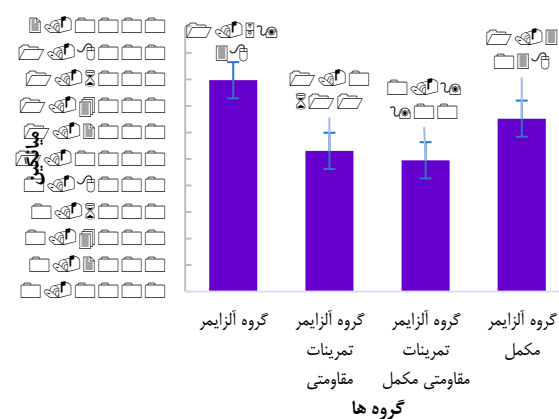
به همراه مصرف عصاره گیاه زعفران باعث کاهش بیان ژن‌های پروآپوپتوز و افزایش بیان ژن‌های آنتی‌آپوپتوز می‌گردد، در واقع اثر مطلوبی در تنظیم شاخص‌های ضد و پرو آپوپتیک دارد. همچنین مطالعات نشان داد که فعالیت ورزشی همراه با مصرف عصاره زعفران موجب افزایش شاخص‌های آنتی‌آپوپتوزیس در رت‌های مبتلا به آلزایمر می‌گردد (۱۵).

بر اساس یافته‌های این پژوهش، تمرینات مقاومتی به همراه مصرف عصاره در بیان ژن‌های (BAX)، (BCL-2) و کاسپاز ۳ اثرگذار بود، این مسأله بیانگر تأثیر حفاظتی تمرینات ورزشی از بافت مغز رت‌های مبتلا به آلزایمر از طریق مسیرهای تنظیمی آپوپتوزیس می‌باشد. خانواده ژن BCL-2 شامل مولکول‌های ضدآپوپتوز BCL-2 و مولکول طرفدار آپوپتوز BAX می‌باشد، خانواده‌ی BCL-2 عامل مهمی در تعیین زنده ماندن یا مرگ نورون‌ها می‌باشد (۱۹). همانطور که مطالعات گذشته نشان دادند، قبل از دریافت یک محرک مرگ، پروتئین آنتی‌آپوپتوزی BCL-2 به طور دا خل سلولی با BAX هتروداایمر می‌شود. در صورت بیان اضافه BCL-2 این مولکول‌ها تشکیل همودایمر می‌دهند و به طور همزمان آپوپتوز ناشی از تحریک را مهار می‌کنند (۲۰، ۲۱).

بطور معکوس بیان اضافی BAX باعث همودایمر شدن خودش و در نتیجه افزایش حساسیت به محرک آپوپتوز می‌گردد (۲۰). مرگ سلولی در بافت مغز نشانگر شرایط پاتوفیزیولوژیک متفاوتی می‌باشد که می‌تواند باعث پیری و به عنوان یک آسیب مغزی باشد (۲۲).

با توجه به برهم خوردن تعادل بین بیان ژن‌های BAX و BCL-2 و تمایل به افزایش بیان ژن BCL-2 می‌تواند اثرات محافظتی برای بافت مغز داشته باشد. در این راستا خسروی در مطالعه‌ای بیان کرد که یک دوره تمرینات ورزشی، باعث افزایش بیان ژن (BCL-2) و کاهش بیان ژن (BAX) شده است (۱۵).

بودند اختلاف معنی‌دار نمی‌باشد. یعنی تمرینات مقاومتی و تمرین به همراه مصرف عصاره باعث کاهش بیان ژن Caspase 3 می‌شود. البته لازم بذکر است که این کاهش بیان ژن در گروه رت‌هایی که فقط عصاره مصرف کرده بودند وجود دارد ولی اختلاف با گروه رت‌های مبتلا به آلزایمر که هیچ گونه فعالیتی نداشتند معنی‌دار نمی‌باشد. همچنین باید اشاره کرد، کاهش بیان ژن کاسپاز ۳ در گروه رت‌هایی که تمرینات مقاومتی به همراه عصاره مصرف کرده بودند کمتر از گروه رت‌هایی بود که فقط تمرین کرده بودند ولی این اختلاف معنی‌دار نمی‌باشد همچنین با گروه رت‌هایی که فقط عصاره مصرف کرده‌اند اختلاف معنی‌دار می‌باشد.



شکل ۳. تغییرات میانگین بیان ژن کاسپاز ۳ به نسبت گروه آلزایمر در گروه‌های تحقیق

## بحث

بر اساس یافته‌های این مطالعه، ۸ هفته تمرینات مقاومتی منجر به کاهش بیان ژن BAX و افزایش بیان ژن BCL-2 و در نتیجه باعث کاهش بیان ژن کاسپاز ۳ می‌شود. در واقع تمرینات ورزشی مقاومتی

جدول ۴ نتایج آزمون Tom Hen متغیرهای تحقیق

گروه‌ها	اختلاف میانگین	معنی‌داری	اختلاف میانگین	معنی‌داری	اختلاف میانگین	معنی‌داری
	BAX	BCL-2	Caspase 3			
آلزایمر	۰/۱۴۵	* ۰/۰۰۴	-۰/۳۱۵	* ۰/۰۰۱	-۰/۵۳۲	* ۰/۰۱۰
آلزایمر تمرینات مقاومتی مکرمل زعفران	۰/۱۲۴	* ۰/۰۴۱	۰/۰۷۹	* ۰/۰۲۱	۰/۶۰۳	* ۰/۰۰۸
آلزایمر مکرمل زعفران	۰/۲۰۶	* ۰/۰۰۱	۰/۰۸۲	۱/۰۰۰	۰/۲۹۰	۰/۹۶۵
آلزایمر تمرینات مقاومتی مکرمل زعفران	۰/۲۳۷	۰/۰۵۵	-۰/۱۰۳	۰/۳۸۵	۰/۰۷۱	۰/۹۹۹
آلزایمر مکرمل زعفران	-۰/۰۵۱	* ۰/۰۰۱	۰/۰۴۳	* ۰/۰۰۴	-۰/۲۴۲	* ۰/۰۲۹
آلزایمر تمرینات مقاومتی زعفران	-۰/۳۲۳	* ۰/۰۰۵	۰/۳۳۷	* ۰/۰۰۱	۰/۰۶۳	* ۰/۰۰۳

اجزایی فعال تشکیل‌دهنده آن نسبت می‌دهند (۲۸). مطالعات نشان دادند، مواد موجود در زعفران (کروسین) به عنوان یک ماده‌ی آنتی‌اکسیدانی و تقویت سیستم کولیزژیک نقش بسزایی در تقویت حافظه‌ی فضایی، بازی می‌کند (۲۹). سازکارهای متعددی در رابطه با اثرات زعفران و مواد تشکیل‌دهنده‌ی زعفران در بهبود افزایش بیان ژن‌های آپوپتوزی احتمالاً از مسیر افزایش پلاستیستی و اثرات آنتی‌اکسیدان و افزایش بیان گیرنده‌ی نروتروفین‌ها (۳۰) با تحریک سیناپسی در بافت هیپوکامپ پس از اعمال تحریک با فرکانس بالا نورون‌های پیش‌سیناپسی و افزایش طولانی‌مدت در پتانسیل‌های سیناپسی موجب جلوگیری از تحلیل سلول‌های بافت هیپوکامپ می‌گردد (۳۰، ۳۱). با این اوصاف احتمالاً با افزایش بیان ژن (BCL-2) باعث کاهش بیان ژن (BAX) و (۳۲) شده و در نتیجه، آبخارهای کاسپازی در مسیر سیگنالینگ آپوپتوز غیر فعال می‌گردد (۳۳). خسروی در مطالعه‌ی بیان کرد که یک دوره فعالیت ورزشی به همراه مصرف عصاره‌ی زعفران، موجب کاهش شاخص آنتی‌آپوپتوزیس در موش‌های مبتلا به آلزایمر می‌شود (۱۵).

هوشمند مقدم و همکاران در مطالعه‌ی بیان کردند که تمرینات مقاومتی، باعث کاهش بیان ژن کاسپاز ۳ در مردان سالمند می‌شود که می‌تواند در بهبود عوامل مرتبط با آپوپتوز مؤثر واقع شود و باعث کند شدن روند فرآیند آلزایمر می‌گردد (۳۴). بر اساس مشاهدات قبلی، کاهش روند آپوپتوزیس در بافت هیپوکامپ در اثر تمرینات ورزشی و مصرف عصاره‌ی زعفران مؤثر می‌باشد.

### نتیجه‌گیری

بر اساس یافته‌های این مطالعه، تمرینات مقاومتی به همراه مصرف عصاره‌ی زعفران باعث کاهش بیان ژن‌های BAX و کاسپاز ۳ و افزایش بیان ژن BCL-2 شده است. یعنی تمرینات مقاومتی و عصاره‌ی زعفران احتمالاً می‌تواند موجب کاهش آپوپتوز در بافت هیپوکامپ مغز شود. در مجموع مصرف همزمان تمرینات مقاومتی همراه با مصرف عصاره‌ی زعفران، هم افزایش بیشتری نسبت به تمرینات مقاومتی و یا صرفاً مصرف عصاره دارد، بنابراین پیشنهاد می‌شود که یک دوره تمرینات مقاومتی به همراه مصرف عصاره‌ی زعفران و طول مدت تمرین بیشتری انجام گیرد.

### تشکر و قدردانی

مطالعه‌ی حاضر برگرفته از رساله‌ی دکتری در رشته‌ی فیزیولوژی ورزشی مصوب گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت با کد (۱۱۷۴۸۱۸۱۵۶۳۲۱۶۱۳۹۹۱۶۲۳۳۱۱۳۳) می‌باشد و بدین وسیله از همه‌ی عزیزان و اساتید گرانقدر که در اجرای این طرح یاری رساندند سپاسگزاری می‌نمایم.

کاشف و همکاران، اثر تمرینات قدرتی را بر روی بیان ژن‌های BAX و BCL-2 را با افزایش میزان بیان ژن BCL-2 و کاهش آپوپتوز را بیان کردند (۲۰).

علاوه بر این Kang و همکاران در مطالعه‌ی نشان دادند که ۱۶ هفته فعالیت ورزشی در بافت مغز موش‌های کوچک مبتلا به آلزایمر، افزایش بیان ژن BCL-2 به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (۲۳).

یکی از مکانیزم‌های احتمالی در مورد قابلیت حفاظت نورونی فعالیت بدنی و تمرینات ورزشی، می‌توان به افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی و کاهش تشکیل رادیکال‌های آزاد اشاره کرد. بافت مغز دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پائین است و بیشترین میزان اسید چرب و کاتکولامین‌ها را دارد که به راحتی اکسید می‌شوند و مغز را در معرض استرس اکسیداتیو بیشتری قرار می‌دهد (۲۴). فعالیت بدنی و ورزش می‌تواند از طریق کاهش استرس اکسیداتیو، کاهش شاخص‌های التهابی (۲۳) باعث افزایش بیان ژن آنتی‌آپوپتوزی BCL-2 و کاهش بیان ژن آپوپتوزی BAX در بافت هیپوکامپ می‌گردد. یکی از عوامل در تمرینات مقاومتی، پیام‌رسان AKT یا همان پروتئین کیناز B است که عمل اصلی در مسیر پیام‌رسان فسفاتیدیل انیوزیتول ۳ کیناز می‌باشد که در بسیاری از فرایندهای حیاتی سلول از جمله متابولیسم، رشد تکثیر و بقای سلول نقش دارد. پروتئین کیناز B از طریق فسفوریلاسیون BCL-2 و غیر فعال سازی BAX، باعث سرکوب مستقیم آبخارهای کاسپازی و نهایتاً باعث کاهش آپوپتوز می‌گردد (۲۵). همچنین AKT مقاومت به انسولین را کاهش داده و باعث بهبود شکل‌پذیری سیناپسی می‌شود (۲۶).

یکی از دیگر سازکارهای احتمالی در کاهش آپوپتوز بافت هیپوکامپ می‌تواند تأثیر تمرین ورزش مقاومتی بر سائیتوکاین‌های پیش‌التهابی و ضدالتهابی باشد. تمرین مقاومتی در درازمدت می‌تواند از طریق کاهش سائیتوکاین‌های پیش‌التهابی باعث التهاب سیستمیک و افزایش مهارگر آپوپتوز از طریق تنظیم افزایش پروتئین شوک گرمایی باعث کاهش آپوپتوز شود (۲۷). یکی از دیگر دلایل احتمالی در خصوص کاهش آپوپتوز بافت هیپوکامپ را می‌توان به افزایش نروتروفین‌های مشتق از مغز نسبت داد که در پاسخ به یک دوره فعالیت ورزشی مقاومتی افزایش می‌یابند. این نروتروفین‌ها اثرات حفاظتی و حمایتی بر نورون‌ها در شکل‌پذیری سیناپسی، تمایز و رشد، بقا سلول‌های عصبی دارند و از طریق افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی باعث کاهش فشار اکسیداتیو و نهایتاً کاهش پروتئین‌های آپوپتوزی و آپوپتوز می‌گردد (۲۶).

علاوه بر این موارد مکمل گیاه زعفران دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی می‌باشد که اکثر محققین این خواص را به مواد

## References

1. Amani M. Pathophysiology of Alzheimer's disease. *J Ardabil Univ Med Sci* 2017; 16(4): 452-63.
2. Armstrong RA.  $\beta$ -Amyloid ( $A\beta$ ) deposition in elderly non-demented patients and patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1994; 178(1): 59-62.
3. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995; 267(5203): 1445-9.
4. Honardost M, Soleimanjahi H, Rajaei F. Apoptosis: programmed cell death [in Persian]. *J Inflamm Diseases* 2013; 17(3): 48-57.
5. Noshadi E, Arshi A, Mahmoudi E, Jamshidian H, Dehghani-Samani M, Hashemzahi R, et al. A review of mitochondrial biogenesis and cellular response [in Persian]. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2019; 16(2): 149-59.
6. Obulesu M, Lakshmi MJ. Apoptosis in Alzheimer's disease: an understanding of the physiology, pathology and therapeutic avenues. *Neurochem Res* 2014; 39(12): 12-23.
7. Kumari S, Wang X, Liu Y, Gu Y, Huang Y, Zhang Q, et al. Height predict incident non-alcoholic fatty liver disease among general adult population in Tianjin, China, independent of body mass index, waist circumference, waist-to-height ratio, and metabolic syndrome. *BMC Public Health* 2020; 20(1): 388.
8. Sadeghian S, Kazemzadeh Y, Mohammadnejadpanah Kandi Y, Mirzayan Shanjani S, Sedaghati S. The effect of aerobic exercise with curcumin consumption on tissue apoptosis indices in the liver tissue of rats induced by breast cancer in the doxorubicin treatment phase: An experimental study [in Persian]. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2022; 21(4): 433-48.
9. Shamsi M, Elmieh A, Shabani R. Strength-endurance exercises combined with olive oil consumption on motor function and oxidative stress level in the brain of male parkinsonian rats [in Persian]. *J Jiroft Univ Med Sci* 2022; 9(2): 926-37.
10. Dall'Igna OP, Fett P, Gomes MW, Souza DO, Cunha RA, Lara DR. Caffeine and adenosine A2a receptor antagonists prevent  $\beta$ -amyloid (25-35)-induced cognitive deficits in mice. *Exp Neurol* 2007; 203(1): 241-5.
11. Aydın E, Türkez H, Keleş MS. The effect of carvedilol on healthy neurons and N2a cancer cells: some biochemical, anticarcinogenicity and genotoxicity studies. *Cytotechnology* 2014; 66(1): 149-57.
12. Eslimi Esfehiani D, Oryan S, Khosravi M, Valizadegan F. Effect of fennel extract on the improvement of memory disorders in beta amyloid Alzheimer model of male wistar rats [in Persian]. *J Ilam Univ Med Sci* 2019; 27(1): 1-12.
13. Rameshrad M, Razavi BM, Hosseinzadeh H. Saffron and its derivatives, crocin, crocetin and safranal: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* 2018; 28(2): 147-65.
14. Khosravi A. The combined effect of aerobic exercise with saffron extract on some regulatory factors of soleus muscle apoptosis in male rats following aerobic exercise [in Persian]. *JAHSSP* 2020; 6(2): 86-95.
15. Azadmanesh M, Rashidlamir A, Hejazi SM. The effect of eight-week ladder-climbing exercise on the atrial natriuretic peptide (Anp) gene expression in the heart tissue of wistar male rats [in Persian]. *Ebnesima* 2019; 21(1): 20-6.
16. Nazari M, Mofid N, Sadraei SH, Kaka G. The effect of low frequency electromagnetic fields on motor activity and histomorphometry of the motor area of the frontal cortex in adult male rats [in Persian]. *Cells and Tissues* 2020; 11(3): 167-77.
17. Ashofteh A, Cheragh-Birjandi S, TaheriChadorneshin H. The effect of resistance training with royal jelly supplement on gene expression of nerve growth factor and receptor tyrosine kinase A in the hippocampal tissue of male Alzheimer's rats [in Persian]. *JPSBS* 2022; 10(21): 78-89.
18. Song J, Hur BE, Bokara KK, Yang W, Cho HJ, Park KA, et al. Agmatine improves cognitive dysfunction and prevents cell death in a streptozotocin-induced Alzheimer rat model. *Yonsei Med J* 2014; 55(3): 689-99.
19. Kashef M, Salehpor M, Shahidi F, Sadegh Ghomi M. The effect of eight weeks of resistance exercise training on BAX and BCL-2 in the hippocampus tissue of large male laboratory rats [in Persian]. *Daneshvar Medicine* 2012; 29(4): 11-21.
20. Ni R, Marutle A, Nordberg A. Modulation of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor and fibrillar amyloid- $\beta$  interactions in Alzheimer's disease brain. *J Alzheimers Dis* 2013; 33(3): 841-51.
21. Zhang C, Bazan NG. Lipid-mediated cell signaling protects against injury and neurodegeneration. *J Nutr* 2010; 140(4): 858-63.
22. Kang EB, Um HS, Leem YH, Cho IH, Yang CH, Chae KR, et al. Exercise training acts as a therapeutic strategy for reduction of the pathogenic phenotypes for Alzheimer's disease in an NSE/APPSw-transgenic model. *Int J Mol Med* 2008; 22(4): 529-39.
23. Hong JH, Kim MJ, Park MR, Kwag OG, Lee IS, Byun BH, et al. Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin Chim Acta* 2004; 340(2-1): 107-15.
24. Kim DY, Jung SY, Kim CJ, Sung YH, Kim JD. Treadmill exercise ameliorates apoptotic cell death in the retinas of diabetic rats. *Mol Med Rep* 2013; 7(6): 1745-50.
25. Aguiar Jr AS, Castro AA, Moreira EL, Glaser V, Santos AR, Tasca CI, et al. Short bouts of mild-intensity physical exercise improve spatial learning and memory in aging rats: involvement of hippocampal plasticity via AKT, CREB and BDNF signaling. *Mech Ageing Dev* 2011; 132(12-1): 560-7.
26. Kwak HB. Effects of aging and exercise training on apoptosis in the heart. *J Exerc Rehabil* 2013; 9(2): 212-9.
27. Milajerdi A, Mahmoudi M. Review on the effects of saffron extract and its constituents on factors related to nervous system, cardiovascular and gastrointestinal diseases [in Persian]. *Clin Exc* 2014; 3(1): 108-27.
28. Kiasalari Z, Khalili M, Ghanbarian L. The effect of

- aqueous *Crocus sativus* L. (saffron) extract on learning and memory in male streptozotocin-induced diabetic rats [in Persian]. *Razi J Med Sci* 2019; 19(95): 44-51.
29. Kianbakht S. A systematic review on pharmacology of saffron and its active constituents [in Persian]. *J Med Plants* 2008; 7(28): 1-27.
30. Sattarzadeh MH, Tahmasebi Boroujeni S, Shahbazi M. Effect of swimming training on spatial memory of maternal deprived infants: Inducing stress by six hours separation per day [in Persian]. *J Ilam Univ Med Sci* 2022; 30(3): 88-100.
31. Khazdair MR, Boskabady MH, Hosseini M, Rezaee R, Tsatsakis AM. The effects of *Crocus sativus* (saffron) and its constituents on nervous system: A review. *Avicenna J Phytomed* 2015; 5(5): 376-91.
32. Alipour F, Mohammadzadeh E, Khallaghi B. Evaluation of apoptosis in rat hippocampal tissue in an experimental model of Alzheimer's disease [in Persian]. *Shefaye Khatam* 2014; 2(2): 13-20.
33. Hooshmand Moghadam B, Gaini AA, Eskandari M, Parsineh S, Hojjati Marvast M. The intervention of twelve weeks of resistance training on the serum levels of some markers of apoptosis in elderly men [in Persian]. *J Torbat Heydarieh Univ Med Sci* 2021; 8(4): 10-9.



## The Effect of Resistance Training Along with the Consumption of Saffron Extract on the Expression of Bax, Bcl-2 and Caspase-3 Genes in the Hippocampal Tissue of Male Alzheimer's Induced Rats

Fazel Bazyar<sup>1</sup>, Ramin Shabani<sup>2</sup>, Alireza Elmiye<sup>3</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Considering that Alzheimer's is a destructive disease with progressive disorders and memory loss and there is no definitive treatment for it, the purpose of this research is to investigate the effect of resistance training along with the consumption of saffron extract on the expression of Bax, Bcl-2 and Caspase genes. 3-Alzheimer was induced in the hippocampal tissue of male Alzheimer's rats.

**Methods:** In this experimental study, 32 adult rats were randomly divided into 4 Alzheimer's groups, including control groups, aerobic exercises, aerobic exercises + saffron extract, and saffron extract. Alzheimer's was induced by injecting amyloid beta 42-1 into the hippocampus. Resistance exercises including 3 sessions per week were performed for 8 weeks. Real Time PCR method was used to determine the expression level of the target genes. The data were analyzed using one-way analysis of variance and Tom Hen's post hoc test.

**Findings:** The results showed that after 8 weeks of resistance training, the expression of Bax gene in the intervention groups significantly decreased compared to the control group. Also, the expression of Bcl-2 gene in the control and resistance training group and the resistance training and extract group showed a significant decrease compared to the control group. The expression of caspase3 gene in the control + resistance training group and the resistance training and extract group showed a significant decrease compared to the control group.

**Conclusion:** It seems that resistance training and consumption of saffron extract decrease the expression of genes involved in apoptosis in Alzheimer's male rats.

**Keywords:** Resistance training; Saffron; Bcl-2; Caspase-3; Alzheimer's

**Citation:** Bazyar F, Shabani R, Elmiye A. **The Effect of Resistance Training Along with the Consumption of Saffron Extract on the Expression of Bax, Bcl-2 and Caspase-3 Genes in the Hippocampal Tissue of Male Alzheimer's Induced Rats.** J Isfahan Med Sch 2023; 41(713): 206-14.

1- PhD Candidate, School of Human Sciences, Department of Physical Education and Sports Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

2- Professor of Sports Physiology, School of Humanities, Department of Physical Education and Sports Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

3- Associate Professor, School of Humanities, Department of Physical Education and Sports Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

**Corresponding Author:** Ramin Shabani, Professor of Sports Physiology, School of Humanities, Department of Physical Education and Sports Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran; Email: ramin.shabani@iau.ac.ir