

## اثر شش هفته تمرین تناوبی با شدت بالا همراه با مکمل یاری عصاره‌ی زالزالک بر تغییرات شاخص‌های

## BAX/Bcl-2 بافت هیپوکمپ موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار سالمند

فاطمه کیانی زادگان<sup>۱</sup>، محمد رمی<sup>۲</sup>، علی اکبر علیزاده<sup>۳</sup>، دی ماریاما آوانگ داود<sup>۳</sup>

## مقاله پژوهشی

## چکیده

**مقدمه:** سالمندی، پدیده‌ای پیچیده و چند عاملی است که با کاهش تدریجی اعمال فیزیولوژیکی در اندام‌های مختلف مشخص شده و سیستم عصبی مرکزی و ناحیه‌ی هیپوکمپ به صورت قابل توجهی تحت تأثیر عوارض سالمندی نظیر آپوپتوز قرار می‌گیرند. هم‌افزایی اثرات فعالیت بدنی به همراه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی نظیر زالزالک برای محافظت از آسیب مغزی در برابر فرایند آپوپتوز ممکن است کلید مهار یا کاهش آپوپتوز سلول‌های عصبی در فرایند سالمندی باشد. لذا هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی اثر تمرین تناوبی با شدت بالا همراه با مکمل یاری عصاره‌ی زالزالک بر تغییرات شاخص‌های BAX/Bcl-2 بافت هیپوکمپ موش‌های صحرایی سالمند می‌باشد.

**روش‌ها:** در تحقیق تجربی حاضر، ۳۰ سر رت صحرایی نر نژاد ویستار با ۲۲ ماه سن به صورت تصادفی به ۵ گروه عتایی شامل: جوان، سالمند، سالمند/تمرین، سالمند/عصاره و سالمند/عصاره/تمرین تقسیم شدند. در گروه‌هایی که عصاره‌ی زالزالک استفاده می‌کنند، پس از جلسات تمرینی مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره را به صورت گاواژ دریافت می‌کردند. پروتکل تمرین تناوبی با شدت بالا به مدت شش هفته و با شدت ۸۰-۱۰۰ درصد سرعت بیشینه بود. پس از بافت‌برداری، مقادیر پروتئین‌های BAX/Bcl-2 با استفاده از روش وسترن بلات اندازه‌گیری شد. از آزمون one-way ANOVA و سپس آزمون تعقیبی Tukey برای بررسی متغیرهای پژوهش استفاده گردید.

**یافته‌ها:** نتایج پژوهش حاضر نشان داد که سالمندی سبب کاهش معنی‌داری در متغیر Bcl-2 شده و در متغیر BAX افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد ( $P = 0.001$ ). همچنین هم‌تمرین‌ناوبی با شدت بالا و هم مصرف عصاره‌ی زالزالک باعث افزایش معنی‌داری در مقادیر Bcl-2 (به ترتیب،  $P = 0.031$  و  $P = 0.011$ ) و کاهش معنی‌داری در پروتئین BAX شد (به ترتیب،  $P = 0.003$  و  $P = 0.016$ ). همچنین نتایج نشان داد که هم‌افزایی اثرات تمرین تناوبی با شدت بالا در گروه سالمند/عصاره/تمرین، به ترتیب سبب افزایش و کاهش معنی‌دار متغیرهای BAX و Bcl-2 نسبت به گروه‌های سالمند/تمرین و سالمند/عصاره می‌شود ( $P < 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج این پژوهش می‌توان اظهار داشت که هم‌افزایی اثرات مفید فعالیت بدنی از نوع تناوبی با شدت بالا به همراه مصرف عصاره‌ی زالزالک، در افزایش متغیر Bcl-2 و کاهش متغیر BAX احتمالاً می‌تواند نقش مهمی در مهار فرایند آپوپتوز در بافت هیپوکمپ موش‌های صحرایی سالمند ایفا کند و احتمالاً می‌تواند به عنوان یک راهبرد غیردارویی امیدوارکننده باشد.

**واژگان کلیدی:** سالمندی؛ آپوپتوز؛ هیپوکمپ؛ ورزش

**ارجاع:** کیانی زادگان فاطمه، رمی محمد، علیزاده علی اکبر، آوانگ داود دی ماریاما. اثر شش هفته تمرین تناوبی با شدت بالا همراه با مکمل یاری عصاره‌ی

زالزالک بر تغییرات شاخص‌های BAX/Bcl-2 بافت هیپوکمپ موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار سالمند. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۳؛

۴۲ (۷۶۹): ۴۶۲-۴۵۱.

سلول‌های زنده مشخص می‌شود که با از دست دادن یکپارچگی فیزیولوژیکی وابسته به زمان همراه است و در نهایت منجر به مرگ می‌شود (۲). در سطح سلولی، پیری با تجمع و انباشته شدن پروتئین‌های تا شده نادرست و اندامک‌های از کار افتاده، به روشی پیش‌رونده ممکن است منجر به وقفه در هموستاز سلولی شود.

## مقدمه

سازمان جهانی بهداشت (WHO (World Health Organization)، بازه‌ی زمانی سال‌های ۲۰۲۱ تا ۲۰۳۰ را به عنوان «دهه‌ی سالمندی سالم» نامگذاری کرده است (۱). پیری، یک فرایند بیولوژیکی پیچیده است که با کاهش تدریجی و مداوم در قابلیت‌های عملکردی

۱- کارشناسی ارشد، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی علوم ورزشی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- استادیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی علوم ورزشی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳- استادیار، واحد تحقیقات سلامت از طریق ورزش و زندگی فعال (HEAL)، دانشکده‌ی پزشکی و علوم بهداشتی، دانشگاه صبح مالزی و گروه علوم زیست‌پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی و علوم بهداشتی، دانشگاه صبح مالزی، جالان UMS، کوتا کینابالو، صباح، مالزی

نویسنده‌ی مسؤول: محمد رمی؛ استادیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی علوم ورزشی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

Email: m.rami@scu.ac.ir

تعداد Bax/Bcl-2 یکی از عوامل حیاتی است که تعیین می‌کند آیا سلول دچار آپوپتوز می‌شود یا خیر، و این تعادل را می‌توان در طول فرایند سالمندی تغییر داد (۱۵، ۱۶). با این حال، پروتئین‌های خانواده Bcl-2 همچنین عملکردهای غیر متعارف دیگری را اعمال می‌کنند که بر پیری سلولی، متابولیسم انرژی زیستی و هموستاز ردوکس تأثیر می‌گذارد (۱۷).

پیری سلولی که از این به بعد «پیری» نامیده می‌شود، توقف طولانی مدت ناشی از چرخه‌ی سلولی سلول‌هایی است که قبلاً تکثیر شده‌اند. پیری ممکن است راهی جایگزین برای آپوپتوز برای سرکوب رشد سلولی باشد. رابطه‌ی بین پروتئین‌های خانواده Bcl-2 و پیری دوگانه است. از یک طرف، بیان این پروتئین‌ها بر ورود به پیری تأثیر می‌گذارد. از سوی دیگر، ورود به پیری بیان این پروتئین‌ها را تعدیل می‌کند. به دلیل تغییرات در بیان پروتئین‌های خانواده Bcl-2، سلول‌های پیر در برابر آپوپتوز مقاوم‌تر هستند. ورود و نگهداری سلول‌ها در پیری به تنظیم مثبت Bcl-2 بستگی دارد، به این معنی که پیری با سطوح بالا Bcl-2 همراه است (۱۸). علاوه بر این، بیان بیش از حد Bcl-2 سلول‌های سرطانی پیری را تقویت می‌کند، مانند سلول‌های لوسمی K562. بنابراین، Bcl-2، که می‌تواند هم تحریک آپوپتوز و هم تکثیر را مهار کند، باعث ایجاد یک فنوتیپ پیری می‌شود (۱۹).

یکی از مهم‌ترین رویکردها برای به تأخیر انداختن عوارض مرتبط با افزایش سن، افزایش فعالیت بدنی (Physical activity) در بین افراد مسن است (۲۰). ورزش، اثرات چند بعدی بر عملکرد مغز از جمله فعال سازی مکانیسم‌های مربوط به انعطاف‌پذیری مغز، ارتقاء نوروزن و رگ‌زایی، افزایش ظرفیت متابولیک مغز و تقویت دفاع آنتی‌اکسیدانی اعمال می‌کند (۲۱، ۲۲). با این حال، به طور گسترده تشخیص داده شده است که دستکاری متغیرهای تمرین، به وسیله‌ی شدت تمرین که یکی از مهم‌ترین عوامل است، می‌تواند به طور قابل توجهی به بهبود عملکرد مغز و هیپوکامپ کمک کند (۲۳، ۲۴).

تمرین تناوبی با شدت بالا (HIIT) نوعی تمرین بدنی را نشان می‌دهد که با دوره‌های کوتاه و متناوب فعالیت بدنی شدید همراه با دوره‌های استراحت یا تمرین با شدت کم مشخص می‌شود (۲۵). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که HIIT می‌تواند عملکرد هیپوکامپ را بهبود بخشد و التهاب را در موش‌های مسن کاهش دهد (۲۶-۲۸).

از سوی دیگر، Shirpour و همکاران در سال ۲۰۱۷ در مطالعه‌ی خود بیان کردند که فعالیت HIIT می‌تواند اثرات متفاوتی بر آپوپتوز در موش‌های مسن داشته باشد. آن‌ها بیان کردند که فعالیت HIIT القاء آپوپتوز را به واسطه‌ی افزایش بیان ژن‌های پرو آپوپتوز Bax و

بنابراین، این فرایند احتمالاً می‌تواند سبب بروز خطر مرگ سلولی شود که پیامدهای سلولی شدیدی دارد و با اختلالات عصبی در انسان همراه است (۳).

در سیستم عصبی مرکزی (Central nervous system)، پیری طبیعی با تغییراتی در ساختار مغز مانند آتروفی ماده سفید و زوال عملکردی و شناختی همراه است (۴). زوال شناختی مرتبط با سن می‌تواند کیفیت زندگی افراد را کاهش دهد و با افزایش خطر بیماری‌های عصبی مرتبط است (۵). همواره، هر توضیح یا توصیفی از پیری مغز با در نظر گرفتن ناحیه هیپوکامپ می‌باشد. این ناحیه از مغز برای ذخیره و بازیابی انواع خاصی از اطلاعات بسیار مهم است و اغلب به عنوان یک ساختار میانجی کلیدی در مطالعاتی که پاتوفیزیولوژی حافظه اختلال را بررسی می‌کنند، شناسایی می‌شود (۲، ۶).

افزایش سن منجر به تغییرات عملکردی در هیپوکامپ می‌شود که نقشی اساسی در یادگیری و حافظه ایفا می‌کند و در نتیجه باعث اختلال در عملکردهای شناختی می‌شود. نورون‌های تازه تولید شده در شکنج دندانه‌دار هیپوکامپ باعث بهبود یا حفظ عملکردهای یادگیری و حافظه می‌شوند (۷). نوروزن در هیپوکامپ بالغ به دلیل عوامل مختلفی مانند افزایش سن، تابش و استرس کاهش می‌یابد. به طور خاص، افزایش سن، یک عامل قوی است که باعث کاهش نوروزن می‌شود. بیان شده است که کاهش نوروزن مرتبط با سن به دلیل کاهش تحریک نوروتروفیک است (۸).

مغز در ابتدا حاوی مقدار زیادی نورون است و اندازه‌ی جمعیت نورون تنها بعداً با مرگ سلولی آپوپتوز تنظیم می‌شود. بازیگران کلیدی در فرایند آپوپتوز اعضای خانواده‌ی لئوم سلول (BCL-2) Bcl-2 هستند (۹). آپوپتوز در مرگ سلول‌های عصبی در طول پیری طبیعی (۱۰) و همچنین در بیماری‌های نورودژنراتیو مرتبط با سن (۱۱، ۱۲) نقش دارد و همانطور که گفته شد، خانواده‌ی پروتئین‌های Bcl-2 نقش مهمی در تنظیم آپوپتوز در سیستم عصبی دارند (۱۳).

مرگ سلولی وابسته به میتوکندری توسط عوامل داخلی، به ویژه در میتوکندری، که محل عمل اصلی پروتئین‌های تنظیم‌کننده‌ی آپوپتوز مانند خانواده‌ی Bcl-2 است، انجام می‌شود (۱۳). فرایند آپوپتوز معمولاً توسط مخالف خانواده‌ی Bcl-2، از جمله اعضای خانواده‌ی طرفدار آپوپتوز در مقابل آنتی‌آپوپتوز کنترل می‌شود. Bcl-2 یک پروتئین ضد آپوپتوز است که از آزاد شدن سیتوکروم c جلوگیری می‌کند، در حالی که پروتئین‌های Bax و Bad، پروآپوپتوز و آزادسازی سیتوکروم c را از میتوکندری به داخل سیتوزول، که مسئول فعال کردن کاسپاز-۹ و کاسپاز-۳ است، افزایش می‌دهند و فرایند آپوپتوز را تسهیل می‌کنند (۱۴).

## روش‌ها

## حیوانات و شرایط نگهداری

پژوهش حاضر از نوع نیمه تجربی با طرح پس‌آزمون با گروه شاهد است که به شیوه‌ی آزمایشگاهی انجام شد. در این پژوهش، ۳۰ سررت صحرایی نر نژاد ویستار با ۲۲ ماه سن به عنوان نمونه‌ی تحقیق از مرکز نگهداری حیوانات دانشکده‌ی دام‌پزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز تهیه شد و پس از آشنا سازی با محیط آزمایشگاه به صورت تصادفی به ۵ گروه تقسیم شد. گروه‌های تحقیق شامل: گروه‌های جوان، سالمند، سالمند/تمرین، سالمند/عصاره و سالمند/عصاره/تمرین است. در گروه‌هایی که عصاره‌ی زالزالک استفاده کردند، موش‌های صحرایی پس از جلسات تمرینی، مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره به صورت گاواژ دریافت می‌کردند (۳۷). گروه سالمند/عصاره همانند گروه سالمند/عصاره/تمرین و در همان زمان عصاره دریافت می‌کردند. موش‌های صحرایی در گروه‌های تایی در محیطی با میانگین دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد، و چرخه‌ی روشنایی-تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت در قفس‌های مخصوص از جنس پلی‌کربنات نگهداری می‌شدند. تمامی حیوانات به آب و غذای ویژه‌ی رت دسترسی آزاد داشتند. غذای موش‌های صحرایی از شرکت خوراک دام پارس تهیه شد. در تمام مراحل پژوهش، موش‌های صحرایی توسط یک نفر جابه‌جا و دستکاری شده و آب مورد نیاز حیوانات به صورت آزاد در اختیار آن‌ها قرار داده می‌شد. تمامی مراحل تحقیق حاضر به تصویب کمیته‌ی اخلاق در پژوهش دانشگاه شهید چمران اهواز رسید و با شناسه‌ی EE/1401.2.24.222441/scu.ac.ir به ثبت رسید.

## تهیه‌ی عصاره زالزالک

تهیه‌ی عصاره زالزالک بر اساس مطالعات پیشین با اندکی تغییر انجام شد (۳۶، ۳۸). توت‌های (میوه‌های) زالزالک از ارتفاعات غرب ایران جمع‌آوری و در دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز مورد بررسی و تأیید قرار گرفت. میوه‌های تازه به صورت خمیر تبدیل شد و در دمای ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد توسط گردش هوا خشک گردید و پس از آسیاب شدن با آب مقطر مخلوط شد. به میوه‌های درون بطری مقداری آب اضافه شد تا به صورت کامل سطح آن را بپوشاند. سپس به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد در اتاق تاریک نگهداری شد. در مرحله‌ی بعد، عصاره سانتریفیوژ شده و مایع رویی حاصل از آن فیلتر گردید. سپس عصاره‌ی صاف شده تغلیظ و در دمای ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد خشک و در یخچال نگهداری شد. ماده‌ی خشک شده در ۹/۰ درصد با  $\text{pH} = 7/4$  حل شد تا عصاره‌ی ۵mg/mL حاصل شود. به رت‌ها در گروه‌های شاهد و تمرینی، مکمل زالزالک ۱۰۰mg/kg و وزن بدن

Caspase-3 افزایش داده، با این حال، اثر معنی‌داری بر بیان ژن ضد آپوپتوز Bcl-2 نداشته است (۲۹).

Novoa و همکاران نیز در سال ۲۰۱۷ بیان کردند که فعالیت HIIT به واسطه‌ی اثرات افزایشی بر میزان استرس اکسیداتیو سبب افزایش بروز آپوپتوز می‌شود (۳۰). با این حال، تحقیقات نوظهور به بررسی تأثیر انواع فعالیت بدنی با شدت‌های مختلف بر روند پیری پرداخته و پتانسیل آن را برای مقابله با جنبه‌های منفی که معمولاً با افزایش سن همراه می‌باشد، آشکار کرده است.

در میان روش‌های مختلف تمرین، تمرینات HIIT به عنوان یک رویکرد مؤثر ظاهر شده است. نشان داده شده که این شکل از تمرین با فعال کردن مسیرهای سیگنالی که نوروزن را ارتقا و تولید فاکتورهای رشد را افزایش می‌دهند، با اثرات مضر پیری مبارزه می‌کند، در نتیجه عملکرد آنتی‌اکسیدانی را افزایش داده و فعالیت‌های التهابی در بدن را کاهش می‌دهد (۳۱). با این وجود، یک راه جذاب در حوزه‌ی فیزیولوژی ورزش، ادغام مداخلات تغذیه‌ای طبیعی در کنار فعالیت بدنی است. این رویکرد کل‌نگر، نوپدیش ابداع استراتژی‌های ورزشی بسیار مؤثر متناسب با نیازهای جمعیت سالمند است (۳۲).

از سوی دیگر، فرآورده‌های طبیعی و عصاره‌های گیاهی به مکمل‌های معروفی برای پیشگیری از بیماری‌های مختلف تبدیل شده‌اند (۳۳). در مورد مداخلات تغذیه‌ای، استفاده از گیاهان دارویی، تأثیر قابل توجهی در پیری از خود نشان داده است که یکی از این گیاهان، زالزالک (*Crataegus spp*) است (۳۴).

زالزالک، حاوی پروآنتوسیانیدین‌های الیگومریک، فلاونوئیدها و پلی‌فنول‌ها است که به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی قوی خود شناخته شده‌اند (۳۵). نتایج مطالعات گذشته نشان داده است که عصاره‌ی گیاه زالزالک می‌تواند به خوبی از مغز در برابر ایسکمی خورنسائی مجدد محافظت کند که ممکن است به خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن نسبت داده شود (۳۵، ۳۶).

با توجه به اثرات ضد التهابی و محافظت‌کننده‌ی عصبی ورزش و زالزالک، در این مطالعه، اثرات تجویز ترکیبی این دو عامل بر فرایند مرگ سلولی به دنبال پیری در موش‌های صحرایی سالمند مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس دانش ما، مطالعه‌ای در خصوص اثر عصاره‌ی زالزالک بر فرایند سالمندی و تأثیرپذیری پروتئین‌های BAX و Bcl-2 از این مکمل به همراه فعالیت HIIT یافت نشد. لذا هدف از مطالعه‌ی حاضر، ارزیابی اثرات ترکیب تمرین تناوبی با شدت بالا و عصاره‌ی زالزالک بر محتوای پروتئین‌های مرتبط با فرایند آپوپتوز BAX و Bcl-2 بافت هیپوکمپ موش‌های صحرایی سالمند بود.

عصاره پس از هر جلسه تمرینی گاوژ شد. مطالعات قبلی اثربخشی این دوز را نشان داده‌اند (۳۶، ۳۷، ۳۹).

### پروتکل تمرینی

در ابتدای برنامه‌ی تمرینی، تمامی موش‌های صحرائی به مدت ۱۴ روز و هر روز ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۵ متر بر دقیقه با شرایط فعالیت بر روی تردمیل آشنا شدند. در مرحله‌ی بعد، موش‌های صحرائی، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه آشناسازی، تحت آزمایش تمرین فزاینده قرار گرفتند. این آزمون با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه شروع شده و سپس سرعت تردمیل به طور خودکار هر ۳ دقیقه ۳ متر در دقیقه تا زمان رسیدن به واماندگی افزایش یافت. برنامه‌ی تمرین ورزشی بر اساس بیشینه‌ی سرعت دویدن تدوین شد که به صورت پنج جلسه در هفته به مدت ۶ هفته انجام گرفت. پروتکل تمرین HIIT در هفته‌ی اول شامل دویدن روی تردمیل با تعداد تکرار ۵

تناوب ۲ دقیقه‌ای با شدت ۸۰ درصد سرعت بیشینه بود. هر تناوب با ۲ دقیقه استراحت فعال با ۶۰ درصد سرعت بیشینه همراه بود. برنامه‌ی تمرینی در هفته‌ی دوم به صورت ۶ تناوب ۲ دقیقه‌ای با شدت ۸۰ درصد سرعت بیشینه تنظیم شد. هر تناوب با ۲ دقیقه استراحت فعال با ۶۰ درصد سرعت بیشینه همراه بود. برنامه‌ی تمرینی در هفته‌ی سوم شامل ۷ تناوب ۲ دقیقه‌ای با شدت ۹۰ درصد سرعت بیشینه بوده و هر تناوب با ۲ دقیقه استراحت فعال با ۵۰ درصد سرعت بیشینه همراه بود. برنامه‌ی تمرینی در هفته‌ی چهارم، پنجم و ششم به صورت ۸ تناوب ۲ دقیقه‌ای با شدت ۱۰۰ درصد سرعت بیشینه تنظیم شد. هر تناوب با ۲ دقیقه استراحت فعال با ۵۰ درصد سرعت بیشینه همراه بود (۴۰). در ابتدا و انتهای هر جلسه، ۱ دقیقه گرم کردن و سرد کردن با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه انجام می‌شد.

جدول ۱: پروتکل تمرین تناوبی شدید در هفته‌های مختلف

هفته	شیب	تعداد جلسات در هفته	تعداد تناوب	زمان هر تناوب شدید (دقیقه)	سرعت در تناوب شدید (درصد بیشینه)	زمان هر تناوب استراحت (دقیقه)	سرعت در تناوب استراحت (درصد بیشینه)	زمان کل تمرین (دقیقه)
۱	۰	۵	۵	۲	۸۰	۲	۶۰	۱۸
۲	۰	۵	۶	۲	۸۰	۲	۶۰	۲۲
۳	۰	۵	۷	۲	۹۰	۲	۵۰	۲۶
۴	۰	۵	۸	۲	۱۰۰	۲	۵۰	۳۰
۵	۰	۵	۸	۲	۱۰۰	۲	۵۰	۳۰
۶	۰	۵	۸	۲	۱۰۰	۲	۵۰	۳۰

جدول ۲: نتایج آزمون one-way ANOVA برای متغیر Bcl-2

متغیر	df	F	P
Bcl-2	۳	۲۳۷/۴۷۹	۰/۰۰۱*

\*: سطح معنی‌داری  $P < 0/05$

استفاده از روش وسترن بلات اندازه‌گیری شد. مشخصات آنتی‌بادی‌ها در زیر آورده شده است.

Bcl-2 (C-2): sc-7382 (SANTA CRUZ)  
Bax (B-9): sc-7480 (SANTA CRUZ)  
mouse anti-rabbit IgG-HRP: sc-2357 (SANTA CRUZ)  
GAPDH (14C10) Rabbit mAb (CELL SIGNALING TECHNOLOGY)

روش کار وسترن بلات

### یافت‌برداری

در پایان هفته‌ی ششم و ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه‌ی تمرینی، رت‌ها با تزریق درون صفاقی ترکیب کتامین ۸۰ و زایلازین ۱۰ میلی‌گرم بیهوش شدند. سپس در شرایط استریل بافت هیپوکمپ جدا شده و بلافاصله به فریزر منفی ۷۰ (مدل FD-2-93-AM) شرکت ایران ماداس) انتقال داده شد. سپس محتوای پروتئین‌ها با

از آزمون one-way ANOVA و سپس آزمون تعقیبی Tukey استفاده گردید. معنی‌داری در سطح  $P \leq 0/05$  بود. داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ (version 25, IBM Corporation, Armonk, NY) آنالیز شدند.

این مطالعه با کد دانشگاه شهید چمران اهواز با کد اخلاق EE/1401.2.24.222441/scu.ac.ir و با استفاده از گزنت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به شماره SCU.SS1400.266 انجام گرفته است.

### یافته‌ها

نتایج آزمون one-way ANOVA در پژوهش حاضر نشان داد که سالمندی، سبب کاهش معنی‌داری در متغیر Bcl-2 شده و در متغیر BAX افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد ( $P = 0/001$ ) (جدول ۲ و ۳). همچنین نتایج آزمون تعقیبی Tukey در تحقیق حاضر نشان داد که هم تمرین تناوبی با شدت بالا و هم مصرف عصاره‌ی زالزالک باعث افزایش معنی‌داری در مقادیر Bcl-2 (به ترتیب،  $P = 0/031$  و  $P = 0/011$ ) و کاهش معنی‌داری در پروتئین BAX شد (به ترتیب،  $P = 0/003$  و  $P = 0/016$ ). همچنین نتایج تحقیق حاضر نشان داد که هم‌افزایی اثرات تمرین تناوبی با شدت بالا در گروه سالمند/عصاره‌تمرین، به ترتیب سبب افزایش و کاهش معنی‌دار متغیرهای Bcl-2 و BAX نسبت به گروه‌های سالمند/تمرین و سالمند/عصاره می‌شود ( $P < 0/05$ ). همچنین در متغیرهای Bcl-2 و BAX تفاوت بین سالمند/تمرین و سالمند/عصاره (به ترتیب،  $0/261$  و  $P = 0/133$ ) معنی‌دار نبود. در شکل ۱ و ۳، باندهای وسترن بلات پروتئین‌های Bcl-2 و BAX در بافت هیپوکامپ موش‌های صحرائی در گروه‌های مختلف نشان داده شده است. در این پژوهش از پروتئین GAPDH به عنوان کالیبراتور استفاده شده است. برای کمی‌سازی باندها، دانسیته‌ی آن‌ها توسط نرم‌افزار دستگاه اسکنر JS2000 محاسبه شد (اشکال ۱-۴).

جدول ۳: نتایج آزمون one-way ANOVA برای متغیر BAX

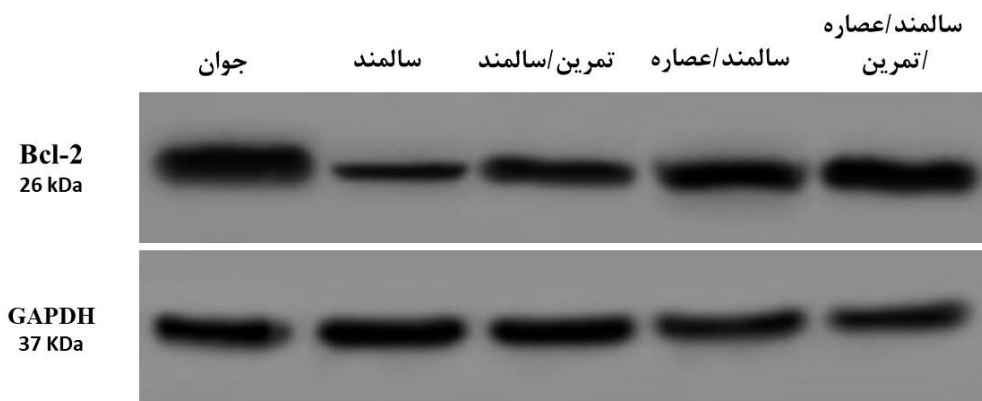
متغیر	df	F	P
BAX	۳	۱۸۱/۵۰۹	۰/۰۰۱*

\*: سطح معنی‌داری  $P < 0/05$

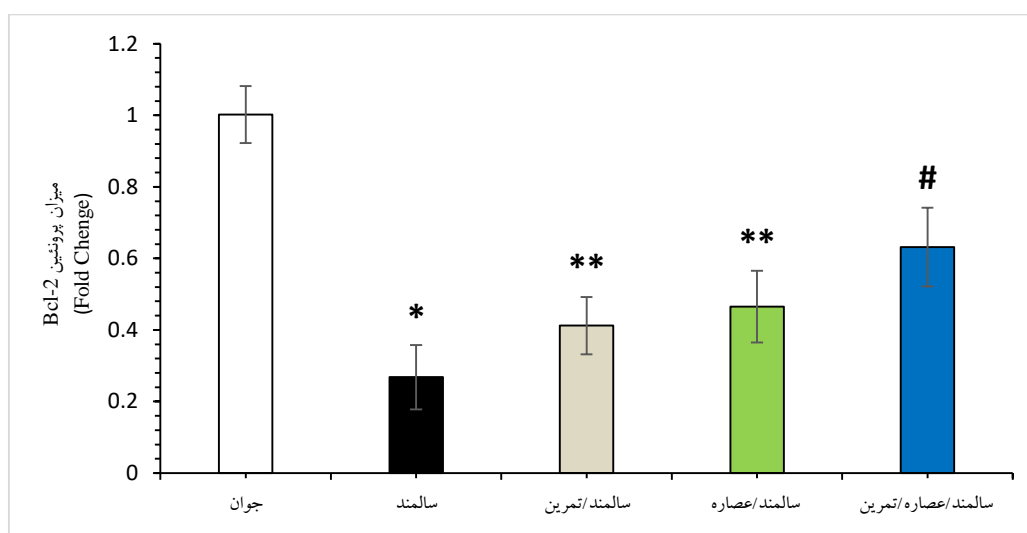
بررسی سطوح بیان پروتئین‌های BAX و Bcl-2 با استفاده از روش وسترن بلا انجام گرفت. در ابتدا به ازای هر ۲۰۰ میلی‌گرم بافت ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده‌ی سرد (لایزیس بافر شامل: Tris-Hcl (۰/۳) گرم، ۵۰ میلی‌مول در لیتر)، تریتون X-100 (۰/۰۲) گرم، ۰/۱ در صد، کلسیم دی‌اکسید سدیم (۰/۰۵) گرم، ۰/۲۵ در صد، NaCl (۰/۴۳) گرم، ۱۵۰ میلی‌مول در لیتر، SDS (۰/۰۲) گرم، ۰/۱ در صد، اسید اتیلن دی‌آمینترا ستیک (EDTA، ۵/۸۴ گرم) که در ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر و در  $pH = 7/4$  مخلوط شد) به نمونه‌های بافت هیپوکامپ افزوده و با ۲۵۰۰۰ دور در دقیقه با دستگاه هموژنایزر هموژن شدند (Speed Mill plus, analytikjena, آلمان).

در مرحله‌ی بعد، پس از ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدن نمونه‌ها با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه و انتقال مایع رویی به میکروتیوپ جدید، از یک قرص مهارکننده‌ی پروتئاز به ازای هر ۱۰ میلی‌لیتر (۱۰X) استفاده شد. در مرحله‌ی بعد با استفاده از کیت براد فورد غلظت سوپرناتانت به دست آمده مورد بررسی قرار گرفت. سپس نمونه‌ها با نسبت یک به یک (بر اساس برآورد غلظت با روش برادفورد) با بافر نمونه 2X (Loading Buffer) مخلوط و ۵ دقیقه جوشانده شدند تا ساختارهای مولکولی پروتئینی‌ها حالت خطی پیدا کنند. بخارات ایجاد شده در این حالت با ۵ ثانیه ورتکس سریع و قرار دادن نمونه در یخ از بین می‌رود. در این مرحله، نمونه‌ها در چاهک‌های الکتروفورز که حاوی ژل SDS-PAGE است ریخته شده و سپس فرایند الکتروفورز با ولتاژ ۶۰ V به مدت ۱۵ دقیقه و در ادامه با ولتاژ ۱۰۰ V به مدت ۶۰ دقیقه انجام گرفت. سپس در فرایند انتقال پروتئین‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با ولتاژ ۶۰ V، در مدت زمان ۱۰۵ دقیقه و در درون بافر انتقال، بر روی کاغذ نیترو سلولوز منتقل شدند. در مرحله‌ی بعد با آنتی‌بادی‌های اولیه و ثانویه مورد آزمایش قرار گرفتند (رقت ۱/۲۰۰۰ تا ۱/۵۰۰۰ در بافر PBS). سپس کاغذها درون کاست محافظ پلاستیکی حاوی فیلم حساس قرار داده می‌شدند و در دستگاه پردازشگر X-RAY (China LD-14) و با استفاده از کیت ECL ظهور باندها انجام می‌شد. سپس دانسیته‌ی باندهای پروتئینی با استفاده از نرم‌افزار JS2000 مورد بررسی قرار گرفت.

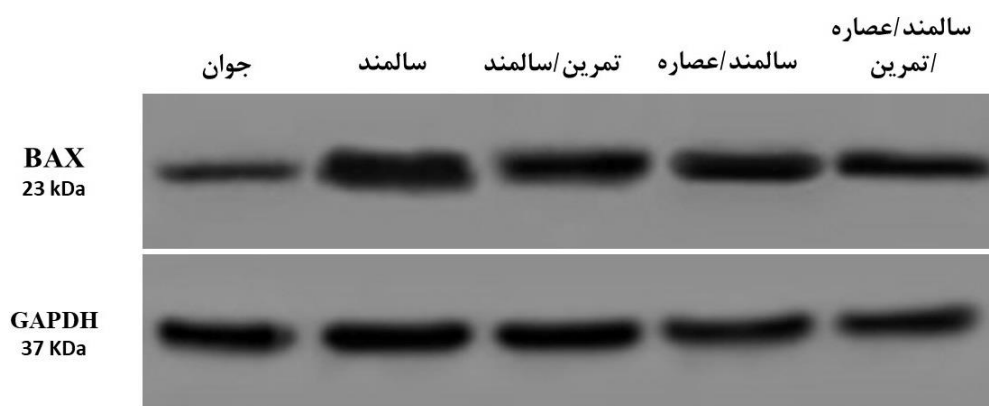
طبیعی بودن داده‌ها با آزمون Shapiro-Wilk و هم‌گنی واریانس‌ها با آزمون Leven بررسی شد. در بررسی متغیرهای پژوهش



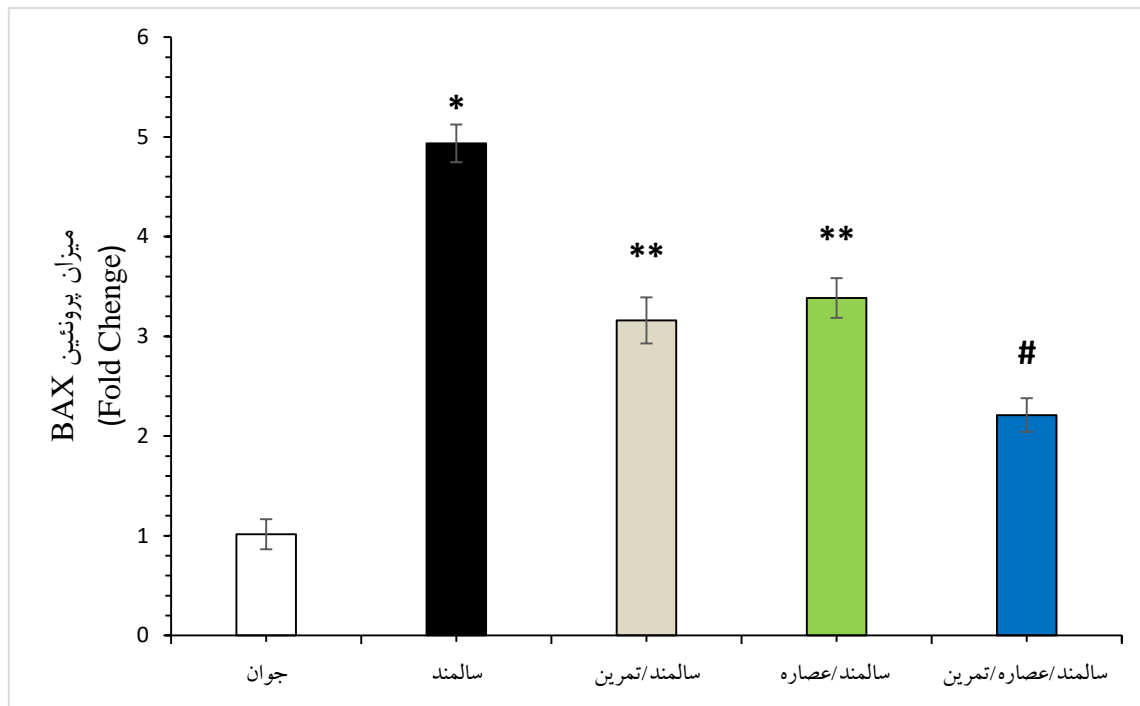
شکل ۱: باندهای وسترن بلات پروتئین Bcl-2



شکل ۲: تغییرات نسبی پروتئین Bcl-2 در گروه‌های مختلف تمرینی. \*: نشانه‌ی تفاوت معنی‌دار با گروه جوان. \*\*: نشانه‌ی تفاوت معنی‌دار با گروه سالمند، #: نشانه تفاوت معنی‌دار با سایر گروه‌ها؛ ( $P < 0/05$ ).



شکل ۳: باندهای وسترن بلات پروتئین BAX



شکل ۴: تغییرات نسبی پروتئین Bax در گروه‌های مختلف تمرینی. #: نشانه‌ی تفاوت معنی‌دار با گروه جوان، \*\*: نشانه‌ی تفاوت معنی‌دار با گروه سالمند، #: نشانه‌ی تفاوت معنی‌دار با سایر گروه‌ها؛ ( $P < 0/05$ ).

می‌کند. اگرچه آپوپتوز با جلوگیری از رشد بیش از حد سلول‌های گرانول، نقش مهمی در شکست دندان‌دار بزرگسالان ایفا می‌کند، آپوپتوز عصبی در قشر و هیپوکامپ یادگیری و حافظه را تغییر می‌دهد و آپوپتوز عصبی بیش از حد در هیپوکامپ به اختلال عملکرد سیستم عصبی منجر می‌شود (۴۲).

بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که آپوپتوز ممکن است به از بین رفتن سلول‌های عصبی کمک کند و به عنوان یک پیش‌بینی کننده‌ی پیامدهای نامطلوب در افراد مبتلا به بیماری‌های نورودژنراتیو مرتبط با سن در نظر گرفته می‌شود (۴۳، ۴۴). در مقابل، در متغیر Bax، بر اساس نتایج تحقیق ما، میزان این پروتئین در موش‌های صحرایی گروه سالمند/تمرین نسبت به گروه کنترل سالمند کاهش معنی‌داری پیدا کرده است. همچنین میزان پروتئین Bcl-2 در موش‌های صحرایی گروه تمرین/سالمند نسبت به گروه کنترل سالمند افزایش معنی‌داری را نشان داد.

در همین راستا، Soori و همکاران در سال ۲۰۲۰ در پژوهش خود بیان کردند که، تمرین ورزشی پتانسیل کاهش آپوپتوز را از طریق افزایش تنظیم پروتئین‌های محافظ حساس به استرس دارد (۴۵). Song و همکاران در سال ۲۰۰۶ بیان کردند که، گرچه افزایش سن نسبت Bax/Bcl-2 را در عضله‌ی اسکلتی افزایش داد، اما دوازده هفته تمرین ورزشی روی ترمیم منجر به کاهش قابل توجه پروتئین پرو

## بحث

پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر یک دوره تمرین HIIT همراه با مکمل یاری عصاره‌ی زالزالک بر تغییرات پروتئین‌های Bax/Bcl-2 بافت هیپوکامپ موش‌های صحرایی سالمند انجام شد. در متغیر Bcl-2، بر اساس نتایج تحقیق ما، میزان این پروتئین در موش‌های صحرایی سالمند نسبت به گروه جوان کاهش معنی‌داری پیدا کرد. اما در متغیر Bax، میزان این پروتئین در موش‌های صحرایی سالمند نسبت به گروه جوان، افزایش معنی‌داری داشت. این نتایج توسط Barriuso و همکاران در سال ۲۰۲۳، حمایت می‌شود. آن‌ها بیان کردند که پروتئین‌های خانواده‌ی Bcl-2 بر تنظیم پیری سلولی تأثیر می‌گذارند. آن‌ها در تحقیق خود نتیجه گرفتند که بیان Bcl-2 در موش‌های مسن نسبت به گروه جوان به طور قابل توجهی کاهش داشت، در حالی که بیان Bax به طور قابل توجهی در موش‌های مسن افزایش یافته است (۱۹).

اعضای پروتئین‌های خانواده‌ی B لنفوم سلول ۲ (Bcl-2) به عنوان تنظیم‌کننده‌ی اصلی مسیر آپوپتوز ذاتی شناخته شده‌اند. پروتئین‌های ضد آپوپتوز از تحریک آپوپتوز جلوگیری می‌کنند، در حالی که پروتئین‌های پروآپوپتوز از القای مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلولی حمایت می‌کنند (۴۱). تعادل بین اعضای خانواده‌ی پروآپوپتوز و ضد آپوپتوز Bcl-2 پاسخ میتوکندری به محرک‌های آپوپتوز را تعیین

دریافتی روزانه را تغییر دهد، فراهمی زیستی و طول عمر را کاهش دهد و در نهایت منجر به مرگ سلولی یا آپوپتوز شود (۴۸).

افزایش آپوپتوز منجر به بیماری‌های عفونی، بیماری‌های خودایمنی و بیماری‌های عصبی می‌شود (۴۹). مشخص شده است که فعالیت بدنی منجر به پاسخ‌های تطبیقی از جمله تضعیف افزایش تولید ROS، پراکسیداسیون لیپیدی، عوامل التهابی و سایر عوامل مضر مرتبط با سن می‌شود (۵۰). فعالیت با شدت بالا بر تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و حذف آن‌ها توسط مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی تأثیر می‌گذارد. گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مسیرهای آپوپتوز خاصی را تحت تأثیر قرار می‌دهند و باعث دیپلاریزاسیون لایه بیرونی غشای میتوکندری می‌شوند (۲۹).

در مطالعه دیگری، ورزش شدید منجر به آپوپتوز در هیپوکامپ از طریق کانال‌های کلسیم شد (۵۱). از سوی دیگر، در تناقض با نتایج تحقیق حاضر، Shirpour و همکاران در سال ۲۰۱۷ در مطالعه خود بیان کردند که فعالیت HIIT می‌تواند اثرات متفاوتی بر فرایند آپوپتوز در موش‌های صحرایی مسن داشته باشد. آن‌ها بیان کردند که فعالیت بدنی با شدت بالا القاء آپوپتوز را به واسطه‌ی افزایش بیان ژن‌های پرو آپوپتوز Bax و Caspase-3 افزایش داده، با این حال، اثر معنی‌داری بر بیان ژن ضد آپوپتوز Bcl-2 نداشته است (۲۹). فعالیت بدنی یک استرس فیزیولوژیکی است که بر غلظت سیتوکین‌ها، فاکتورهای رشد و وضعیت اکسیداتیو تأثیر می‌گذارد. همه‌ی این عوامل به عنوان عوامل بالقوه برای تسریع مرگ سلولی یا افزایش طول عمر سلول شناخته می‌شوند. سیگنال‌های آپوپتوز وابسته به فعالیت بدنی به شدت به مدت زمان تمرین بستگی دارد که بر تعادل بین عوامل پیش‌التهابی و عوامل محافظ سلول‌ها تأثیر می‌گذارد (۵۲).

در بسیاری از گزارش‌ها پیشنهاد شده است که ورزش‌های متوسط یا هوازی اثرات سازنده و مفیدی را در حالت‌های پاتولوژیک یا پیری نشان می‌دهند (۴۳). از آن‌جا که برخی مطالعات عنوان کرده‌اند که فعالیت با شدت بالا سبب افزایش ROS می‌شود (۵۳)، شاید بتوان گفت که مصرف عصاره‌ی گیاهانی مانند زالزالک، با اثرات آنتی‌اکسیدانی قوی اثبات شده، بتواند عاملی مهم جهت خنثی‌سازی افزایش ROS ناشی از تمرینات شدید باشد. به هر حال، به دلیل وجود مطالعات متناقض، این مسأله نیاز به مطالعه بیشتر دارد. نتایج تحقیق حاضر تنها بخشی از فعل و انفعالات سلولی و مولکولی در بافت هیپوکامپ موش‌های صحرایی سالمند و اثرات فعالیت بدنی تناوبی با شدت بالا و مکمل یاری عصاره‌ی زالزالک را به تصویر کشیده است. این مطالعه یک دستاورد قاطع، محکم و جامع در مورد رویدادهای ناشی از ورزش و اثرات آن بر نمونه‌های سالمند نیست. با این حال آنچه مسلم است بر سر سی تأثیر تمرینات ورزشی شدید بر

آپوپتوتیک Bax و افزایش بیان پروتئین Bcl-2 در عضله‌ی اسکلتی موش‌های صحرایی مسن شد (۴۶).

در متغیر Bcl-2، بر اساس نتایج تحقیق ما، میزان این پروتئین در موش‌های صحرایی گروه سالمند/عصاره نسبت به گروه سالمند، افزایش معنی‌داری پیدا کرده است. Tan و همکاران در سال ۲۰۱۴، در مطالعه‌ی خود به بررسی اثر درمانی و مکانیسم تام فلاون برگ زالزالک بر موش‌های صحرایی صحرایی ایسکمی مزمن مغزی با استفاده از بستن دو طرفه شریان کاروتید دائمی پرداختند. آن‌ها بیان کردند که با افزایش سن جمعیت، بروز بیماری‌های عروق مغزی سال به سال افزایش می‌یابد. بیماری عروق مغزی اغلب باعث اختلال در عملکرد عصب مغز می‌شود و آپوپتوز سلول‌های عصبی عامل مهم اختلال عملکرد اعصاب مغزی است. از همین رو، کلید درمان ایسکمی در مهار یا کاهش آپوپتوز سلول‌های عصبی آسیب دیده است (۴۷). نتایج این مطالعه نشان داد، به دلیل ایسکمی و هیپوکسی بافت مغز، بیان پروتئین Bcl-2 محدود شد و c-fos بیش از حد بیان گردید، ایسکمی همچنین می‌تواند مقدار زیادی Ca<sup>2+</sup> را وارد کند و باعث اضافه بار Ca<sup>2+</sup> در سلول‌های عصبی شود، در نتیجه آپوپتوز سلول عصبی تسریع می‌گردد. استفاده از فلاون برگ زالزالک به وضوح می‌تواند بیان پروتئین Bcl-2 را در بافت مغز ایسکمی افزایش دهد، زیرا Bcl-2 پروتئینی است که اثر مهاری بر آپوپتوز سلولی دارد، که می‌تواند از انتقال Bax از سیتوپلاسم به غشای میتوکندری جلوگیری کند، در واقع، توتال فلاون برگ زالزالک که یک فلاونوئید استخراج شده از برگ زالزالک است و می‌تواند با اثر خود، چربی را کاهش دهد و ظرفیت آنتی‌اکسیدان را بهبود بخشد (۴۷).

بر اساس نتایج تحقیق حاضر، دو متغیر Bcl-2 و Bax، در رت‌های گروه سالمند/عصاره/تمرین نسبت به گروه سالمند/تمرین و نسبت به گروه سالمند/عصاره به ترتیب افزایش و کاهش معنی‌داری را نشان داده است. با توجه به دانش ما، مطالعه‌ی مستقیمی روی این موضوع یافت نشده است. اما احتمالاً اثر تعاملی و هم‌افزایی فعالیت بدنی در قالب تمرینات HIIT در کنار مصرف مکمل زالزالک باعث تعدیل نسبت این دو متغیر نسبت به یکدیگر شده و در واقع ما شاهد افزایش‌های بیشتر در پروتئین Bcl-2 در گروه سالمند/عصاره/تمرین نسبت به گروه‌های سالمند/تمرین و سالمند/عصاره به تنهایی و نسبت به گروه کنترل سالمند بودیم و از سوی دیگر شاهد کاهش‌های بیشتر در پروتئین BAX در گروه سالمند/عصاره/تمرین نسبت به گروه‌های تمرین/سالمند و سالمند/عصاره به تنهایی و نسبت به گروه کنترل سالمند بودیم. علت زمینه‌ای بیماری‌های مرتبط با سن می‌تواند افزایش آسیب اکسیداتیو به DNA باشد. افزایش آسیب DNA می‌تواند پیری را تسریع کند، سرعت متابولیسم را کاهش دهد، کالری



مثبتی بر جلوگیری از پیشرفت فرایند تخریب عصب و مرگ سلولی ایفا کند و می‌تواند به عنوان یک جایگزین مناسب برای درمان‌های دارویی و کنترل عوارض ناشی از فرایند افزایش سن امیدوارکننده باشد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته‌ی فیزیولوژی ورزشی می‌باشد که با حمایت مالی/اعتبار پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به شماره EE/1401.2.24.222441/scu.ac.ir به انجام رسیده است. بدین‌وسیله از زحمات و پشتیبانی‌های معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز و گروه فیزیولوژی ورزشی دانشگاه علوم ورزشی دانشگاه شهید چمران اهواز تقدیر و تشکر می‌شود.

روی نمونه‌های سالمند نیاز به تحقیقات بیشتری دارد. با شناسایی سایر عوامل دخیل در هموستاز سیستم عصبی مرکزی، محققان می‌توانند به یک استراتژی غیردارویی و پایدار برای کمک به این جامعه در حال توسعه دست یابند.

### نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر می‌توان گفت تلفیق مکمل عصاره‌ی زالزالک و تمرین تناوبی با شدت بالا می‌تواند مقادیر پروتئین‌های مرتبط با آپوپتوز (BAX و Bcl-2) را در رت‌های مسن را تعدیل و تنظیم کند. لذا، احتمالاً می‌توان عنوان کرد که فعالیت بدنی به خصوص از نوع HIIT همراه با مصرف مکمل‌هایی با خاصیت ضدالتهابی و ضداکسایشی قوی مانند عصاره‌ی زالزالک می‌تواند اثرات

### References

- Carver L. Biohacking and aging technology—a primer. 1<sup>st</sup> Ed. In: An interdisciplinary approach to aging, biohacking and technology. London, UK: Routledge; 2024. p. 6-23.
- Fuso A. Aging and disease: the epigenetic bridge. Epigenetics in Human Disease: Elsevier; 2024. p. 1177-218.
- Amirzodi M, Mehrabi A, Rajizadeh MA, Bejeshk MA, Esmaeilpour K, Daryanoosh F, et al. The effects of combined resveratrol and high intensity interval training on the hippocampus in aged male rats: an investigation into some signaling pathways related to mitochondria. Iran J Basic Med Sci 2022; 25(2): 254-62.
- Blinkouskaya Y, Caçoilo A, Gollamudi T, Jalalian S, Weickenmeier J. Brain aging mechanisms with mechanical manifestations. Mech Ageing Dev 2021; 200: 111575.
- Kim JH, Liu QF, Urnuhsaikhon E, Jeong HJ, Jeon MY, Jeon S. Moderate-intensity exercise induces neurogenesis and improves cognition in old mice by upregulating hippocampal hippocalcin, tub1, and spectrin- $\alpha$ . Mol Neurobiol 2019;56:3069-78.
- Miller D, O'callaghan J. Aging, stress and the hippocampus. Ageing Res Rev 2005; 4(2): 123-40.
- Cao L, Jiao X, Zuzga DS, Liu Y, Fong DM, Young D, et al. VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. Nat Genet 2004; 36(8): 827-35.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. J Neurosci 1996; 16(6): 2027-33.
- Schroer J, Warm D, De Rosa F, Luhmann HJ, Sinning A. Activity-dependent regulation of the BAX/BCL-2 pathway protects cortical neurons from apoptotic death during early development. Cell Mol Life Sci 2023; 80(6): 175.
- Pollack M, Phaneuf S, Dirks A, Leeuwenburgh C. The role of apoptosis in the normal aging brain, skeletal muscle, and heart. Ann N Y Acad Sci 2002; 959: 93-107.
- Perry VH. The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. Brain Behav Immun 2004; 18(5): 407-13.
- Mattson MP, Magnus T. Ageing and neuronal vulnerability. Nat Rev Neurosci 2006; 7(4): 278-94.
- Pemberton JM, Pogmore JP, Andrews DW. Neuronal cell life, death, and axonal degeneration as regulated by the BCL-2 family proteins. Cell Death Differ 2021; 28(1): 108-22.
- Huang C-Y, Kuo W-W, Liao H-E, Lin Y-M, Kuo C-H, Tsai F-J, et al. Lumbrokinase attenuates side-stream-smoke-induced apoptosis and autophagy in young hamster hippocampus: correlated with eNOS induction and NF $\kappa$ B/iNOS/COX-2 signaling suppression. Chem Res Toxicol 2013; 26(5): 654-61.
- Almeida O, Conde G, Crochemore C, Demeneix B, Fischer D, Hassan A, et al. Subtle shifts in the ratio between pro-and antiapoptotic molecules after activation of corticosteroid receptors decide neuronal fate. FASEB J 2000; 14(5): 779-90.
- Savory J, Rao J, Huang Y, Letada P, Herman M. Age-related hippocampal changes in Bcl-2: Bax ratio, oxidative stress, redox-active iron and apoptosis associated with aluminum-induced neurodegeneration: increased susceptibility with aging. Neurotoxicology 1999; 20(5): 805-17.
- Basu A. The interplay between apoptosis and cellular senescence: Bcl-2 family proteins as targets for cancer therapy. Pharmacol Ther 2022; 230: 107943.
- Argüelles S, Guerrero-Castilla A, Cano M, Muñoz MF, Ayala A. Advantages and disadvantages of apoptosis in the aging process. Ann N Y Acad Sci 2019; 1443(1): 20-33.
- Barriuso D, Alvarez-Frutos L, Gonzalez-Gutierrez L, Motiño O, Kroemer G, Palacios-Ramirez R, et al. Involvement of Bcl-2 Family Proteins in

- Tetraploidization-Related Senescence. *Int J Mol Sci* 2023; 24(7): 6374.
20. Kalache A, Aboderin I, Hoskins I. Compression of morbidity and active ageing: key priorities for public health policy in the 21st century. *Bull World Health Organ* 2002; 80(3): 243-4.
  21. Eckstrom E, Neukam S, Kalin L, Wright J. Physical activity and healthy aging. *Clin Geriatr Med* 2020; 36(4): 671-83.
  22. Rendeiro C, Rhodes JS. A new perspective of the hippocampus in the origin of exercise-brain interactions. *Brain Struct Funct* 2018; 223(6): 2527-45.
  23. Gao Y, Syed M, Zhao X. Mechanisms underlying the effect of voluntary running on adult hippocampal neurogenesis. *Hippocampus* 2023; 33(4): 373-90.
  24. Midoen YH, Ilyas S, Santoso P, Situmorang PC. Effect of maximal physical exercise on apoptosis via cytochrome c in hippocampus cells after administration of *Vitis gracilis* Wall. *J Pharm Pharmacogn Res* 2023; 11(2): 297-307.
  25. Coates AM, Joyner MJ, Little JP, Jones AM, Gibala MJ. A perspective on high-intensity interval training for performance and health. *Sports Medicine* 2023; 53(Suppl 1): 85-96.
  26. Akkaya EC, Koc B, Dalkiran B, Calis G, Dayi A, Kayatekin BM. High-intensity interval training ameliorates spatial and recognition memory impairments, reduces hippocampal TNF-alpha levels, and amyloid-beta peptide load in male hypothyroid rats. *Behav Brain Res* 2024; 458: 114752.
  27. Barmar ZT, Cheragh-Birjandi S, Rezaeian N. The effect of high-intensity interval training and curcumin supplementation on apoptosis indicators such as TNF- $\alpha$ , nfkB and fas on hippocampal neurotoxicity caused by hydrogen peroxide consumption in male rats. *Journal of Applied Health Studies in Sport Physiology* 2023; 10(2): 54-67.
  28. Rocha-Gomes A, e Castro TPA, Almeida PR, Leme PSBP, da Silva AA, Riul TR, et al. High-intensity interval training improves long-term memory and increases hippocampal antioxidant activity and BDNF levels in ovariectomized Wistar rats. *Behav Brain Res* 2023; 453: 114605.
  29. Shirpour S, Azarbayjani MA, Peeri M, Farzanegi P. Effect of high intensity interval training with curcumin on gene expression of Bax, Bcl-2, and Caspase-3 in aged female rat hepatocytes. *Report of Health Care* 2017; 3(3): 8-14.
  30. Novoa U, Arauna D, Moran M, Nuñez M, Zagmutt S, Saldivia S, et al. High-intensity exercise reduces cardiac fibrosis and hypertrophy but does not restore the nitroso-redox imbalance in diabetic cardiomyopathy. *Oxid Med Cell Longev* 2017; 2017(1): 7921363.
  31. Lei Z, Mozaffaritarab S, Kawamura T, Koike A, Kolonics A, Kéringner J, et al. The effects of long-term lactate and high-intensity interval training (HIIT) on brain neuroplasticity of aged mice. *Heliyon* 2024; 10(2): e24421.
  32. Gibala MJ, Little JP, MacDonald MJ, Hawley JA. Physiological adaptations to low-volume, high-intensity interval training in health and disease. *J Physiol* 2012; 590(5): 1077-84.
  33. Rajizadeh MA, Najafipour H, Bejeshk MA. An updated comprehensive review of plants and herbal compounds with antiasthmatic effect. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2024; 2024: 1-36.
  34. Nazhand A, Lucarini M, Durazzo A, Zaccardelli M, Cristarella S, Souto SB, et al. Hawthorn (*Crataegus* spp.): An updated overview on its beneficial properties. *Forests* 2020; 11(5): 564.
  35. Deniz GY, Geyikoglu F, Erol HS, Aslan M. The effectiveness of Hawthorn (*Ws-1442* Standardized *Crataegus oxyacantha* Extract) against alcohol-induced brain injury in rat; Its Underlying Potential Mechanisms. 2024.
  36. Elango C, Jayachandaran KS, Devaraj SN. Hawthorn extract reduces infarct volume and improves neurological score by reducing oxidative stress in rat brain following middle cerebral artery occlusion. *Int J Dev Neurosci* 2009; 27(8): 799-803.
  37. Zarrinkalam E, Ranjbar K, Salehi I, Kheiripour N, Komaki A. Resistance training and hawthorn extract ameliorate cognitive deficits in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomed Pharmacother* 2018; 97: 503-10.
  38. Ganji A, Salehi I, Sarihi A, Shahidi S, Komaki A. Effects of *Hypericum Scabrum* extract on anxiety and oxidative stress biomarkers in rats fed a long-term high-fat diet. *Metab Brain Dis* 2017; 32(2): 503-11.
  39. Elango C, Devaraj SN. Immunomodulatory effect of Hawthorn extract in an experimental stroke model. *J Neuroinflammation* 2010; 7: 97.
  40. Soori R, Amini AA, Choobineh S, Eskandari A, Behjat A, Ghram A, et al. Exercise attenuates myocardial fibrosis and increases angiogenesis-related molecules in the myocardium of aged rats. *Arch Physiol Biochem* 2022; 128(1): 1-6.
  41. Deng H, Yue JK, Zusman BE, Nwachuku EL, Abou-Al-Shaar H, Upadhyayula PS, et al. B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) and regulation of apoptosis after traumatic brain injury: A clinical perspective. *Medicina (Kaunas)* 2020; 56(6): 300.
  42. Kim S-E, Ko I-G, Kim B-K, Shin M-S, Cho S, Kim C-J, et al. Treadmill exercise prevents aging-induced failure of memory through an increase in neurogenesis and suppression of apoptosis in rat hippocampus. *Exp Gerontol* 2010; 45(5): 357-65.
  43. Lin J-Y, Kuo W-W, Baskaran R, Kuo C-H, Chen Y-A, Chen WS-T, et al. Swimming exercise stimulates IGF1/PI3K/Akt and AMPK/SIRT1/PGC1 $\alpha$  survival signaling to suppress apoptosis and inflammation in aging hippocampus. *Aging (alban NY)* 2020; 12(8): 6852-64.
  44. Culmsee C, Landshamer S. Molecular insights into mechanisms of the cell death program: role in the progression of neurodegenerative disorders. *Curr Alzheimer Res* 2006; 3(4): 269-83.
  45. Soori R, Ghram A, Zare Shahneh M, Choobineh S, Costa PB, Voltarelli FA. Effects of high intensity interval training and aging on cardiac muscle apoptosis markers in C57BL/6 Mice. *Sport Sciences for Health* 2021; 17: 173-9.
  46. Song W, Kwak H-B, Lawler JM. Exercise training attenuates age-induced changes in apoptotic signaling

- in rat skeletal muscle. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8(3-4): 517-28.
47. Tan R-f, Xia A-h, Wu X-g, Cao N-n, Li M-m, Zhang T-g, et al. Total Flavone of Hawthorn Leaf inhibits neuronal apoptosis in brain tissue of rat models of chronic cerebral ischemia. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research* 2014; 18(49): 7879.
48. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging* 2018; 13: 757-72.
49. Brokatzky D, Dörflinger B, Haimovici A, Weber A, Kirschnek S, Vier J, et al. A non-death function of the mitochondrial apoptosis apparatus in immunity. *EMBO J* 2019; 38(11): e100907.
50. Thirupathi A, Pinho RA, Chang Y-Z. Physical exercise: An inducer of positive oxidative stress in skeletal muscle aging. *Life Sci* 2020; 252: 117630.
51. Ding Y, Chang C, Xie L, Chen Z, Ai H. Intense exercise can cause excessive apoptosis and synapse plasticity damage in rat hippocampus through Ca<sup>2+</sup> overload and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis pathway. *Chin Med J (Engl)* 2014; 127(18): 3265-71.
52. Krüger K, Mooren FC. Exercise-induced leukocyte apoptosis. *Exerc Immunol Rev* 2014; 20: 117-34.
53. Novoa U, Arauna D, Moran M, Nuñez M, Zagmutt S, Saldivia S, et al. High-intensity exercise reduces cardiac fibrosis and hypertrophy but does not restore the nitroso-redox imbalance in diabetic cardiomyopathy. *Oxid Med Cell Longev* 2017; 2017: 7921363.

## The Effect of Six Weeks of High-Intensity Interval Training with Hawthorn Extract Supplementation on the Changes of BAX/Bcl-2 Indices in the Hippocampus Tissue of Aged Male Wistar Rats

Fatemeh Kianizadegan <sup>1</sup>, [Mohammad Rami](#) <sup>2</sup>, Aliakbar Alizadeh <sup>2</sup>, D Maryama Awang Daud <sup>3</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Aging is a complex and multifactorial phenomenon characterized by a gradual decrease in physiological functions in various organs. The central nervous system and the hippocampus are significantly affected by the effects of aging, such as apoptosis. The synergistic effects of physical activity and natural antioxidants such as hawthorn to protect brain damage against apoptosis may be the key to inhibiting or reducing the apoptosis of nerve cells in the aging process. Therefore, this study aims to investigate the effect of high-intensity interval training with hawthorn extract supplementation on the changes of BAX/Bcl-2 indices in the hippocampus tissue of aged rats.

**Methods:** In this experimental research, 30 male Wistar field rats 22 months of age were randomly divided into five groups of six, including young, elderly, elderly/exercise, elderly/extract, and elderly/extract/exercise. In the groups that used hawthorn extract, they received 100 mg/kg of the extract by gavage after training sessions. The high-intensity interval training protocol was for six weeks with an intensity of 80-100% of maximum speed. After tissue removal, BAX/Bcl-2 protein levels were measured using the western blot method. One-way ANOVA and Tukey's post hoc test were used to examine the research variables.

**Findings:** The results of the present study showed that aging caused a significant decrease in the Bcl-2 variable and a significant increase in the BAX variable ( $P = 0.001$ ). Also, the results of this research showed that both high-intensity interval training and hawthorn extract consumption caused a consequential advance in Bcl-2 values (respectively,  $P = 0.031$  and  $P = 0.011$ ) and a significant decrease in BAX protein ( $P = 0.003$  and  $P = 0.016$ , respectively). In addition, the results of this research showed that the synergistic effects of high-intensity interval training in the elderly/extract/exercise group caused a significant increase and decrease in Bcl-2 and BAX variables, respectively, compared to the elderly/exercise and elderly/extract groups ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** According to the results of this research, it can be stated that the synergy of the beneficial effects of high-intensity intermittent physical activity along with the consumption of hawthorn extract in increasing the Bcl-2 variable and decreasing the BAX variable can probably play a consequential role in inhibiting the apoptosis process in the rat hippocampus tissue and can probably be a promising non-pharmacological strategy.

**Keywords:** Aging; Apoptosis; Hippocampus; Exercise

**Citation:** Kianizadegan F, Rami M, Alizadeh A, Awang Daud DM. **The Effect of Six Weeks of High-Intensity Interval Training with Hawthorn Extract Supplementation on the Changes of BAX/Bcl-2 Indices in the Hippocampus Tissue of Aged Male Wistar Rats.** J Isfahan Med Sch 2024; 42(769): 451-62.

1- MSc, Department of Sport Physiology, School of Sport Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2- Assistant Professor, Department of Sport Physiology, School of Sport Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

3- Assistant Professor, Health Through Exercise and Active Living (HEAL) Research Unit, School of Medicine and Health Sciences, Universiti Malaysia Sabah, Kota Kinabalu 88400, Sabah, Malaysia and Department of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine and Health Sciences, University Malaysia Sabah, Jalan UMS, Kota Kinabalu 88450, Sabah, Malaysia

**Corresponding Author:** Mohammad Rami, Assistant Professor, Department of Sport Physiology, School of Sport Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran; Email: m.rami@scu.ac.ir