

## تأثیر تمرین هوازی با مصرف ملاتونین بر بیان نشانگرهای Bax و Bcl-2 میوکارد رت‌ها پس از ایسکمی - ریپر فیوژن

حامد علیزاده پهلوانی<sup>۱</sup>، حمید رجبی<sup>۲</sup>، محمد نبیونی<sup>۳</sup>، پژمان معتمدی<sup>۴</sup>، ندا خالدی<sup>۲</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** هدف از انجام تحقیق حاضر، بررسی تأثیر تمرین هوازی با مصرف ملاتونین بر بیان نشانگرهای Bax و Bcl-2 میوکارد رت‌ها پس از ایسکمی ریپر فیوژن بود.

**روش‌ها:** ۳۰ رت صحرایی نر ویستار دو تا سه ماهه با وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم به پنج گروه پایلوت (۱۴ رت)، شاهد (۴ رت)، ملاتونین (۴ رت)، تمرین هوازی (۴ رت) و تمرین هوازی و ملاتونین (۴ رت) تقسیم‌بندی شدند. گروه‌های ملاتونین به مدت یک ماه هر روز با دوز ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تیمار شدند. برای گروه‌های تمرین هوازی و تمرین هوازی و ملاتونین نیز دوره‌ی تمرینی یک ماهه با تواتر سه جلسه در هفته روی تردمیل انجام شد. سپس تمام رت‌ها در دو روز متوالی با فاصله‌ی ۲۴ ساعت تحت تزریق داروی ایزوپرنالین با دوز ۱۵۰ و ۱۲۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن قرار گرفتند. در نهایت، رت‌ها پس از تأیید سکنه تشریح شدند و اندازه‌گیری بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 به روش Real-time polymerase chain reaction انجام گردید. داده‌های به دست آمده با استفاده از فرمول  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  و آزمون‌های ANOVA، Independent t و Kruskal-Wallis مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

**یافته‌ها:** تیمار ملاتونین و تمرین هوازی به تنهایی بر بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 تأثیر اندکی داشت، اما تمرین هوازی با مصرف ملاتونین توانست بیان این ژن‌ها را به ترتیب کاهش و افزایش دهد. ژن‌های Bax و Bcl-2 نسبت به تیمار ملاتونین به تنهایی تأثیر معنی‌داری نشان دادند.

**نتیجه‌گیری:** تمرین هوازی با مصرف ملاتونین می‌تواند از میزان حجم سکنه‌ی میوکارد احتمالی بکاهد.

**واژگان کلیدی:** آپوپتوز، تمرین هوازی، ملاتونین

**ارجاع:** علیزاده پهلوانی حامد، رجبی حمید، نبیونی محمد، معتمدی پژمان، خالدی ندا. تأثیر تمرین هوازی با مصرف ملاتونین بر بیان نشانگرهای Bax و

Bcl-2 میوکارد رت‌ها پس از ایسکمی - ریپر فیوژن. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۶؛ ۳۵ (۴۲۳): ۳۱۸-۳۲۵

آینده افزایش می‌یابد. طبق گزارش‌های پژوهشی، تجمع لیپوپروتئین‌ها، آسیب اندوتلیوم و التهاب از جمله فرایندهای متعددی هستند که در شروع و پیشرفت یکی از مهم‌ترین عوارض قلبی - عروقی یعنی آترواسکلروز، سهیم می‌باشند (۱).

از طرف دیگر، هیپوکسی یا کمبود اکسیژن یکی از علل آسیب سلول عضله‌ی قلب و در نهایت، مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول قلبی به نام آپوپتوز است؛ به طوری که سلول‌ها و میتوکندری‌های یک ناحیه، یکپارچگی غشای خود را از دست می‌دهند و در نتیجه، مواد داخل سلولی مانند پروتئین‌های پیش‌آپوپتوزی آزاد می‌شوند که سبب

### مقدمه

بیماری‌های عفونی و سوء تغذیه تا قبل از سال ۱۹۰۰، به عنوان شایع‌ترین علل مرگ در جهان محسوب می‌شد، اما در حال حاضر بیماری‌های قلبی - عروقی شایع‌ترین علت مرگ در بسیاری از نقاط جهان به شمار می‌رود. این تغییر که به آن گذار اپیدمیولوژیک اطلاق می‌شود، ناشی از صنعتی شدن، شهرنشینی و تغییر سبک زندگی می‌باشد که در همه‌ی نقاط جهان و در میان همه‌ی نژادها، گروه‌های قومی و فرهنگ‌ها در حال رخ دادن است. اگر چنین وضعیتی به همین طریق ادامه یابد، میزان مرگ و میر با توجه به سن در سال‌های

۱- دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده‌ی علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

۴- استادیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

آپوپتوزی ملاتونین اشاره کرده‌اند. در این راستا، نتایج تحقیقی نشان داد که ملاتونین باعث کاهش نسبت مصرف اکسیژن میتوکندری، فعالیت کمپلکس I و II میتوکندری، تولید پراکسید هیدروژن، سطح لیپید پراکسیداز، مقدار کاردیولیپین و اکسیداسیون کاردیولیپین می‌شود (۹). پژوهش دیگری گزارش کرد که ملاتونین از طریق پاک کنندگی رادیکال‌های آزاد به طور مستقیم و از طریق فعالیت آنتی‌اکسیدانی خود به طور غیر مستقیم دارای ویژگی محافظتی قلبی است. همچنین، نتیجه‌گیری شد که ملاتونین نشانگرهای آپوپتوزی همچون Bax را کاهش و Bcl-2 را افزایش می‌دهد (۱۰).

در مجموع، می‌توان گفت که برنامه‌ی ورزشی منظم و مصرف ملاتونین، می‌تواند ظرفیت هوازی و آنتی‌اکسیدانی بیماران کرونری را بهبود بخشد. بنابراین، مطالعه‌ی حاضر با هدف تأثیر تمرین ورزشی هوازی با مصرف ملاتونین بر نشانگرهای بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 به منظور کاهش میزان آپوپتوز در رت‌هایی که ایسکمی ریپرفیوژن در آن‌ها القا شده بود، انجام شد.

### روش‌ها

در این پژوهش، ۳۰ رت صحرایی نر ویستار دو تا سه ماهه با وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم مورد استفاده قرار گرفت. گروه پایلوت (۱۴ رت) به گروه سالم بدون القای ایزوپرنالین (۷ رت) و گروه تحت القای ایزوپرنالین (۷ رت) تقسیم شد. در ادامه، رت‌های گروه ملاتونین (۴ رت) به مدت یک ماه هر روز با دوز ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تیمار شدند و برای رت‌های گروه هوازی (۴ رت) به مدت یک هفته دوییدن بر روی تردمیل اجرا گردید و سپس تمرین یک ماهه با تواتر سه جلسه در هفته را انجام دادند (۱۱)، اما گروه تمرین هوازی و ملاتونین (۴ رت)، تحت گاوآژ ملاتونین نیز قرار گرفتند. گروه شاهد (۴ رت) نیز تا پایان چهار هفته همراه با بقیه‌ی گروه‌ها بود (جدول ۱). ملاتونین مورد استفاده از شرکت Sigma (کد کالای M5250) تهیه گردید.

جدول ۱. پروتکل تمرین هوازی

سرد کردن	بدنه‌ی اصلی تمرین هوازی	گرم کردن	مراحل تمرین مؤلفه‌ی تمرین
۶	۳۰	۶	زمان تمرین (دقیقه)
۱۵ تا ۲۰	۲۳ تا ۲۵	۱۵ تا ۲۰	سرعت (متر در دقیقه)
۹۰ تا ۱۲۰	۶۹۰ تا ۷۵۰	۹۰ تا ۱۲۰	مسافت (متر)
صفر	۵ تا ۲۰	صفر	شیب تردمیل (درجه)

تمام رت‌ها پس از یک ماه تمرین، به مدت دو روز متوالی

بروز واکنش‌های التهابی و تشدید آسیب اولیه می‌گردد. در مقابل، پروتئین‌های آنتی‌آپوپتوزی می‌توانند از طریق فعالیت آنتی‌آپوپتوزی و تأثیر بر مرحله‌ی آپتار کاسپازی، از مرگ سلولی ایجاد شده توسط محرک‌ها بکاهند. از این رو، پروتئین پیش‌آپوپتوزی Bax و پروتئین آنتی‌آپوپتوزی Bcl-2 از جمله مهم‌ترین پروتئین‌های درگیر در آپوپتوز می‌باشند و به همین سبب از نسبت آن‌ها به عنوان شاخصی برای کاهش یا افزایش مرگ سلولی استفاده می‌شود. بنابراین، هر عاملی که بتواند نسبت Bcl-2 به Bax را افزایش دهد، می‌تواند در کاهش آپوپتوز مؤثر واقع شود (۲).

به هر حال، عوامل متعددی می‌توانند از شدت ضایعه‌ی عروق کرونری و سپس آپوپتوز میوکارد بکاهند که مهم‌ترین آن‌ها، فعالیت بدنی و مصرف دارو می‌باشد. تحقیقی گزارش کرد که خطر گسترش بیماری شریان عروق کرونری در بزرگسالان آماده یا فعال در مقایسه با افراد غیر فعال، ۳۰ تا ۴۰ درصد کمتر است (۲). نتایج مطالعه‌ی دیگری نشان داد که تمرین هوازی سبب افزایش فاکتورهای آنتی‌آپوپتوزی مانند Bcl-2 و کاهش فاکتورهای آپوپتوزی همچون Bad در میوکارد می‌شود (۳). بنابراین، به نظر می‌رسد که یکی از دلایل احتمالی فواید ورزش جهت محافظت قلبی، کاهش نشانگرهای آپوپتوزی مانند Bax و Bad و همچنین، افزایش نشانگرهای آنتی‌آپوپتوزی همچون Bcl-2 در سلول‌های میوکاردی است. در این راستا، نتایج پژوهشی نشان داد که فعالیت ورزشی، افزایش نسبت Bax به Bcl-2، آپوپتوز و ریمودلینگ قلبی رت‌های ناشی از پیری را کاهش می‌دهد (۴). نتایج تحقیقی گزارش کرد که نسبت Bcl-2 به Bax در گروه تمرین استقامتی در مقایسه با گروه شاهد و تمرین حاد، بیشتر است (۵). نتایج مطالعه‌ی بیان نمود که تمرین ورزشی، بیان پروتئین‌های حفاظتی قلب مانند Bcl-2 و HSP<sub>۷۲</sub> را در رت‌های مبتلا به پرفشاری خون افزایش می‌دهد (۶).

از طرف دیگر، درمان دارویی بلند مدت شامل داروهای مسدود کننده‌ی بتا، ملاتونین، آسپرین، پلاویکس، وارفارین و استاتین مورد توجه قرار گرفته‌اند (۷). مصرف این داروها بیشتر به علت نقش گشاد کنندگی عروق توسط آن‌ها می‌باشد. همچنین، وقوع سکته در ابتدای صبح به دلیل کاهش ترشح ملاتونین در بدن گزارش شده است. در تأیید این مطلب، دریافت خوراکی ملاتونین در انسان‌ها سبب کاهش فشار خون در نمونه‌های دارای فشار طبیعی می‌شود. همچنین، گزارش شده است که سطوح ملاتونین در افراد مبتلا به سکته و بیماری‌های قلبی و عروقی کاهش می‌یابد. در نهایت، این یافته که گیرنده‌های ملاتونین در شریان انسان‌ها وجود دارد، بیانگر نقش مستقیم این هورمون در کنترل موضعی قطر عروق خونی است (۸). مطالعات جدید به ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و ضد

۵۵ تا ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به رسوب اضافه شد تا RNA در آب حل شود. تهیه‌ی cDNA با استفاده از پروتکل کیت ویوانتیس (کد RTPL۱۲، کشور مالزی) انجام گرفت. در ضمن، پرایمرهای بتا اکتینین (فوروارد CTAAGGCCAACCGTGAAAAGATG و ریورس AATTGGCGATGAACTGGACAAC) و Bax (فوروارد TGGTACGACCAGAGGCATACAG و ریورس AGCAAAGTAGAAAAGGGCAACC) و Bcl-2 (فوروارد GAGGATTGTGGCCTTCTTTG و ریورس CATGCTGGGGCCATATAGTT) با کمک نرم‌افزار Primer3 طراحی و مورد استفاده قرار گرفت.

### آماده‌سازی Real-time polymerase chain reaction

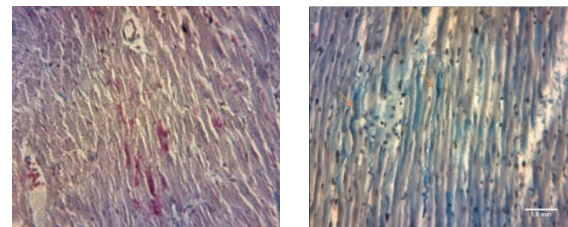
**Real-Time PCR:** به منظور آماده‌سازی مواد Real-Time PCR، ۴ لاندنا cDNA از هر گروه به چاهک‌های دستگاه ریخته شد. سپس، ۶ لاندنا از محلول Master mix [یک لاندنا پرایمر فوروارد و ریورس و ۵ لاندنا SYBR Green (شرکت یکتا تجهیز، کد YT۲۵۵۱)] به آن اضافه گردید. در ادامه، دستگاه Real-Time PCR به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد (واسرشته شدن اولیه)، ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد (واسرشته شدن ثانویه)، ۲۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد (اتصال پرایمرها) و ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد (تکثیر) راه‌اندازی شد. واکنش از مرحله‌ی دوم به بعد برای ۴۰ سیکل تکرار گردید. Ct‌های مربوط به واکنش با استفاده از نرم‌افزار دستگاه استخراج و ثبت گردید.

### یافته‌ها

نتایج چند برابری ژن‌های Bax و Bcl-2 نشان داد که میزان بیان ژن Bax در گروه ملاتونین، هوازی و هوازی و ملاتونین نسبت به ایسکمی به ترتیب ۱/۳۰، ۰/۷۸ و ۰/۳۶ برابر و میزان بیان ژن Bcl-2 در گروه ملاتونین، هوازی و هوازی و ملاتونین به ترتیب ۱/۳، ۲/۰ و ۳/۶ برابر شد (شکل ۲). بر اساس یافته‌های به دست آمده، مصرف ملاتونین در طول چهار هفته تغییر چندانی در بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 ایجاد نکرد، اما تمرین هوازی میزان بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 را به ترتیب کاهش و افزایش داد که این تغییرات در گروه هوازی ملاتونین چشمگیرتر بود.

به منظور بررسی سطح معنی‌داری از فرمول  $2^{-\Delta\Delta CT}$  ژن‌های Bax و Bcl-2 استفاده شد. البته به دلیل این که واریانس داده‌های Bax و Bcl-2 با استفاده از آزمون Leven به ترتیب غیر معنی‌دار ( $P = ۰/۲۹۲$ ) و معنی‌دار ( $P = ۰/۰۲۰$ ) گزارش شد، آزمون‌های

استراحت کردند و با فاصله‌ی ۲۴ ساعت تحت تزریق ایزوپرنالین (کد ۱۵۶۲۷، شرکت Sigma) با دوز ۱۵۰ و ۱۲۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن قرار گرفتند (۱۲). در ادامه، با تکنیک رنگ‌آمیزی Masson Trichrome مشخص شد که این مقدار تزریق دارو، باعث سکنه در گروه پایلوت می‌گردد؛ چرا که نتایج آزمون t Independent نشان داد که در میزان فیروز به دست آمده از نرم‌افزار J، بین گروه رت‌های تحت القای ایزوپرنالین و سالم تفاوت معنی‌داری وجود داشت ( $P < ۰/۰۰۱$ )؛ به طوری که فیروز گروه ایسکمی ریپرفیوژن ( $۱۱/۹۵ \pm ۱۰۷/۸۵$ ) نسبت به گروه سالم ( $۲۴/۵۷ \pm ۱۷/۱۷$ ) از میانگین بیشتری برخوردار بود ( $۰/۰۹۸ =$  آماره‌ی آزمون Leven). یافته‌ها نشان داد که تزریق ایزوپرنالین با دوز ۱۵۰ و ۱۲۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در دو روز متوالی، توانایی ایجاد فیروز در قلب رت‌ها را دارد که نشان دهنده‌ی سکنه‌ی قلبی می‌باشد (شکل ۱).



شکل ۱. رنگ‌آمیزی Masson Trichrome بطن چپ رت‌های گروه سالم و گروه تحت القای ایزوپرنالین با بزرگ‌نمایی  $40\times$

### استخراج RNA، سنتز cDNA و طراحی پرایمرها: RNA

نمونه‌های بطن چپ به وسیله‌ی ازت مایع و هاون سنگی با روش استخراج دستی و پروتکل استاندارد ترایزول (کد ET۱۰۱، شرکت Civic Bioscience، کانادا) استخراج شد؛ به طوری که به ازای هر ۳۰ تا ۶۰ میلی‌گرم بافت، یک میلی‌لیتر محلول ترایزول به میکروتیوب حاوی بافت اضافه گردید. در ادامه، نمونه‌ها پس از یک روز از فریز خارج و به اندازه‌ی ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم (کد ۱۰۲۴۴۵، شرکت Merck، آلمان) به محلول مایع اضافه شد. سپس محلول به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. در ادامه، محلول رویی برداشته شد و به همان اندازه ایزوپروپانول (کد ۱۰۹۶۳۴، شرکت Merck، آلمان) به آن اضافه گردید. سپس نمونه‌ها پس از یک شب در فریزر با دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد، به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. رسوب ایجاد شده در ته میکروتیوب به وسیله‌ی یک میلی‌لیتر الکل ۷۵ درصد، به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۷۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. در نهایت، ۳۳ میکرولیتر آب تثبیت کننده‌ی RNA در دمای

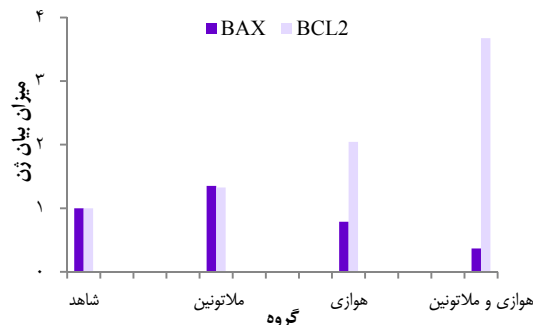
نتایج آزمون Kruskal-Wallis برای مقایسه‌ی بین گروه‌ها در بیان ژن Bcl-2، حاکی از آن بود که میزان بیان این ژن در گروه‌های مورد مطالعه تغییرات معنی‌داری نداشت؛ چرا که مقدار آماره‌ی بیان ژن Bcl-2 در گروه‌ها، ۰/۶۹۲ بود که بزرگ‌تر از مقدار ۰/۰۵ می‌باشد. به عبارت دیگر، متغیرهای مستقل (تیمار ملاتونین و تمرین هوازی) بر بیان ژن Bcl-2 تأثیر معنی‌داری نداشتند.

### بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که مصرف ملاتونین، میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی Bax و Bcl-2 را افزایش می‌دهد که این نتایج با یافته‌های تحقیق Forman و همکاران (۱۰) همخوانی نداشت. آن‌ها اثرات مفید ملاتونین را بر تغییرات قلب رت‌های پیر بررسی کردند (۱۰)؛ در حالی که در تحقیق حاضر از رت‌های ۲ تا ۳ ماهه استفاده شد. به نظر می‌رسد که در تحقیق Forman و همکاران، ملاتونین بیشتر نقش آنتی‌اکسیدانی خود را اعمال کرده است؛ چرا که آنتی‌اکسیدان‌ها در رت‌های پیر کاهش می‌یابد و به دنبال آن با تیمار ملاتونین، تا حدودی این کاهش جبران می‌شود و می‌تواند از حجم آپوپتوز و نشانگرهای آن مانند Bax و Bad بکاهد (۱۰). در تحقیق حاضر ملاتونین بیشتر نقش خواب‌آوری و رگ‌گشایی خود را در رت‌های ۲ تا ۳ ماهه اعمال نمود؛ به طوری که با خواب‌آوری و عدم تحرک و عمل رگ‌گشایی، میزان نفوذ چربی در میکارد افزایش یافت و در ادامه‌ی آن شاخص‌های التهابی مانند Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) و رادیکال‌های آزاد همچون Reactive oxygen species (ROS) و Reactive nitrogen species (RNS) نیز بیشتر شد و در نهایت، میکارد مستعد به آسیب ایسکمی گردید. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که ملاتونین با ویژگی‌های خود مانند خاصیت آنتی‌اکسیدانی، رگ‌گشایی و خواب‌آوری، می‌تواند نقش دوگانه ایفا نماید؛ به طوری که اگر خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن غالب شود، نقش مفیدی اعمال می‌کند، اما در صورتی که نقش رگ‌گشایی و خواب‌آوری آن غالب گردد، نقش زیان‌آوری دارد.

همچنین، شاید دلیل افزایش Bcl-2 این باشد که ترکیبات حساس به ردوکس (Redox) در سیگنالینگ محافظت سلول ملاتونین درگیر می‌شوند و این امر منجر به پاسخ رونویسی Activator protein-1 (AP-1) و Nrf2 می‌گردد. با این مسیرها، ملاتونین باعث تحریک ژن‌های آنتی‌اکسیدانی و دفع مسمومیت می‌شود و به نوبه‌ی خود به عنوان افزایش دهنده‌ی سیستم گلوتاتیون عمل می‌کند. در نهایت، ملاتونین سبب کاهش تولید ROS و فعالیت عوامل آنتی‌آپوپتوزی Bcl-2 و حساس به ردوکس می‌گردد (۱۳). سالاری‌لک و همکاران در مطالعه‌ی خود بیان کردند که تولید زیاد

ANOVA و تعقیبی Tukey برای ژن Bax و آزمون Kruskal-Wallis برای ژن Bcl-2 به منظور مقایسه‌ی گروه‌های تحقیق مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۲).



شکل ۲. میزان بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 در گروه‌های شاهد، ملاتونین، هوازی و هوازی و ملاتونین

با توجه به داده‌های جدول ۲، میزان بیان ژن Bax در میان گروه‌های تجربی تغییرات معنی‌داری داشت. بر اساس نتایج آزمون تعقیبی Tukey، بین گروه ملاتونین و گروه هوازی و ملاتونین تغییر معنی‌داری مشاهده گردید ( $P = 0/006$ )، اما بین گروه‌های شاهد و هوازی و ملاتونین تغییر معنی‌داری گزارش نشد ( $P = 0/070$ ).

جدول ۲. نتایج آزمون ANOVA برای مقایسه‌ی ژن Bax در گروه‌های شاهد، ملاتونین، هوازی و هوازی و ملاتونین

مقدار P	انحراف معیار	Fold change	$2^{-\Delta\Delta CT}$	گروه‌های تحقیق
۰/۰۰۹	۰/۱۶	۱/۰۰	۱/۰۶۳۴	شاهد
			۰/۸۵۱۹	
			۰/۸۸۸۱	
			۱/۱۹۶۴	
۰/۲۵	۱/۳۵	۱/۴۰	۱/۰۵	ملاتونین
			۱/۳۰	
			۱/۶۶	
			۰/۹۷۸۶	
۰/۴۸	۰/۷۸	۰/۷۸	۰/۶۸۲۴	هوازی
			۰/۱۷۰۶	
			۱/۳۱۸۴	
			۰/۸۳	
۰/۳۳	۰/۳۶	۰/۳۶	۰/۱۲	هوازی و ملاتونین
			۰/۴۱	
			۰/۱۰	
			۰/۱۰	

آنتی آپوپتوزی Bcl-xL در گروه مبتلا به دیابت در مقایسه با گروه شاهد کمتر بود. با این حال، رت‌های پژوهش آنان ۱۰ هفته و هر هفته ۵ بار تمرین کردند (۱۶)؛ در حالی که رت‌های تحقیق حاضر ۴ هفته و هر هفته ۳ بار تمرین داده شدند. به نظر می‌رسد مدت تمرین به منظور سازگاری و ویژگی‌های تمرین می‌تواند مفید باشد؛ به طوری که اگر مدت زمان جلسات تمرین بیشتر شود و یا تواتر آن در هفته افزایش یابد، این امر می‌تواند بر میزان بیان نشانگرهای آپوپتوزی Bax تأثیرگذار باشد؛ چرا که با سازگاری تمرین، عوامل اکسیدانی، پروفایل‌های چربی، التهاب و عوامل آپوپتوزی مانند کاسپاز-۳ کاهش می‌یابد و در مقابل عوامل آنتی‌اکسیدانی و پیش‌بقای سلولی مانند مسیر IGF1-R/PI3K/AKT (Insulin-like growth factor 1-receptor/phosphoinositide 3 kinase/AKT) افزایش می‌یابند و در مجموع می‌توانند آپوپتوز قلبی را کاهش دهند.

نتایج به دست آمده از مطالعه‌ی حاضر با یافته‌های تحقیقات جعفری و همکاران (۱۸) و Powers و همکاران (۱۹) مشابه، اما از نظر سطح معنی‌داری غیر همسو بود. Powers و همکاران بیان کردند که تمرین ورزشی، محافظتی در مقابل آسیب ایسکمی ریپرفیوژن میوکارد است؛ چرا که تمرین هوازی مکانیزم‌های مورد نظر اثرات محافظت قلبی ناشی از ورزش مانند افزایش گردش خون شریان کرونری، بیان پروتئین‌های استرس شبکه‌ی آندوپلاسمی، افزایش فعالیت سیکلوآکسیژناز ۲، القای پروتئین‌های شوک گرمایی میوکارد، افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سیتوزولی میوکارد، افزایش سیگنالینگ نیتریک اکساید، تغییر فنوتیپ میتوکندریایی، تغییر و افزایش کانال‌های پتاسیم حساس به Adenosine triphosphate (ATP) سارکولمایی و غشای داخلی میتوکندریایی را بهبود می‌دهد. همچنین، نشان دادند که افزایش سطوح آنتی‌اکسیدانی میوکارد و افزایش بیان کانال‌های پتاسیمی حساس به ATP، به محافظت قلبی ناشی از ورزش در مقابل آسیب ایسکمی ریپرفیوژن کمک می‌کند؛ چرا که عوامل ذکر شده سبب کاهش آسیب به میتوکندری می‌شوند و استحکام غشای میتوکندری را افزایش می‌دهند و در نهایت، سبب افزایش بیان ژن Bcl-2 در میتوکندری می‌گردند (۱۹). در عین حال، به نظر می‌رسد با افزایش مدت زمان تمرین و همچنین، تواتر تمرین در هفته، بتوان افزایش بیان ژن Bcl-2 را ارتقا بخشید؛ چرا که با سازگاری تمرین، عوامل بیان شده فرصت افزایش بیشتری می‌یابند. در نتیجه، میوکارد آمادگی بیشتری برای مقابله به آسیب ایسکمی ریپرفیوژن خواهد داشت.

بر اساس نتایج پژوهش حاضر، تمرین هوازی با مصرف ملاتونین، میزان بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 میوکارد را به ترتیب کاهش و افزایش داد که این کاهش در Bax در مقایسه با گروه

رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپیدها، سبب اختلال در ساختمان غشای لیپیدها و دیگر ترکیبات سلولی می‌گردد. آن‌ها نتیجه گرفتند که مصرف ملاتونین، از تغییرات پروفایل‌های چربی و افزایش Malondialdehyde (MDA) ناشی از رژیم غذایی با فروکتوز بالا در بافت قلبی جلوگیری می‌کند (۱۴)؛ چرا که این هورمون پس از عبور از غشای زیستی، بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی را تحریک و ژن‌های پرواکسیدان را مهار می‌کند و بدین ترتیب، توان آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها را بیشتر می‌نماید (۱۵).

دیگر دلیل احتمالی افزایش ژن Bcl-2، کاهش آدرنالین و به دنبال آن حفظ هموستاز کلسیم است که منجر به رگ‌گشایی عروق میوکارد و در نتیجه، حداقل اختلال و نفوذپذیری میتوکندری سلول می‌گردد. بنابراین، خاصیت آنتی‌اکسیدانی ملاتونین سبب کاهش Inducible nitric oxide synthase (iNOS) و اکسیدان‌ها و افزایش Nrf2 و مسیر JAK2/STAT3 می‌گردد که هر دو باعث مهار التهاب و اکسیداسیون میوکارد می‌شوند (۱۳). از طرف دیگر، عدم تحرک گروه ملاتونین ممکن است سبب افزایش آدیپوکاین‌ها مانند ویسفاتین در درون پلاسما شود که در نهایت التهاب و اکسیداتیو میوکارد را افزایش می‌دهد و میوکارد را بیشتر مستعد به آسیب ایسکمی می‌گرداند. در عین حال، وقتی که نفوذ لیپیدها و عوامل اکسیدانی بر اکسیداسیون لیپیدها و عوامل آنتی‌اکسیدانی غالب شود، می‌تواند نقش زیان‌آوری در میوکارد ایجاد نماید. بنابراین، به نظر می‌رسد که ملاتونین می‌تواند دارای اثرات چند وجهی برای آسیب ایسکمی ریپرفیوژن قلب باشد.

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که تمرین هوازی، میزان بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 را به ترتیب کاهش و افزایش می‌دهد، اما این کاهش در مقایسه با گروه ایسکمی ریپرفیوژن معنی‌دار نبود. این نتایج از نظر این که میزان بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 را کاهش داده است، با نتایج تحقیقات Barbosa Dos Santos و همکاران (۱۶)، Santana و همکاران (۳) و Shoujun و Chengji (۱۷) همسو بود، اما از نظر معنی‌داری مطابقت نداشت. یکی از تفاوت‌های اساسی تحقیق حاضر و پژوهش Barbosa Dos Santos و همکاران آن است که در مطالعه‌ی حاضر رت‌های سالم مورد بررسی قرار گرفتند؛ در حالی که Barbosa Dos Santos و همکاران رت‌های مبتلا به دیابت را بررسی کردند (۱۶). به نظر می‌رسد نشانگرهای آپوپتوزی تا حدودی در رت‌های مبتلا به دیابت بارزتر است و به همین دلیل تمرین ورزشی توانسته است بر میزان بیان ژن آپوپتوزی تأثیر بیشتری بگذارد؛ در حالی که رت‌های سالم در مطالعه‌ی حاضر تحت تمرین هوازی قرار گرفتند. در تأیید این مطلب، نتایج پژوهش Barbosa Dos Santos و همکاران نشان داد که میزان پروتئین‌های

Kumar و Naidu به این نتیجه دست یافتند که محصولات پراکسیداسیون لیپید مانند مالونیل دی آلدئید پس از ورزش به طور معنی داری افزایش می یابد؛ در حالی که سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase یا SOD) و گلووتاتیون پراکسیداز (Glutathione peroxidase یا GPx) کاهش پیدا می کند. همچنین، سطح پایه‌ی محصولات پراکسیداسیون لیپید در افراد تحت درمان با ملاتونین در مقایسه با مطالعه‌ی بدون ملاتونین، به طور معنی داری کاهش یافت. در ادامه از کاهش SOD و GPx ناشی از ورزش پس از درمان با ملاتونین جلوگیری شد (۲۱).

نتایج مطالعه‌ی Barbosa Dos Santos و همکاران نشان داد که رت‌های تمرین کرده‌ی تحت استانازلول، افزایشی در فشار خون و وزن نسبی قلب را تجربه کردند و انحراف محور چپ قلب آن‌ها افزایش یافت. اگرچه ملاتونین از هاپیرتروفی قلبی در رت‌های تحت درمان با استانازلول جلوگیری نکرد، اما فشار خون و فعالیت کاتالاز قلبی را حفظ نمود و از انحراف محور الکتریکی قلب ناشی از استانازلول جلوگیری کرد. آن‌ها نتیجه‌گیری کردند که تجویز مزمن استانازلول، باعث اثرات جانبی قلبی-عروقی می شود که تا حدی با تیمار ملاتونین کاهش می یابد. همچنین، ذکر کردند که ترکیب ملاتونین و ورزش می تواند اثرات جانبی استانازلول را در سیستم قلبی-عروقی به حداقل برساند (۱۶).

با توجه به نتایج تحقیق حاضر و تحقیقات پیشین، به نظر می رسد که ملاتونین همراه با ورزش می تواند از اختلالات سیستم قلبی-عروقی مانند افزایش رادیکال‌های آزاد، ROS، RNS، اکسیدان‌ها و عوامل آپوپتوزی مانند Bax جلوگیری کند و از طرف دیگر، عوامل آنتی‌اکسیدانی مانند SOD و GPx و عوامل آنتی‌آپوپتوزی مانند Bcl-2 و پروتئین‌های شوک گرمایی مانند Hsp72 و Hsp70 و پروتئین‌های کانال‌های یونی مانند کلسیم و پتاسیم را افزایش دهد. از این رو، می توان با افزایش مدت زمان تمرین و تواتر تمرین در هفته همراه با مصرف ملاتونین، از میزان حجم آپوپتوز ناشی از ایسکمی ریپرفیوژن کاست.

### تشکر و قدردانی

مطالعه‌ی حاضر برگرفته از یک کار پژوهشی در آزمایشگاه زیست‌شناسی دانشگاه خوارزمی می باشد. بدین وسیله از خانم‌ها تایانلو و کریمزاده به جهت همکاری در انجام تحقیق، تقدیر و تشکر به عمل می آید.

ایسکمی ریپرفیوژن معنی دار نبود، اما در مقایسه با گروه ملاتونین معنی دار بیان شد. این نتایج نشان می دهد که تمرین هوازی با مصرف ملاتونین توانسته است میزان بیان ژن Bax را نسبت به سایر گروه‌ها به مقدار بیشتری کاهش دهد؛ چرا که به نظر می رسد مصرف ملاتونین با خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود توانسته است به عدم سازگاری تمرین در گروه تمرین هوازی کمک کند و کمبودهای آنتی‌اکسیدانی گروه هوازی را جبران نماید. از طرف دیگر، تمرین ورزشی به طور احتمالی میزان نفوذ پروفایل‌های چربی مانند Low-density lipoprotein (LDL) و Very low-density lipoprotein (VLDL) را در گروه ملاتونین به دلیل عدم تحرک و خواب‌آوری جبران کرده و این عوامل اثر افزایشی بر هم گذاشته و در نهایت منجر به کاهش میزان Bax در میوکارد شده‌اند. از طرف دیگر، ورزش و ملاتونین به طور احتمالی هموستاز کلسیم، نفوذپذیری میتوکندری، رهایش سیتوکروم C و آدرنالین را بهبود می بخشد که همه‌ی این عوامل می توانند در کاهش آسیب ایسکمی ریپرفیوژن دخالت کنند. نتایج پژوهشی نشان داد که ورزش و ملاتونین با توجه به افزایش عوامل پیش‌بقا مانند مسیرهای سلولی IGF1-R/PI3K/AKT و JAK2/STAT3 می توانند میزان پیش‌بقای میوکارد را افزایش دهند (۱۷). با توجه به موارد ذکر شده، به نظر می رسد که با افزایش مدت زمان تمرین و مصرف ملاتونین، می توان به نتیجه‌ی بهتری امید داشت.

شاید بتوان گفت که دلیل افزایش بیشتر بیان ژن Bcl-2 در گروه تمرین ورزشی همراه با ملاتونین در مقابل تمرین ورزشی به تنهایی، میزان التهاب کمتر در گروه ورزشی با مصرف ملاتونین باشد. نتایج مطالعه‌ی Veneroso و همکاران گزارش کرد، هنگامی که عضله‌ی قلب تحت ورزش حاد قرار می گیرد، باعث افزایش علائم آسیب سلولی می شود؛ چرا که ورزش با افزایش معنی دار فعالیت مالوپراکسیدازها و سطوح mRNA، TNF- $\alpha$ ، Interleukin-1 (IL-1) و IL-6 همراه است. همچنین، آن‌ها نشان دادند که غلظت mRNA، پروتئین مولکول چسبان درون سلولی iNOS و سیکلوآکسیژناز ۲ افزایش یافت. علاوه بر این، فعالیت معنی دار Nuclear factor-kappaB (NF-kB) در رت‌های تمرین کرده مشاهده گردید. در مقابل، این اثرات به طور کلی و جزئی با تیمار ملاتونین مسدود شد. بنابراین، می توان گفت که ملاتونین از آسیب قلبی ناشی از ورزش محافظت می کند (۲۰). در تأیید این مطلب،

### References

1. Longo D, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Jameson J, Loscalzo J. Harrison's principles of internal medicine. 18<sup>th</sup> ed. New York, NY: McGraw-Hill Professional; 2011.
2. Shariatzadeh M. Apoptosis programmed cell death. 1<sup>st</sup> ed. Arak, Iran: Arak University Press; 2009: [In Persian].
3. Santana ET, Serra AJ, Silva Junior JA, Bocalini DS, Barauna VG, Krieger JE, et al. Aerobic exercise

- training induces an anti-apoptotic milieu in myocardial tissue. *Motriz: Rev Educ Fis* 2014; 20(2): 233-8.
4. 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.
  5. Delchev S, Georgieva K, Koeva Y, Atanassova P. Bcl-2 and Bax expression in rat myocardium after acute exercise and endurance training. *Proceedings of the Balkan scientific conference of biology*; 2005 May 19-21; Plovdiv, Bulgaria. p. 269-76.
  6. 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.
  7. Ehrman J, Gordon P, Visich P, Keteyian S. *Clinical exercise physiology*. 3<sup>rd</sup> ed. New York, NY: Human Kinetics; 2013.
  8. Farhud DD, Yazdanpanah L. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency. *Iran J Public Health* 2008; 37(4): 1-18.
  9. Petrosillo G, Di VN, Pistolese M, Casanova G, Tiravanti E, Colantuono G, et al. Protective effect of melatonin against mitochondrial dysfunction associated with cardiac ischemia- reperfusion: role of cardiolipin. *FASEB J* 2006; 20(2): 269-76.
  10. Forman K, Vara E, Garcia C, Kireev R, Cuesta S, Acuna-Castroviejo D, et al. Beneficial effects of melatonin on cardiological alterations in a murine model of accelerated aging. *J Pineal Res* 2010; 49(3): 312-20.
  11. Hoydal MA, Wisloff U, Kemi OJ, Ellingsen O. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2007; 14(6): 753-60.
  12. Azamian Jazi A, Haffezi M R, Cheraghi J, Abdi H. The combined effect of endurance training and atorvastatin on the extent of necrosis damage and fibrosis tissue in male wistar rats heart after experimental myocardial infarction. *J Ilam Univ Med Sci* 2016; 23(7): 28-38. [In Persian].
  13. Luchetti F, Canonico B, Betti M, Arcangeletti M, Pilolli F, Piroddi M, et al. Melatonin signaling and cell protection function. *FASEB J* 2010; 24(10): 3603-24.
  14. Salarilak L, Heidari R, Nejati V. Protective effects of melatonin on lipid profile in fructose induced dyslipidemia. *Iran J Med Educ* 2011; 13(4): 406-11. [In Persian]
  15. Hardeland R. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine* 2005; 27(2): 119-30.
  16. Barbosa Dos Santos G, Machado Rodrigues MJ, Goncalves EM, Cintra Gomes Marcondes MC, Areas MA. Melatonin reduces oxidative stress and cardiovascular changes induced by stanozolol in rats exposed to swimming exercise. *Eurasian J Med* 2013; 45(3): 155-62.
  17. Chengji W, Shoujun H. Aerobic exercise can ameliorate heart function in patients with myocardial infarction through up-regulating M3 receptor. *IJC Metab Endocr* 2016; 13: 1-5.
  18. Jafari A, Pourrazi H, Nikookheslat S, Baradaran B. Effect of exercise training on Bcl-2 and Bax gene expression in the rat heart. *Gene Cell Tissue* 2015; 2(4): e32833.
  19. Powers SK, Quindry JC, Kavazis AN. Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 2008; 44(2): 193-201.
  20. Veneroso C, Tunon MJ, Gonzalez-Gallego J, Collado PS. Melatonin reduces cardiac inflammatory injury induced by acute exercise. *J Pineal Res* 2009; 47(2): 184-91.
  21. Kumar KV, Naidu MUR. Effect of oral melatonin on exercise-induced oxident stress in healthy subjects. *Indian J Pharmacol* 2002; 34(4): 256-9.

## The Effect of Aerobic Exercise and Melatonin Consumption on the Expression of Bax and Bcl-2 Markers in Rat Myocard after Ischemia-Reperfusion

Hamed Alizadeh-Pahlavani<sup>1</sup>, Hamid Rajabi<sup>2</sup>, Mohammad Nabiuni<sup>3</sup>, Pezhman Motamedi<sup>4</sup>,  
Neda Khaledi<sup>4</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** This research aimed to examine the effect of aerobic exercise and melatonin consumption on the expression of Bax and Bcl-2 markers in rat myocard after ischemia-reperfusion by isoprenaline.

**Methods:** 30 two- to three-months-old male Wistar rats were used weighing approximately 200-250 g. They were divided into five groups of pilot (n = 14), control (n = 4), melatonin (n = 4), aerobic (n = 4), and melatonin-aerobic (n = 4). Rats in melatonin and melatonin-aerobic groups were gavaged every day for one month using a dose of 10 mg per kg body-weight. Meanwhile, rats in aerobic and melatonin-aerobic groups were familiar with running on treadmill for one week, and then, they were exposed training course with frequency of three times weekly for one month. After one month, all the rats were injected isoprenaline with dose of 150 and 125 mg per kg body-weight in two consecutive days with 24-hours interval. Finally, rats were sacrificed after confirmation of infarct. Expression of Bax and Bcl-2 gene were studied via real-time polymerase chain reaction method. Data were analyzed using  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  formula and one-way ANOVA and Kruskal-Wallis tests.

**Findings:** Separately, melatonin treatment and aerobic training had negligible effect on expression of Bax and Bcl-2 genes. But, combination of aerobic exercise and melatonin significantly decreased and increased the expression of Bax and Bcl-2 genes, respectively, compared to treatment with melatonin alone.

**Conclusion:** However, it seems that aerobic exercise with consuming melatonin in a longer term can reduce the amount of possible myocardial infarction.

**Keywords:** Apoptosis, Aerobic exercise, Melatonin

**Citation:** Alizadeh-Pahlavani H, Rajabi H, Nabiuni M, Motamedi P, Khaledi N. **The Effect of Aerobic Exercise with Melatonin Consumption on the Expression of Bax and Bcl-2 Markers in Rat Myocard after Ischemic-Reperfusion.** J Isfahan Med Sch 2017; 35(423): 318-25.

1- PhD Student, Department of Exercise Physiology, School of Sport Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

2- Associate Professor, Department of Exercise Physiology, School of Sport Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

3- Associate Professor, Department of Cell and Molecular Biology, School of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

4- Assistant Professor, Department of Exercise Physiology, School of Sport Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

**Corresponding Author:** Hamed Alizadeh-Pahlavani, Email: alizadehh76@yahoo.com