DOI: 10.48305/jims.v40.i676.0451

مجله دانشکده پزشکی اصفهان — سال چهلم/شماره‌ی ۶۷۶/هفته‌ی چهارم مرداد ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۱۵ — تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۳/۲ — تاریخ چاپ: ۱۴۰۱/۵/۲۸

تأثیر دو شدت متفاوت تمرینی تناوبی بر بیان ژن پروتئین‌های Bcl-2 و Bax بافت عضله‌ی اسکلتی موش‌های صحرایی نر

محسن غفاری مقدم[۱]، بهرام عابدی[۲]، عبدالعلی بنائی‌فر[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: هدف از پژوهش حاضر، بررسی تأثیر دو شدت متفاوت تمرینی تناوبی بر بیان ژن پروتئین‌های Bcl-2 و Bax بافت عضله‌ی اسکلتی موش‌های صحرایی نر بود.

روش‌ها: در مطالعه‌ی تجربی حاضر، ۲۴ سر موش صحرایی نر به صورت تصادفی به سه گروه تمرین تناوبی با شدت بالا، تمرین تناوبی با شدت متوسط و شاهد تقسیم شدند. گروه‌های تمرین به مدت ۱۲ هفته تحت تأثیر تمرین تناوبی با شدت بالا و متوسط قرار گرفتند. پروتکل تمرینی هر دو گروه شامل ۱۲ هفته و ۵ روز در هفته بود. به منظور اندازه‌گیری بیان ژن‌های Bcl-2 و Bax از روش Real-time-PCR استفاده شد. داده‌ها با استفاده از آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey آنالیز شدند.

یافته‌ها: تفاوت معنی‌داری در بیان ژن‌های Bcl-2 عضله‌ی نعلی موش‌های صحرایی نر در سه گروه تمرین تناوبی با شدت بالا، متوسط و شاهد مشاهده شد (P = ۰/۰۰۱). یافته‌ها نشان داد که بیان ژن Bcl-2 در دو گروه تمرین، به طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بود. این در حالی است که بیان ژن Bax در سه گروه تفاوت معنی‌داری نداشت (P = ۰/۱۵۴). با این حال بیان این پروتئین در گروه تمرین تناوبی شدید و متوسط به ترتیب ۱۱ و ۹ درصد کمتر از گروه شاهد بود.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد هر دو شدت تمرین تناوبی بر افزایش پروتئین ضدآپوپتوز میتوکندریایی عضله‌ی نعلی، تأثیر قابل توجهی دارد و نشان از اثر مثبت فعالیت تناوبی در حفظ حیات سلول داشت.

واژگان کلیدی: تمرین تناوبی؛ آپوپتوز؛ ژن‌های Bcl-2 و Bax

ارجاع: غفاری مقدم محسن، عابدی بهرام، عبدالعلی بنائی‌فر. **تأثیر دو شدت متفاوت تمرینی تناوبی بر بیان ژن پروتئین‌های Bcl-2 و Bax بافت عضله‌ی اسکلتی موش‌های صحرایی نر.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۱؛ ۴۰ (۶۷۶): ۴۵۸-۴۵۱

مقدمه

آپوپتوز (Apoptosis) یا مرگ برنامه‌ریزی شده، یک فرایند زیستی فعال و برگشت‌پذیر است که در تنظیم تعادل بین رشد و مرگ سلولی در بافت‌های مختلف، به ویژه بافت‌های سوماتیک (Somatic tissue) مانند مغز، عضله‌ی اسکلتی و میوکارد نقش اساسی دارد (۱). این روند با تکه تکه کردن کروماتین‌ها و فشرده‌سازی سیتوپلاسم سلولی کار خود را آغاز و با تولید واکوئل‌های محتوی ذرات آپوپتوتیکی خاتمه می‌یابد (۲). نتایج مطالعات موجود حاکی از آن است که میزان آپوپتوز اندک عضلات اسکلتی (در حدود ۰/۰۰۱) ممکن است در اثر عوامل درونی یا بیرونی مانند پرتوافکنی، ایسکمی (Ischemia)، داروهای مختلف، سالخوردگی و فشارهای جسمانی بیشتر شده و از این طریق مقدمات بروز بیمارهای مختلف را فراهم کند (۳). این فرایند فیزیولوژیایی از طریق دو مسیر داخل و خارج سلولی رخ می‌دهد. مسیر خارجی با اتصال لیگاندهای مهم مانند TNF-α و Fas به گیرنده‌های غشایی القاکننده‌ی مرگ راه‌اندازی می‌شود (٤) در حالی که مسیر داخلی به عنوان مهم‌ترین مسیر ایجاد آپوپتوز، با تغییراتی در نفوذپذیری میتوکندری و رهایش عوامل آپوپتوزی همراه است (۵). به هر حال، رخدادهای مولکولی آپوپتوز اساساً به واسطه‌ی تعادل بین پروتئین‌های ویژه‌ی تنظیمی (Specific regulatory proteins) پیش و ضدآپوپتوزی مشخص می‌شود. در این بین، پروتئین‌های Bax و

۱- دانشجوی دکترای فیزیولوژی ورزش، گرایش عصب و عضله، دانشگاه آزاد واحد تهران شمال، تهران، ایران

۲- استاد، گروه فیزیولوژی ورزش، واحد محلات، دانشگاه آزاد اسلامی، محلات، ایران

۳- دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزش، دانشگاه آزاد تهران جنوب، تهران، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: بهرام عابدی، استاد، گروه فیزیولوژی ورزش، واحد محلات، دانشگاه آزاد اسلامی، محلات، ایران

Email: bahram.abedi@iau.ac.ir

Bcl2به عنوان پروتئین‌های اصلی در شکل‌گیری آپوپتوز و پیام‌های آپوپتوز میتوکندریایی درگیر می‌شوند (٦). پروتئین Bax با کاهش پایداری غشای بیرونی میتوکندری می‌تواند منتج به رهایش عوامل آپوپتوزی مانند سیتوکروم c از فضای بین غشایی شود و پروتئین Bcl2با فعالیت پیش‌آپوپتوزی پروتئین Bax مخالفت کرده و موجب حفظ یکپارچگی غشای میتوکندری می‌شود (٧). اگرچه اکثر مسیرها و مولکول‌های کنترل‌کننده‌ی آپوپتوز در همه‌ی بافت‌ها مشابه است، اما چون عضله‌ی اسکلتی دارای یک بافت چند هسته‌ای (Multi-core) است و در آن فقط یک هسته می‌تواند دستخوش قطعه قطعه شدن DNA شود، لذا، آپوپتوز در عضله‌ی اسکلتی ضرورتاً موجب از بین رفتن کل سلول نمی‌شود (٨). بنابراین آپوپتوز به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل تنظیم‌گر تعادل بین زایش و مرگ سلول‌های عضلانی و بروز بیماری‌های مختلف، توجه بسیاری از پژوهشگران حوزه سلامت و علوم زیستی را به خود جلب کرده است (٩). لذا، با توجه به شواهد موجود، اتخاذ و توسعه‌ی راهکارهای مختلف برای حمایت از عضلات اسکلتی در مقابل افزایش آپوپتوز و آسیب‌های احتمالی مرتبط با آن ضروری به نظر می‌رسد. اگرچه روش‌های متعدد دارویی و بالینی مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته‌اند، ولی در سال‌های اخیر، تأثیر تمرینات ورزشی بر آپوپتوز و سازوکارهای احتمالی آن، توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده که البته وجود تناقضات و عدم دسترسی به مستندات معتبر و تحقیقات جامع در این زمینه ضرورت و اهمیت موضوع را دوچندان کرده است (١٠). در ارتباط با تأثیر فعالیت ورزشی بر آپوپتوز، یک جلسه فعالیت ورزشی شدید تا ٤٨ ساعت می‌تواند موجب تسریع در فرایند آپوپتوز شود. برخی از محققین معتقدند که بروز فشار در حین فعالیت‌های ورزشی نسبتاً سنگین و شدید ممکن است با افزایش عوامل پیش‌آپوپتوزی یا کاهش پروتئین‌های ضدآپوپتوزی، باعث تشدید این فرایند و پیامدهای بعدی آن شود (١١). هرچند نتایج برخی از مطالعات به نقش محافظتی تمرینات بدنی اشاره دارد. این تناقضات ممکن است عمدتاً ناشی از شدت، مدت و نوع تمرینات بدنی یا وضعیت سلامت و آمادگی آزمودنی‌های مورد مطالعه باشد (١٢).

Peterson و همکاران نشان دادند، دوازده هفته برنامه‌ی تمرین هوازی با شدت ٧٥ تا ٨٠ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه به طور معنی‌داری باعث افزایش بیان ژن Bcl2 در عضله‌ی اسکلتی موش‌های صحرایی نر در گروه تمرین می‌شود (١٣).

در مقابل Memet همکاران در پژوهش خود به این نتیجه رسیدند که دوازده هفته تمرین هوازی باعث کاهش غیرمعنی‌دار پروتئین Bax در موش‌های صحرایی در گروه تمرین نسبت به گروه شاهد می‌شود (١٤).

همچنین McMillan و همکاران گزارش کردند که شش هفته تمرین استقامتی، موجب کاهش قطعه قطعه شدن DNA، رهایش سیتوکروم c و پروتئین Bax می‌شود (١٥).

باید به این نکته توجه نمود، فعالیت ورزشی سبب ایجاد تغییر در هم ایستایی محیط داخلی بدن می‌شود که به معنی ایجاد چالش حفظ بقا در شرایط پرتنش برای سلول‌ها است. در طول دهه‌ی گذشته درباره‌ی اثر فعالیت ورزشی بر آپوپتوز سلولی مطالعات زیادی انجام گرفته که اغلب بیانگر کاهش سطح آپوپتوز، به دنبال فعالیت ورزشی استقامتی با شدت متوسط هستند (١٦). با توجه به تأثیر بهتر تمرینات تناوبی بر برخی شاخص‌ها از جمله توان هوازی و افزایش استفاده از این تمرینات توسط ورزشکاران و افراد عادی، تأثیر این نوع از تمرینات بر آپوپتوز، موضوعی است که می‌تواند ذهن پژوهشگران ورزشی را به خود جلب کند (١٧). اگرچه به دلیل نقش تمرینات استقامتی در حفظ سلامت جسمانی استفاده از اینگونه تمرینات بسیار توصیه شده است اما یکی از دلایل اصلی نپرداختن به این شیوه‌ی تمرینی، زمان طولانی آن می‌باشد. از این‌رو، ایجاد روش تمرینی مناسب با صرف زمان کوتاه که دارای خاصیت تمرینات استقامتی تداومی باشد، مورد توجه محققین رشته‌ی علوم ورزشی قرار گرفته است (١٨). با این وجود، تاکنون مطالعه‌ی جامعی در این زمینه و بررسی همزمان دو نوع شدت متفاوت تمرین تناوبی بر بیان برخی از ژن‌های مسیر میتوکندریایی آپوپتوز عضله‌ی اسکلتی موش‌های صحرایی انجام نشده است. به علاوه، مطالعات اندکی که به بررسی اثر تمرین ورزشی بر آپوپتوز عضلات اسکلتی به ویژه در داخل کشور پرداخته‌اند، اغلب از روش تانل و تغییرات مورفولوژیکی برای بررسی وقوع آپوپتوز استفاده کرده‌اند و تغییرات احتمالی مولکولی و پروتئین‌های درگیر در آپوپتوز، متعاقب تمرینات ورزشی کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. لذا شناسایی اثر تمرینات ورزشی بر آپوپتوز عضلات جهت کاهش بیماری‌ها و آسیب‌های ناشی از آن در بین همه‌ی افراد جامعه به ویژه ورزشکاران یک ضرورت انکارناپذیر به نظر می‌رسد. از این‌رو، با انجام مطالعه‌ی حاضر می‌توان انتظار داشت که ضمن پاسخ به برخی ابهامات موجود، پیشنهادات کاربردی متناسبی در راستای نحوه‌ی انجام تمرینات و پیشگیری از پیامدهای احتمالی ناشی از تمرین ارائه داد. لذا هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی تأثیر دو شدت متفاوت تمرینی تناوبی بر بیان ژن پروتئین‌های Bcl-2 و Bax بافت عضله‌ی اسکلتی موش‌های صحرایی نر بود.

روش‌ها

مطالعه‌ی تجربی حاضر بر روی ٢٤ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار ٨ هفته‌ای که از مؤسسه‌ی پاستور ایران خریداری شده بود انجام شد.

در پـژوهش حاضـر کلیـه‌ی قـوانین و نحـوه‌ی رفتـار بـا حیوانـات (آشناسازی، تمرین، بیهوشی و کشتن حیـوان بـر اسـاس AAALAC رعایت گردید. جهت جلوگیری از فشار و تغییر شرایط فیزیولوژیـک، موش‌ها به مدت دو هفته در حیوانخانه‌ی مرکـزی آزمایشـگاه، تحـت شرایط جدید قرار گرفته و ۵ جلسه به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰-۸ متر در دقیقه بر روی نوار گردان به فعالیت پرداختنـد. در پایـان این دوره، موش‌ها پس از مطابقت وزنی به سه گـروه تمـرین تنـاوبی شدید، متوسط و شاهد جایگزین شدند (۱۹). آزمـودنی‌هـا بـه صـورت آزادانه از غذای استاندارد و آب در طول دوره‌ی پژوهش استفاده کردند.

پروتکـل HIIT (High intensity interval training) مـورد استفاده در پـژوهش حاضـر، برنامـه‌ی تمرینـی تعـدیل شـده توسـط Hafstad و همکاران بود که به مدت ۱۲ هفته و ۵ جلسه در هفته بـر روی نوارگردان (شیب صفر درجه) اجرا شـد. پروتکـل HIIT شـامل اجرای ۱۰ وهله فعالیت ٤ دقیقه‌ای با شدت ۹۰-۸۵ درصد VO_2max و با دوره‌های استراحتی فعال ۲ دقیقه‌ای بود که به صورت پیش‌رونـده تا هفته‌ی دهم سرعت نوارگردان افـزایش یافـت و دو هفتـه‌ی پایـانی (یازدهم و دوازدهم) سرعت نوارگردان حفـظ شـد. بـر ایـن اسـاس، سرعت نوارگردان از ۲۵ متر بر دقیقـه در هفتـه‌ی اول بـه ۳٤ متـر بـر دقیقه در هفته‌ی دهم رسید و دو هفته‌ی پایانی این سرعت حفظ شـد. همچنین، دوره‌های استراحت فعـال از سـرعت ۱۱ متـر بـر دقیقـه در هفته‌ی اول به سرعت ۱٦ متر بـر دقیقـه در هفتـه‌ی دهـم رسـید و دو هفته‌ی پایانی این سرعت حفظ گردید. لازم به ذکـر اسـت، ۱۰ دقیقـه گرم کردن و ۵ دقیقه سرد کردن در ابتدا و انتهای هر جلسه‌ی تمرینـی اجرا شد (۲۰).

پروتکل MIIT شـامل اجـرای ۱۳ وهلـه فعالیـت ٤ دقیقـه‌ای بـا شـدت ۷۰-٦۵ درصـد VO_2max و بـا دوره‌هـای اسـتراحتی فعـال ۲ دقیقه‌ای بود که مسافت طی شده با پروتکل HIIT همسان شد و به صورت پیش‌رونده تا هفته‌ی دهم هر هفته سرعت نوارگردان افـزایش یافت. بر این اساس، سرعت نوارگردان در هفتـه‌ی اول از ۱٦ متـر بـه ۲۳ متر بر دقیقه در هفته‌ی دهـم رسـید و دو هفتـه‌ی پایـانی سـرعت نوارگردان حفظ شد. لازم به ذکر است، ۱۰ دقیقه گرم کردن و ۵ دقیقه سرد کردن در ابتدا و انتهای هر جلسـه‌ی تمرینـی اجـرا گردیـد (۱۵). توان هوازی از پروتکل غیرمستقیم با استفاده از نوارگردان برآورد شد. بر این اساس، بعد از ۱۰ دقیقه گرم کردن، آزمون دویدن رت‌ها شروع و سـرعت نـوارگردان هـر ۲ دقیقـه یـک بـار بـه میـزان ۰/۰۳ m/s (۱/۸ m/min تا ۲) افزایش یافت تا حیوانات دیگـر قـادر بـه دویـدن نباشند. سرعتی که در آن VO_2max به دست آمد بـه عنـوان سـرعت ماکزیمم تعریف شد (۲۰).

جراحی حیوانات آزمایشگاهی و استخراج نمونه: در ایـن مطالعـه سعی بر آن بود تا حیوانات مورد مطالعه در کم‌ترین زمان ممکن و بـا حداقل درد و آزار کشته شوند. تمامی موش‌های صحرایی، ٤۸ ساعت پس از آخرین جلسه‌ی تمـرین، توسـط تزریـق درون‌صـفاقی کتـامین (۹۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم بـه ازای هر کیلوگرم) بیهوش، جراحی انجام و مـوش‌هـای صـحرایی تشـریح شدند و در ادامـه پـس از شـکافتن و کنـار زدن بافـت‌هـای سـطحی، عضله‌ی نعلی آن‌ها استخراج شد. استخراج نمونه‌های بـافتی از طریـق هموژن کردن در بافر لیـز بـا غلظـت ۱۰۰ میلـی‌گـرم بافـت در یـک میلی‌لیتر بافر تجزیه‌کننده انجـام شـد. نمونـه‌هـای همـوژن بـه مـدت ٤۰ دقیقه بـا دور ۱۲۰۰۰ روی یـخ، سـانتریفوژ شـدند. سـپس بخـش سطحی سانتریفیوژ جمع‌آوری و تا زمان تحلیل در دمـای ۸۰- درجـه نگه‌داری شد. بافت عضله‌ی نعلی نمونه‌برداری شده پـس از شستشـو در سـرم فیزیولوژیـک در میکروتیـوب‌هـای ۱/۸ حـاوی مـایع RNAlaterTM با نسبت ۲۰ درصد غوطه‌ور گردیده و جهـت انجـام آزمایش‌های ژنتیک به آزمایشگاه انتقـال داده شـد. انـدازه‌گیـری بیـان ژن‌های فاکتورهای مـورد نظـر از بافـت عضـله‌ی نعلـی بـه وسـیله‌ی تکنیک PCR–time Real سنجش و پس از کمی‌سازی مقـادیر بیـان با ژن استفاده از فرمول ctΔΔ تجزیه و تحلیـل شـد واکـنش PCR بـا اسـتفاده از PCR (Applied Biosystems) Master mix و SYBR Green در دسـتگاه (Applied Biosystems, Sequence ABI Step One Detection Systems. Foster City, CA) طبـق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. برای سنجش کمی بیـان ژن‌هـای مـورد نظـر از کیـت (SYBR-green Real Time RT-PCR, TAKARA) (ژاپن) اسـتفاده شـد. غلظـت‌هـای ۱/۲۰، ۱/۱۰ و ۱/۵۰ میکرولیتـر از cDNA سنتز شده تهیه گردیـد. غلظـت ۱/۲۰ بـه عنـوان الگـو بـرای Real-time PCR استفاده شد. cDNA با پرایمرهای مخصوص برای ژن‌های Bax و Bcl2 تکثیـر شـد. طبـق دسـتورالعمل کیـت، واکـنش تکثیری در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد که مشتمل بر ۱۰ میکرولیتـر از محلول اصلی (Master mix)، ۰/۳ میکرولیتر از پرایمر Forward، ۰/۳ میکرولیتـر از پرایمـر Reverse، دو میکرولیتـر از cDNA سـنتز شده و ۷/٤ میکرولیتر آب مقطر مـی‌باشـد. در ادامـه دو میکرولیتـر از cDNA رقیق‌سازی شده داخل میکروتیوپ‌های مخصوص RT-PCR ریختـه شـد. سـپس ۰/٦ میکرولیتـر از مخلـوط پرایمـر حـاوی ۰/۳ میکرولیتر پرایمر Forward و ۰/۳ میکرولیتر پرایمر Reverse بـه داخـل میکروتیـوپ اضـافه گردیـد و در نهایـت ۱۰ میکرولیتـر Syber green master mix و ۷/٤ میکرولیتـر آب مقطـر بـه محلـول نهایی ریخته شد. سپس میکروتیوپ به مدت ۳۰ ثانیه بر روی دسـتگاه Shacker کاملاً تکان داده و میکروتیوپ به مدت ۳۰ ثانیه میکروفیـوژ گردید و داخل دستگاه RT-PCR قرار گرفت.

جدول۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر

نام ژن	پرایمرها	توالی	طول
Bcl2	Forward	TAGGCGGCCCCAGCATGCGA	94bp
	Reverse	TCGCAGGTTTGTCGATATAT	92bp
Bax	Forward	GCTCAAGACCAGGGCGTCTG	92bp
	Reverse	GGCTGTCCAAGGCACGGTAA	94bp

الگوی دمایی PCR برای ژن‌های مربوطه به صورت ۹۵ درجه به مدت ۱۰ دقیقه برای سیکل اول بود که با ٤٥ سیکل به صورت دو مرحله‌ای ۹۵ درجه به مدت ۲۰ ثانیه و ٦۰ درجه به مدت ٦۰ ثانیه ادامه یافت. با استفاده از رنگ SYBR Green، میزان آمپلی فیکاسیون (Amplification) در هر چرخه دنبال شد. در چرخه‌ای که واکنش تکثیر، وارد مرحله‌ی لگاریتمی می‌شود و تحت عنوان CT (Threshold cycle) گفته می‌شود، میزان افزایش محصولات اندازه‌گیری می‌شود. پس از اتمام واکنش تکثیر، برای هر واکنش PCR یک نمودار رسم و سپس بر این اساس CT تعیین شد.

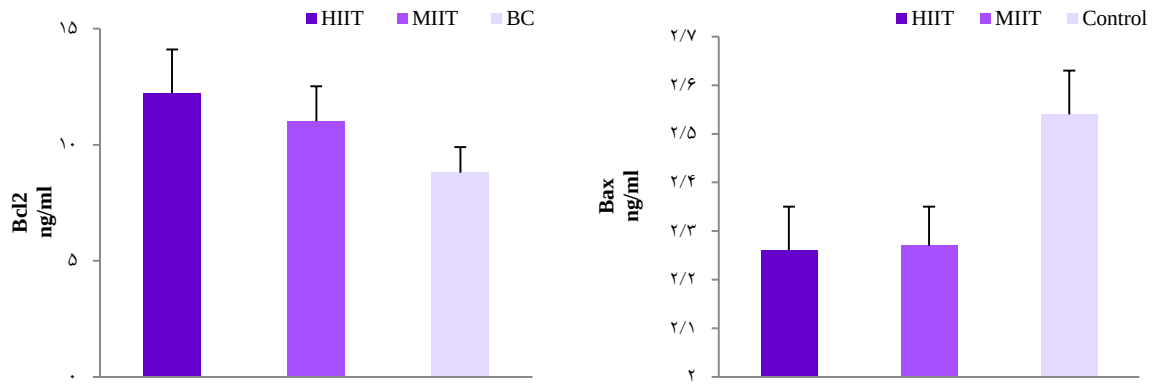
در پایان قبل از آنالیز داده‌ها، منحنی ذوب (Melting curve) به دست آمده از هر واکنش Real-time PCR بررسی شد تا پیک مربوط به ژن مورد نظر و فقدان پرایمر دایمر تأیید شود. برای آنالیز داده‌ها ابتدا، ΔCt ژن در هر نمونه از افتراق Ct ژن مربوطه و Ct ژن β-actin به عنوان رفرنس محاسبه شد (۱۲). داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی۲۳ (version 23, IBM Corporation, Armonk, NY) و آزمون‌های آماری Shapiro-Wilk و آنالیز واریانس یک‌طرفه تجزیه و تحلیل شدند. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ ارائه شده است. این مقاله از رساله‌ی مقطع دکتری رشته‌ی فیزیولوژی ورزش می‌باشد که در دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال با شناسه اخلاق IR.IAU.TNB.REC.1400.047 به تصویب رسیده است.

یافته‌ها

تحلیل واریانس یک‌طرفه برای مقایسه‌ی بیان پروتئین Bcl2 عضله‌ی نعلی موش‌های نر صحرایی در سه گروه تمرین تناوبی با شدت بالا، متوسط و شاهد تفاوت معنی‌دار بین سه میانگین گروه را نشان داد (P = ۰/۰۰۱). نتایج آزمون تعقیبی بیانگر افزایش معنی‌دار بیان ژن پروتئین Bcl2 عضله‌ی نعلی موش‌های نر صحرایی در گروه تمرین تناوبی با شدت بالا و متوسط نسبت به گروه شاهد بود (P = ۰/۰۰۱). همچنین تحلیل واریانس یک‌طرفه برای مقایسه‌ی بیان پروتئین Bax عضله‌ی نعلی موش‌های نر صحرایی در سه گروه تمرین تناوبی با شدت بالا، متوسط و شاهد تفاوت معنی‌دار بین سه میانگین گروه را نشان نداد (P = ۰/۱٥٤). با این حال بیان این پروتئین در گروه تمرین تناوبی شدید و متوسط به ترتیب ۱۱ و ۹ درصد کمتر از گروه شاهد بود (شکل ۱).

بحث

هدف از پژوهش حاضر، بررسی تأثیر دو شدت متفاوت تمرینی تناوبی بر بیان برخی از ژن‌های مسیر میتوکندریایی آپوپتوز عضله‌ی اسکلتی موش‌های صحرایی نر بود. پژوهش حاضر نشان داد، سه ماه تمرین تناوبی با شدت بالا و متوسط تأثیر معنی‌داری بر بیان ژن Bcl2 دارد هر چند که این دو پروتکل تمرینی تغییر معنی‌داری در مقادیر بیان پروتئین Bax ایجاد نکرد.



شکل ۱. میانگین Bcl2 و Bax در گروه‌های پژوهش. پس از ۱۲ هفته Bcl2 در گروه‌های تمرین شدید و متوسط نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت. بیان پروتئین Bax عضله‌ی نعلی موش‌های نر صحرایی در سه گروه تمرین تناوبی با شدت بالا، متوسط و شاهد تفاوت معنی‌دار بین سه میانگین گروه را نشان نداد.

Liu و همکاران گزارش دادند که شش هفته تمرین استقامتی، تأثیر معنی‌داری بر بیان ژن Bcl2 و قطعه قطعه شدن DNA در عضله‌ی اسکلتی موش‌های صحرایی جوان (سه ماهه) و سالم داشت (۲۱). به نظر می‌رسد دلیل اصلی تناقض مطالعه‌ی حاضر با برخی دیگر از مطالعات، سن موش‌های صحرایی باشد و در این راستا، استرس اکسایشی، سایتوکین‌های التهابی و اختلال در محافظت از استرس سلول سازوکارهای احتمالی هستند که در افزایش آپوپتوز بافت‌های پیر مشارکت می‌کنند (۲۲).

به عبارتی، افزایش سن و پیری با افزایش قابل توجه آپوپتوز همراه است که در این صورت احتمال تأثیر تمرینات ورزشی بر شاخص‌های آپوپتوزی بیشتر و بارزتر می‌شود (۲۳). همچنین، تفاوت در نوع بافت مورد مطالعه و زمان برداشت بافت نیز می‌تواند بر بیان و بروز متغیرهای درگیر مؤثر باشد، به طوری که در مطالعه‌ی حاضر، بافت عضله‌ی نعلی ٤٨ ساعت پس از آخرین جلسه‌ی تمرین تناوبی استخراج شد، ولی Qiu و همکاران، بلافاصله بعد از آخرین جلسه‌ی تمرین، بافت عضله‌ی اسکلتی را استخراج کرده بودند (٢٤). اگرچه سازوکارهای متعددی مانند تغییر مستقیم در بیان ژن‌های مربوط به آپوپتوز، کاهش آزادسازی عوامل آپوپتوتیک میتوکندری، تغییرات تولید ROS (Reactive oxygen species) و وضعیت ضداکسایشی برای اثرات محافظتی تمرینات ورزشی در مقابل آپوپتوز مطرح شده است، ولی هنوز ابهامات بسیاری در این زمینه وجود دارد (۲۵). به نظر می‌رسد میتوکندری نقش مهمی در تنظیم آپوپتوز سلول‌های عضله‌ی اسکلتی بازی می‌کند. در این راستا، اعضای خانواده‌ی Bcl2، شامل پروتئین‌های Bax و Bcl2 به عنوان پروتئین‌های اصلی، در شکل‌گیری کانال‌های آپوپتوزی، تنظیم نفوذپذیری میتوکندری و پیام‌های آپوپتوزی میتوکندریایی درگیر می‌شوند. اگرچه سازوکار دقیق میانجی‌گری پروتئین Bcl2 در ممانعت از رهایش عوامل آپوپتوزی از فضای بین غشایی میتوکندری هنوز تحت بررسی و پژوهش‌های جدی است، اما این موضوع به اثبات رسیده است که پروتئین Bcl2 با فعالیت پیش‌آپوپتوزی پروتئین Bax مخالفت می‌کند (٢٦). همچنین، پروتئین Bcl2 با ورود به غشای خارجی میتوکندری، یکپارچگی غشا را با خارج ساختن یون‌های H^+ از طریق کانال‌های یونی حفظ کرده و با اتصال به Apaf-1، فعال‌سازی کاسپازی را مهار می‌کند (۲۷). لذا نسبت Bax به Bcl-2 نشان‌گر پتانسیل آپوپتوز میتوکندریایی است. در این راستا، Vainshtein و همکاران اشاره داشتند که آپوپتوز میتوکندریایی اغلب با افزایش گونه‌های فعال اکسیژن همراه است و تمرینات ورزشی می‌توانند با کاهش تولید ROS و افزایش دفاع ضداکسایشی، روند آپوپتوز را کندتر کند (۲۸).

در پاسخ به فشار اکسایشی، جابه‌جایی و استقرار پروتئین Bax در غشای بیرونی میتوکندری افزایش می‌یابد. این موضوع تا اندازه‌ای می‌تواند ناشی از فعال‌شدن JNK (c-Jun-N-terminal kinase) سیتوزول باشد به طوری که JNK در حضور محرک‌های استرس سلولی فسفریله شده و موجب مهار پروتئین Bcl-2 می‌شود، لذا پروتئین Bax اجازه‌ی جابه‌جایی به سمت میتوکندری را می‌یابد (۲۷). در واقع در پاسخ به تمرین تناوبی سطوح مشابهی از فشار اکسایشی ایجاد و با فسفریله شدن کمتر JNK سبب کاهش بیان پروتئین Bax و جابه‌جایی آن به سمت میتوکندری و همچنین افزایش بیان پروتئین Bcl2 می‌شود. به علاوه، افزایش جابه‌جایی و انتقال AIF که در شرایط فشار اکسایشی مشاهده می‌شود، در عضله‌ی اسکلتی تمرین کرده تقلیل می‌یابد که نشانگر مهار پیام‌رسانی آپوپتوتیک است (۲۷).

اگرچه مکانیسم‌های دقیق آپوپتوزیس ناشی از فعالیت ورزشی به طور دقیقی مشخص نیست اما فرضیه‌های احتمالی زیادی هستند که به بررسی‌های بیشتری نیاز دارند. یکی از فرضیه‌های مهم در این زمینه این است که در حین فعالیت ورزشی، متابولیسم عضلانی افزایش می‌یابد که منجر به تولید ROS می‌شود. کمیت زیاد ROS می‌تواند آسیب اکسیداتیو تولید کرده و بدین گونه منجر به آپوپتوزیس از طریق مسیر داخلی شود (۲۸). به علاوه، اگرچه در مطالعه‌ی حاضر به دلیل برخی محدودیت‌ها امکان ارزیابی شاخص‌های التهابی مانند TNF-α و IL-6 نبود، این احتمال نیز دور از انتظار نیست که افزایش TNF-α و IL-6 پلاسما با فعال کردن مستقیم کاسپاز-۳ از طریق مسیر خارجی میانجی‌گری کرده باشد. چرا که افزایش سطوح TNF-α گردش خون، منجر به افزایش لیگاند متصل شونده به گیرنده‌ی TNF-α در سارکولما شده و باعث افزایش آپوپتوز از طریق مسیر خارجی می‌شود (۲۸). لذا به نظر می‌رسد که در گذر از نوع و شکل تمرین، سه ماه تمرین تناوبی شدید و متوسط تأثیر مناسبی بر بیان برخی از ژن‌های مسیر میتوکندریایی آپوپتوز عضله‌ی اسکلتی موش‌های صحرایی جوان داشته باشد. با این حال اظهار نظر قطعی در مورد تأثیر تمرین ورزشی بر شاخص‌های مربوط به آپوپتوز، منوط به انجام مطالعات بیشتری است.

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد که اثر فزاینده‌ی سه ماه تمرین تناوبی شدید و متوسط بر بیان ژن ضدآپوپتوزی Bcl-2 و نسبت بیان ژن Bcl-2 به Bax عضله‌ی نعلی، محیط مناسبی را برای افزایش یکپارچگی غشای میتوکندریایی سلول‌های عضله‌ی اسکلتی و احتمالاً توقف آپوپتوز فراهم نماید. در کل می‌توان نتیجه گرفت که تمرین تناوبی در دو شدت بالا و متوسط T تا اندازه‌ای احتمالاً می‌تواند آپوپتوز را کمتر

کند. این نتایج اثر مثبت فعالیت تناوبی در حفظ حیات سلول و تعدیل آپوپتوز و ضرورت گنجاندن آن در برنامه‌های ورزشی را نشان می‌دهد. با وجود این، با توجه به پژوهش‌های اندک انجام شده در این رابطه، درک اثرات فعالیت ورزشی بر بیان ژن فاکتورهای درگیر در آپوپتوز در عضله‌ی اسکلتی نیاز به پژوهش‌های بیشتری دارد.

تشکر و قدردانی

پروتکل این مطالعه در کمیته‌ی پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز به شماره‌ی مرجع IR.MYK.REC.1397.5022 به تأیید رسیده است. این مقاله از رساله‌ی مقطع دکتری رشته‌ی فیزیولوژی ورزش می‌باشد که در دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال با شناسه‌ی اخلاق IR.IAU.TNB.REC.1400.047 به تصویب رسید.

References

1. Javid Tabrizi N, Bashiri J, Narimani Rad M. Effect of 12 weeks of treadmill aerobic training on cytochrome C and Caspase-9 gene expression in cardiac muscle of male rats [in Persian]. Qom Univ Med Sci J 2017; 11(6): 1-9.
2. Kwak HB. Effects of aging and exercise training on apoptosis in the heart. J of Exer Rehabi 2016; 9(2): 219-22.
3. Lee Y, Min K, Talbert EE, Kavazis AN, Smuder AJ, Willis WT, et al. Exercise protects cardiac mitochondria against ischemia reperfusion injury. MedSci Sports Exerc 2018; 44(3): 397-405.
4. Phaneuf S, Leeuwenburgh C. Apoptosis and exercise. Med Sci Sports Exerc 2019; 33(3): 393-6.
5. Tanoorsaz S, Behpour N, Tadibi V. Investigating the Effect of mid-term of aerobic exercise on apoptosis biomarkers in the cardiomyocytes of streptozotocin-induced diabetic rats [in Persian]. J Fasa Univ Med Sci 2018; 7(4): 488-97.
6. Estes RR, Malinowski AM, Piacentini M, Thrush D, Salley E, Losey C, Hayes E. The effect of high intensity interval run training on cross-sectional area of the vastus lateralis in untrained college students. Int J Exerc Sci 2017; 10(1): 137.
7. Harada H, Hiraoka M, Kizaka-Kondoh S. Antitumor effect of TAT-oxygendependent degradation-caspase-3 fusion protein specifically stabilized and activated in hypoxic tumor cells. Cancer Res 2002; 62(7): 2013-8.
8. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: Opposing activities that mediate cell death. Nat Rev Mol Cell Biol 2018; 9(1): 47-59.
9. Siahkohian M, Asgharpour-arshad M, Bolboli L, Jafari A, Sheikhzadeh hesari F. Effect of 12- weeks aerobic training on some indices of skeletal muscle apoptosis in male rats [in Persian]. Med J Tabriz Univ Med Sci Health Serv 2018; 39(6): 35-43.
10. Pierse E, Lawler A, Manini T, Seo AY, Leeuwenburgh C. Modulation of age-induced apoptotic signaling and cellular remodeling by exercise and calorie restriction in skeletal muscle. Free Radic Biol Med 2018; 44(2): 160-8.
11. Lee SD, Shyu WC, Cheng IS, Kuo CH, Chan YS, Lin YM, et al. Effects of exercise training on cardiac apoptosis in obese rats. Nutr Metab Cardiovasc Dis 2013; 23(6): 566-73.
12. Frank,S, aley W, Lawler JM. Exercise training attenuates ageinduced elevation in Bax/Bcl-2 ratio, apoptosis, and remodeling in the rat heart. FASEB J 2006; 20(6): 791-3.
13. Peterson JM, Bryner RW, Sindler A, Frisbee JC, Alway SE. Mitochondrial apoptotic signaling is elevated in cardiac but not skeletal muscle in the obese Zucker rat and is reduced with aerobic exercise. J Appl Physiol 2014; 105(6): 1934-43.
14. Mernet S, Kayatekin BM, Resmi H, Açıkgöz O, Kaynak C, Özer E. The apoptotic response to strenuous exercise of the gastrocnemius and solues muscle fibers in rats. Eur J Appl Physiol 2018; 102(5): 515-24.
15. McMillan EM, Graham DA, Rush JW, Quadrilatero J. Decreased DNA fragmentation and apoptotic signaling in soleus muscle of hypertensive rats following 6 weeks of treadmill training. J Appl Physiol 2017; 113(7): 1048-57.
16. Huang Ch, Lin TJ, Chen ChCh, Lin WT. Endurance training accelerates exhaustive exercise-induced mitochondrial DNA deletion and apoptosis of left ventricle myocardium in rats. Eur J Appl Physiol 2012; 107(6): 697-706.
17. Rastogi RP, Rajeshwar R, Sinha RP. Apoptosis: Molecular mechanisms and pathogenicity. EXCLI J 2016; 8: 155-88.
18. Privitera G, Wohlgemuth SE, Aulisa L, Pahor M, et al. Multiple pathways to the same end: mechanisms of myonuclear apoptosis in sarcopenia of aging. Sci World J 2019; 10: 340-9.
19. Viña J, Gomez-Cabrera MC, Borras C, Froio T, Sanchis-Gomar F, Martinez-Bello VE, et al. Mitochondrial biogenesis in exercise and in ageing. Adv Drug Deliv Rev 2009; 61(14): 1369-14.
20. Hafstad AD, Kaspersen K-HF, Basnet P, Ytrehus K, Acharya G, Sangsad AD. Effects of high intensity interval training on pregnant rats, and the placenta, heart and liver of their fetuses. PloS One 2015; 10(11): e0143095
21. Liu WY, He W, Li, H. Exhaustive training increases uncoupling protein 2 expression and decreases Bcl-2/Bax ratio in rat skeletal muscle. Oxid Med Cell Longev 2013; 2013: 780719.
22. Ho TJ, Huang CC, Huang CY, Lin WT. Fasudil, a Rho-kinase inhibitor, protects against excessive endurance exercise training-induced cardiac hypertrophy, apoptosis and fibrosis in rats. Eur J Appl Physiol 2015; 112(8): 2943-55.
23. Song W, Kwak HB, Lawler JM. Exercise training attenuates age-induced changes in apoptotic signaling in rat skeletal muscle. Antioxid Redox Signal 2013;

8(3-4): 517-28.
24. Qiu X, Brown K, Hirschey MD, Verdin E, Chen D. Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation. Cell Metab 2013; 12(6): 662-7.
25. Koçtürk S, Kayatekin BM, Resmi H, Açikgöz O, Kaynak C, Ozer E. The apoptotic response to strenuous exercise of the gastrocnemius and solues muscle fibers in rats. Eur J Appl Physiol 2017; 102(5): 515-24.
26. Amin H, Vachris J, Hamilton A, Steuerwald N, Howden R, Arthur ST. GSK3β inhibition and LEF1 upregulation in skeletal muscle following a bout of downhill running. J Physiol Sci 2018; 64(1): 1-11.
27. Vainshtein A, Kazak L, Hood DA. Effects of endurance training on apoptotic susceptibility in striated muscle. J Appl Physiol 2015; 110(6): 1638-45.
28. Rasheva VI, Domingos PM. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. Apoptosis 2019; 14(8): 996-1007.

DOI: *10.48305/jims.v40.i676.0458*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 40, No. 676, 4th Week, August 2022**

Received: 06.03.2022 Accepted: 23.05.2022 Published: 18.08.2022

The Effect of Two Different Intensities of Interval Training on Gene Expression of Bcl-2 and Bax Proteins in Skeletal Muscle Tissue of Male Rats

Mohsen Ghafarimoghadam[1], Bahram Abedi[2], Abdolali Banaeifar[3]

Original Article

Abstract

Background: The purpose of this study is to investigate the effect of two different intensities of interval training on gene expression of Bcl-2 and Bax proteins in skeletal muscle tissue of male rats.

Methods: In the present experimental study, 24 male rats were randomly divided into three groups: high intensity interval training, moderate intensity interval training and control. The training groups were affected by high and moderate intensity interval training for 12 weeks. The training protocol of both groups included 12 weeks and 5 days per week of High intensity interval training and moderate intensity interval training. Real-time-PCR was obtained to measure the expression of Bcl-2 and Bax genes. Data were analyzed by one-way ANOVA and Tukey's post hoc test.

Findings: Significant differences were observed in the expression of Bcl-2 genes in the skeletal muscle of male rats in three groups (P = 0.001). The results showed that Bcl-2 gene expression in the two exercise groups was significantly higher than the control group. However, Bax gene expression was not significantly different amongst the three groups. The expression of this protein at the group's high intensity and moderate intensity interval training was 11% and 9% lower than the control group respectively.

Conclusion: It seems that both intensities of interval training have a strong impact in increasing the mitochondrial anti-apoptotic protein of the skeletal muscle and revealed the positive effect of interval training on cell survival.

Keywords: Interval training; Apoptosis; Bcl-2 genes; Mitochondria; Skeletal muscle

Citation: Ghafarimoghadam M, Abedi B, Banaeifar A. **The Effect of Two Different Intensities of Interval Training on Gene Expression of Bcl-2 and Bax Proteins in Skeletal Muscle Tissue of Male Rats.** J Isfahan Med Sch 2022; 40(676): 451-8.

1- Ph.D. Student in Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Professor, Department of Exercise Physiology, Mahallat Branch, Islamic Azad University, Mahallat, Iran
3- Associate Professor, Department of Exercise Physiology, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
Corresponding Author: Bahram Abedi, Professor, Department of Exercise Physiology, Mahallat Branch, Islamic Azad University, Mahallat, Iran; Email: bahram.abedi@iau.ac.ir