

# تأثیر تمرین هوازی بر بیان برخی ژن‌های پرو و آنتی آپوپتوتیک میوکارد رت‌ها پس از ترک مت‌آفتامین

نگین کردی<sup>۱</sup>، محمد عزیزی<sup>۲\*</sup>، محمد صمدی<sup>۳</sup>، وریا طهماسبی<sup>۴</sup>

۱-دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

۲-دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

۳-استادیار، مرکز تحقیقات فیزیولوژی ورزشی، پژوهشکده سبک زندگی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران

۴-استادیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

\* نشانی نویسنده مسئول: کرمانشاه، دانشگاه رازی، دانشکده علوم ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی

Email: azizimhammad@gmail.com

پذیرش: ۱۴۰۲/۷/۲۷

بازنگری: ۱۴۰۲/۶/۲۰

دریافت: ۱۴۰۲/۶/۱

## چکیده

**مقدمه و هدف:** مصرف مت‌آفتامین منجر به آسیب‌های سلولی متعددی می‌شود. مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر شش هفته تمرین هوازی بر بیان ژن‌های پرو و آنتی آپوپتوتیک میوکارد رت‌ها پس از ترک مت‌آفتامین انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** تعداد ۳۲ سر رت نر نژاد ویستار بطور تصادفی به چهار گروه (گروه مت‌آفتامین، گروه مت‌آفتامین سپس ترک، گروه مت‌آفتامین سپس ترک سپس تمرین و گروه مت‌آفتامین سپس ترک سپس زندگی عادی و بدون مداخله (گروه کنترل)) تقسیم شدند. مت‌آفتامین بصورت درون صفاقی و در هفته اول مقدار ۱۰ mg/kg و دو بار در روز به رت‌ها تزریق شد. از هفته دوم تا ششم، هر هفته، ۱ mg/kg به دوز تزریقی اضافه شد. پروتکل ورزشی پژوهش حاضر اجرای ۶ هفته تمرین هوازی روی تردمیل با شدت متوسط و به مدت ۶۰ دقیقه در روز و ۵ روز در هفته بود. سطوح بیان ژن‌های BAX و Bcl-2 در بافت میوکارد رت‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. داده‌ها با آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و در سطح معنی‌داری  $P \leq 0/05$  تجزیه و تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** مت‌آفتامین باعث افزایش آپوپتوز از طریق افزایش بیان ژن BAX، کاهش بیان ژن Bcl-2 و نسبت BAX/Bcl-2 شد. ترک مصرف مت‌آفتامین و تمرینات هوازی باعث کاهش معنی‌داری در بیان ژن BAX، نسبت BAX/Bcl-2 و افزایش در بیان ژن Bcl-2 شد ( $P \leq 0/05$ ).

**بحث و نتیجه‌گیری:** مصرف مت‌آفتامین می‌تواند بیان برخی ژن‌های پرو آپوپتوتیک را افزایش و بیان ژن‌های ضد آپوپتوزی را در میوکارد کاهش دهد. از طرفی ترک مصرف مت‌آفتامین و تمرینات هوازی می‌تواند روند آپوپتوز را در میوکارد رت‌ها کاهش دهد.

**واژه‌های کلیدی:** تمرین تداومی، BAX، Bcl-2، قلب، کریستال مت

## مقدمه

پاتولوژیک بوده‌اند (۳). برخی تحقیقات نشان داده‌اند که مصرف مزمن مت‌آفتامین حتی به مدت ۱۷ روز نیز منجر به تغییرات بافتی و همچنین مرگ سلولی یا آپوپتوز می‌شود (۴). لو و همکارانش (۲۰۲۱) نشان دادند که مصرف مزمن مت‌آفتامین منجر به افزایش آپوپتوز<sup>۲</sup> و فاکتورهای التهابی در افراد مصرف کننده می‌شود (۵). آپوپتوز، نوعی مرگ برنامه ریزی شده سلول

مت‌آفتامین<sup>۱</sup> (METH) دومین داروی غیرقانونی در جهان و یک محرک روانی بسیار اعتیادآور است (۱) و برای اولین بار در سال ۱۸۹۳ توسط ناگایی (فارماکولوژیست ژاپنی) از ادرین سنتز شد (۲). در یک مطالعه نشان داده شد که ۶۸ درصد افراد مصرف کننده مت‌آفتامین، دارای تغییرات قلبی عروقی

بیماران مصرف‌کننده مت‌آفتامین و نیز مشخص نبودن اثر تمرینات هوازی با شدت متوسط بر سلامت قلب مصرف‌کنندگان مت‌آفتامین، بنابراین در این مطالعه قصد بر آن است که تاثیر شش هفته تمرین هوازی بر بیان برخی ژن‌های پرو و آنتی آپوتوتیک میوکارد رت‌ها پس از ترک مت‌آفتامین مورد بررسی قرار گیرد.

### روش شناسی

جامعه آماری پژوهش حاضر را رت‌های نر تشکیل دادند. نمونه‌های پژوهش تعداد ۳۲ سر رت نر نژاد ویستار با میانگین سنی ۶ هفته و دامنه وزنی ۱۸۰-۲۰۰ گرم بودند. بر این اساس، رت‌ها در یک محیط کنترل شده از نظر شرایط نگهداری (دما ۲۰ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد)، رطوبت (۵۵ تا ۶۵ درصد)، چرخه شبانه‌روزی (۱۲:۱۲ ساعت)، سر و صدا، آب و غذا) قرار گرفتند.

رت‌ها به ۴ گروه ۸ تایی تقسیم شدند. گروه‌ها شامل: (۱) گروه کنترل (Con) (پس از شش هفته تیمار مت‌آفتامینی، رت‌ها وارد مرحله ۲۱ روزه قطع مصرف شدند و سپس به مدت شش هفته بدون هیچ مداخله‌ای زندگی کردند و نهایتاً ۲۴ ساعت پس از پایان شش هفته زندگی عادی، معدوم شدند). (۲) گروه مت‌آفتامین (پس از شش هفته تیمار مت‌آفتامینی، ۱۲ ساعت پس از آخرین دوز مصرفی معدوم شدند). (۳) گروه مت‌آفتامین و سپس ترک مصرف (METH/W) (پس از شش هفته تیمار مت‌آفتامینی، رت‌ها وارد مرحله ۲۱ روزه قطع مصرف شدند و سپس معدوم شدند). (۴) گروه مت‌آفتامین، سپس ترک و سپس ورزش (METH/W/Tr) (ابتدا به مدت شش هفته تیمار مت‌آفتامینی اجرا و سپس به مدت ۲۱ روز مصرف مت قطع شده و در ادامه شش هفته پروتکل ورزشی شروع شد و نهایتاً ۲۴ ساعت پس از آخرین وهله تمرینی معدوم شدند).

تیمار مت‌آفتامینی: مت‌آفتامین به رت‌ها به مدت شش هفته و دو بار در روز به صورت درون صفاقی تزریق شد. به طوری که در هفته اول مقدار ۱۰ mg/kg و دو بار در روز (به دلیل نیمه عمر ۱۲ ساعته مت‌آفتامین) به رت‌ها بصورت درون صفاقی و محلول در نرمال سالین ۰/۹ درصد تزریق شد. از هفته دوم تا ششم، هر هفته، ۱ mg/kg به دوز تزریقی اضافه شد. در هفته ششم مقدار دوز تزریقی ۱۵ mg/kg (درون صفاقی، دو بار در روز) بود (۱۹).

است که از دو مسیر داخلی و خارجی باعث از بین رفتن سلول می‌شود. در مسیر خارجی، پیام‌های مرگ مانند TNF- $\alpha$  گیرنده های مرگ غشای سلول را فعال کرده و موجب فعال شدن کاسپازها و در نتیجه راه اندازی فرآیند آپوتوز می‌شود. در مسیر داخلی، شبکه اندوپلاسمی و میتوکندری نقش اصلی را ایفا می‌کنند. در این مسیر محوریت میتوکندری در ایجاد آپوتوز بیشترین اهمیت را دارد (۶). برخی پروتئین‌های میتوکندریایی مانند پروتئین‌های خانواده B-cell lymphoma 2<sup>۱</sup> فرآیند آپوتوز را تنظیم می‌کنند (۷). خانواده Bcl-2 شامل فاکتورهای آنتی آپوتوزی مانند Bcl-1، Bcl-xl و Bcl-w و فاکتورهای پرو آپوتوزی مانند Bid، Bad، bcl-2-like protein 4 (BAX) می‌باشد (۸). عمل متقابل این فاکتورها، فرآیند خودکشی سلول را فعال و یا مهار می‌کند (۹). پروتئین BAX یکی از پروتئین‌های پیش‌برنده آپوتوز و از لحاظ ساختاری هم‌تای Bcl-2 است. جایگاه Bcl-2 در میتوکندری و پوشش هسته است و مانع آزادسازی سیتوکروم c از میتوکندری می‌شود (۱۰). در این راستا کرانسوا و همکاران (۲۰۰۵) افزایش فاکتور BAX و کاسپاز ۳ را در موش‌ها متعاقب مصرف روزانه ۴ میلی‌گرم مت‌آفتامین و ۴ بار در روز مشاهده کردند (۱۱).

از آنجا که علاوه بر مرگ سلولی به شکل نکروز، مرگ سلولی به صورت آپوتوز نیز با تنش‌های ورزشی و محیطی رخ می‌دهد، مطالعه در زمینه آپوتوز توجه بسیاری از پژوهشگران بخصوص پژوهشگران حوزه ورزشی را به خود جلب کرده است (۱۲-۱۴). تحقیقات بسیاری نشان داده‌اند که تمرینات منظم ورزشی موجب کاهش آپوتوز می‌شود (۱۵). (۱۶). در این رابطه، جهانی و همکاران (۱۳۹۹) نشان دادند هر دو تمرین هوازی تداومی و تناوبی با شدت بالا موجب تعدیل مرگ سلولی آپوتوتیک می‌شود (۱۷). میردار و همکاران (۱۳۹۸) نیز نشان دادند که شش هفته تمرین تناوبی فزاینده موجب افزایش معنادار آپوتوز گروه تمرین در مقایسه با گروه کنترل شد (۱۸).

با توجه به بار پزشکی و اجتماعی استفاده از METH، بررسی جنبه‌های مولکولی استراتژی‌های بالقوه برای جلوگیری از آسیب به سلامت، به ویژه بافت قلب، مهم است. شواهد متعدد نشان می‌دهد تمرین نقش موثری در بهبود سلامت قلب و عروق دارد. با توجه به احتمال وقوع آسیب قلبی عروقی در

1. Tumor Necrosis Factor Alpha  
2. Bcl-2

جدا و بلافاصله پس از شستشو توسط آب دیونیزه، قسمتی از بطن چپ برای بررسی بیان ژنهای BAX، BCL-2 جدا شد و بلافاصله در مایع نیتروژن قرار داده شد و سپس در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد فریز شد.

روش آزمایشگاهی: پس از هموژنیزه کردن بافت‌ها برای ایجاد مخلوطی همگن و یک دست مراحل استخراج RNA انجام شد. پس از استخراج RNA، کمیته و کیفیت آن با استفاده از دستگاه Nanodrop و الکتروفورز ژل آگارز بررسی گردید. پس از آن مراحل ساخت DNA مکمل یا cDNA انجام شد. در مراحل بعد برای طراحی پرایمر از سایت primer3 استفاده شد و با نرم افزار Oligo Analyzer مورد بررسی قرار گرفت. سپس مراحل Real Time PCR اجرا و آنالیز داده‌های مربوطه صورت پذیرفت. از ژن GAPDH بعنوان ژن کنترل استفاده شد و توالی پرایمرهای به کاررفته در جدول ۱ ارائه شده است.

ملاحظات اخلاقی: این پژوهش در کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه رازی کرمانشاه تایید و دارای کد اخلاق IR.RAZI.REC.1402.002 است. شرایط تغذیه‌ای، زیستی، نگهداری و دفع لاشه حیوانات با رعایت اصول اخلاقی و به بهترین نحو صورت پذیرفت.

#### روش‌های آماری

داده‌های بدست آمده از دستگاه Real Time PCR بصورت CT و میانگین CT برای هر نمونه بودند. در ادامه با از نرم‌افزار اکسل به  $\Delta\Delta CT$  تبدیل شدند و با استفاده از فرمول  $2^{-\Delta\Delta CT}$  اعداد نهایی به دست آمد. از آزمون شاپیرو ویلک برای بررسی چگونگی توزیع داده‌ها استفاده شد. در صورت طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه برای بررسی تفاوت بین گروهی استفاده گردید. در مرحله بعد، جهت تعیین دقیق تفاوت بین گروهی، از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. عملیات آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۶ و با سطح معناداری ۰/۰۵ انجام شد.

سندروم محرومیت در گروه‌های مت‌آمتامین: ۳۶-۷۲ ساعت پس از آخرین مصرف مت‌آمتامین علائم اولیه قطع مصرف ظاهر شد که این علائم پس از گذشت ۹۸ ساعت افزایش یافت. بنابر پژوهش‌های پیشین یک دوره ترک ۲۱ روزه برای گروه‌های دارای دوره قطع مصرف پس از پایان تیمار شش هفته‌ای مت‌آمتامین در نظر گرفته شد. در جوندگان علائم ترک عبارتند از: سیخ شدن مو، ترشح اشک، آبریزش بینی، اسهال، دندان قروچه و همچنین حرکاتی مانند پیچ خوردن، پریدن (۲۰).

پروتکل ورزشی: جهت آشناسازی، رت‌ها روی تردمیل (مارک دانش سالار ایرانیان) به مدت یک هفته و ۴ روز در هفته با سرعت ۵ متر در دقیقه و با شیب صفر درصد دویدند. در روز اول به مدت ۱۰ دقیقه و هر روز نسبت به روز قبل ۱۰ دقیقه افزایش داشت. پس از آشنایی رت‌ها با تردمیل، برای ارزیابی ظرفیت هوازی پایه، رت‌ها تحت آزمایش حداکثر سرعت دویدن (MRS) قرار گرفتند که طی آن سرعت هر سه دقیقه به اندازه ۳ متر در دقیقه تا زمان رسیدن به خستگی افزایش یافت. خستگی به‌عنوان لحظه‌ای تعریف شد که رت‌ها حتی با اعمال شوک بادی و ایجاد صدا با زدن ضربه بر روی درپوش نوار گردان دیگر قادر به دویدن مطابق با سرعت تردمیل نبودند. سرعت بدست آمده، MRS بود (میانگین سرعت بیشینه ۳۶ متر در دقیقه). تمرین با شدت متوسط به مدت ۶ هفته و هر هفته ۵ روز، روی تردمیل انجام شد. شدت متوسط تمرین با تست MRS تعیین شد. در سه هفته اول سرعت به میزان MRS ۶۰٪ و به مدت ۶۰ دقیقه در روز (سرعت دویدن رت‌ها در این مرحله ۲۲ متر در دقیقه بود) و در سه هفته دوم مجدداً تست MRS اجرا (میانگین سرعت بیشینه ۴۰ متر در دقیقه) و سرعت برای سه هفته دوم به میزان MRS ۷۰٪ (سرعت دویدن رت‌ها در این مرحله ۲۸ متر در دقیقه بود) و مدت ۶۰ دقیقه در روز، تنظیم شد (۲۱).

نحوه بافت برداری: رت‌ها با توجه به گروهی که در آن قرار داشتند، در شرایط استراحتی با کتامین و زایلازین با نسبت ۵ به ۲ بیهوش شدند، سپس قلب حیوان از ناحیه ریشه آئورت

جدول ۱. پرایمرهای استفاده شده در پژوهش

نام	(5' - 3')		Product length
	Forward	Reverse	
BAX	GAGACACCTGAGCTGACCTT	CTGCAGCTCCATGTTGTTGT	۱۱۱ nt
Bcl-2	CTTTGAGTTCGGTGGGGTCA	TCCACAGAGCGATGTTGTC	۸۰ nt
GAPDH	CAAGTCAACGGCACAGTCA	CCCCATTTGATGTTAGCGGG	۱۰۲ nt

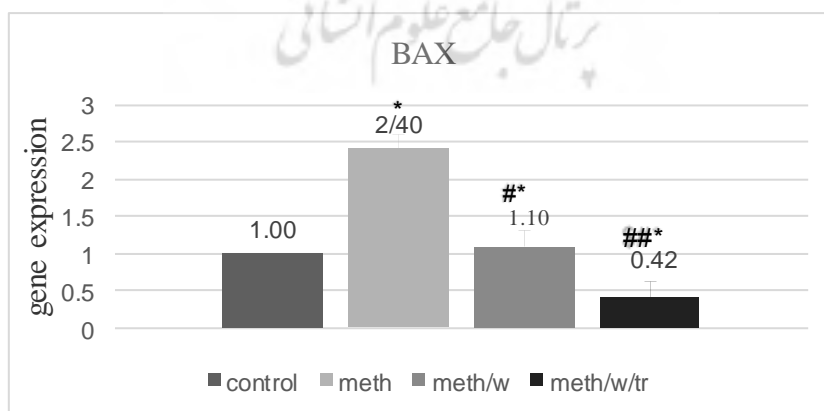
## یافته‌ها

به این معنی که ترک مصرف مت‌آمفتامین و اجرای شش هفته تمرین هوازی با شدت متوسط منجر به کاهش معنی‌دار در میزان بیان ژن BAX شد (شکل ۱). جدول ۳ مقادیر مربوط به آزمون تعقیبی توکی را برای بررسی محل تفاوت بین گروهی همه متغیرهای پژوهش حاضر را نشان می‌دهد.

جدول ۲ میانگین  $\pm$  انحراف معیار وزن رت‌ها را در هفته اول، سوم و آخر استفاده از مت‌آمفتامین، آخرین هفته ترک مت‌آمفتامین و هفته آخر تمرین نشان می‌دهد. براساس نتایج پژوهش، تفاوت معنی‌داری برای بیان ژن BAX بین گروه‌های پژوهش وجود دارد ( $F=46/30$  و  $P=0/0001$ )

جدول ۲. مقایسه وزن رت‌ها (میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد) در هفته اول، سوم و آخر استفاده از METH، هفته آخر ترک METH و هفته آخر تمرین

زمان	گروه	تعداد	وزن (گرم)
اولین هفته مصرف METH	Con	۸	۱۸۳ $\pm$ ۴,۰۳
	METH	۸	۱۸۶ $\pm$ ۱۳,۶۹
	METH /W	۸	۱۹۶ $\pm$ ۸,۶۱
	METH /W/Tr	۸	۱۹۱ $\pm$ ۲,۸۷
سومین هفته مصرف METH	Con	۸	۱۹۵ $\pm$ ۲,۰۸
	METH	۸	۱۹۳ $\pm$ ۱۱,۸۶
	METH /W	۸	۲۰۲ $\pm$ ۱۲,۰۳
	METH /W/Tr	۸	۱۹۳ $\pm$ ۷,۳۲
ششمین هفته مصرف METH	Con	۸	۲۰۷ $\pm$ ۶,۵۵
	METH	۸	۲۱۲ $\pm$ ۱۵,۴۱
	METH /W	۸	۲۲۳ $\pm$ ۱۵,۵۸
	METH /W/Tr	۸	۲۰۴ $\pm$ ۸,۶۰
آخرین هفته ترک METH	Con	۸	۲۱۲ $\pm$ ۷,۲۳
	METH	۸	-
	METH /W	۸	۲۳۰ $\pm$ ۱۸,۲۲
	METH /W/Tr	۸	۲۲۱ $\pm$ ۱۲,۹۳
آخرین هفته تمرین	Con	۸	۲۱۵ $\pm$ ۹,۵۰
	METH	۸	-
	METH /W	۸	-
	METH /W/Tr	۸	۲۲۵ $\pm$ ۱۴,۷۲



شکل ۱. میانگین  $\pm$  انحراف معیار میزان بیان نسبی ژن BAX در بطن چپ نسبت به ژن GAPDH در گروه‌های مورد آزمایش

علامت \* نشان‌دهنده تغییر معنی‌دار نسبت به گروه METH

علامت # نشان‌دهنده تغییر معنی‌دار نسبت به گروه METH /W

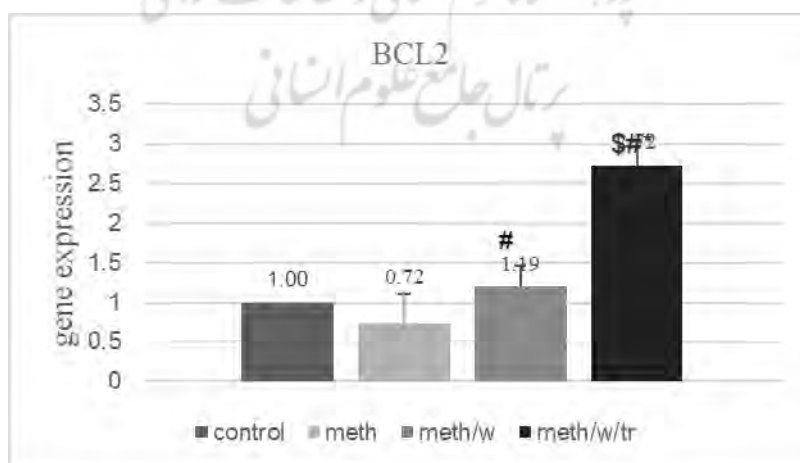
علامت \$ نشان‌دهنده تغییر معنی‌دار نسبت به گروه METH /W/ Tr

جدول ۳. نتایج مربوط به آزمون تعقیبی توکی

مقدار معنی داری	میانگین اختلاف	گروه‌ها		
۰/۰۰۱	-۱/۴۰۷	METH		
۰/۹۹۸	-۰/۱۰۰	METH /W	Con	
۰/۰۰۷	۰/۵۷۳	METH /W/Tr		
۰/۰۰۱	۱/۳۰۶	METH /W	METH	BAX
۰/۰۰۱	۱/۹۸۰	METH /W/Tr		
۰/۰۰۱	۰/۶۷۴	METH /W/Tr	METH /W	
۰/۸۹۵	۰/۲۷۱	METH		
۰/۹۸۷	-۰/۱۹۸	METH /W	Con	
۰/۰۰۱	-۱/۷۲۲	METH /W/Tr		
۰/۲۳۳	-۰/۴۷۰	METH /W	METH	BCL-2
۰/۰۰۱	-۱/۹۹۴	METH/W/Tr		
۰/۰۰۱	-۱/۵۲۴	METH /W/Tr	METH /W	
۰/۰۰۱	۲/۳۰۶	METH		
۰/۹۹۹	۰/۸۱۵	METH /W	Con	
۰/۸۹۵	۰/۸۴۴	METH /W/Tr		
۰/۰۰۱	۲/۸۸۸	METH /W	METH	نسبت BAX/Bcl-2
۰/۰۰۱	۳/۱۵۰	METH /W/Tr		
۰/۹۶۳	۰/۷۶۲	METH /W/Tr	METH /W	

تفاوت معنی داری در نسبت BAX/Bcl-2 بین گروه‌های پژوهش وجود داشت ( $F=9/08$  و  $P=0/0001$ )، به این معنی که ترک METH و انجام شش هفته تمرین هوازی منجر به افزایش معنی داری در نسبت BAX/Bcl-2 شد (شکل ۳ و جدول ۳).

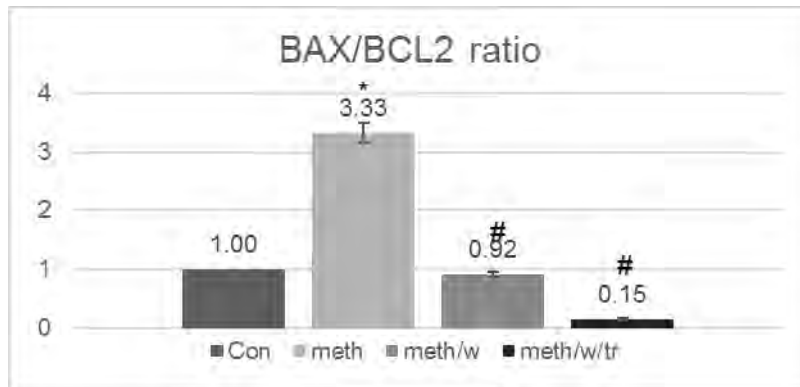
بر اساس نتایج پژوهش، تفاوت معنی داری برای بیان ژن Bcl-2 بین گروه‌های پژوهش وجود دارد ( $F=78/97$  و  $P=0/0001$ ) به این معنی که ترک مصرف مت‌آفتامین و اجرای شش هفته تمرین هوازی با شدت متوسط منجر به افزایش معنی دار در میزان بیان ژن Bcl-2 شد (شکل ۲ و جدول ۳).

شکل ۲. میانگین  $\pm$  انحراف معیار میزان بیان نسبی ژن Bcl-2 در بطن چپ نسبت به ژن GAPDH در گروه‌های مورد آزمایش

علامت \* نشان‌دهنده تغییر معنی دار نسبت به گروه METH

علامت # نشان‌دهنده تغییر معنی دار نسبت به گروه METH /W

علامت \$ نشان‌دهنده تغییر معنی دار نسبت به گروه METH /W/Tr



شکل ۳. میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد نسبت BAX/Bcl-2

علامت \* نشان دهنده تغییر معنی‌دار نسبت به گروه METH

علامت # نشان‌دهنده تغییر معنی‌دار نسبت به گروه METH/W

انسان محتمل است و یکی از دلایل ایجاد آپوتوز را کاهش پروتئینی به نام ملوسین در مدل‌های حیوانی و انسانی بیان کردند (۲۶). ملوسین یک مبدل مکانیکی است که توسط (Xq12-q13) ITGB1BP2<sup>۱</sup> کدگذاری شده و در عضلات اسکلتی و کاردیومیوسیت‌ها به صورت انتخابی بیان می‌شود (۲۷). ملوسین با تنظیم ریتم و انقباض طبیعی قلب، کاهش نفوذ سلول‌های التهابی و کاهش فیروز و آپوتوز کاردیومیوسیت‌ها، عملکرد قلب را حفظ می‌کند و همچنین فسفوریلاسیون پروتئین کیناز B (PKB) یا AKT را در طول سکنه قلبی تنظیم می‌کند و در نتیجه عملکرد قلب را بهبود می‌بخشد (۲۸). ملوسین می‌تواند با افزایش فسفوریلاسیون AKT، GSK3 $\beta$ <sup>۲</sup> و ERK<sup>۴</sup> بطور موثر آپوتوز کاردیومیوسیتی ناشی از METH را کاهش دهد. این مساله اهمیت ملوسین در ایجاد مسیر ضد آپوتوز را تایید می‌کند (۶). یکی دیگر از مکانیسم‌های احتمالی افزایش القای آپوتوز میوکارد به دنبال مصرف مت‌آفتماین افزایش کاسپاز ۳ است (۲۶). با افزایش BAX و ورود آن به میتوکندری و رهایش سیتوکروم C منجر به شروع پیام‌رسانی آپوتوتیک آبشارهای کاسپاز پایین دستی می‌شود (۲۹). کاسپاز ۳ بعنوان یک پروتئاز مرگ و هسته اصلی آبشار آپوتوزی شناخته می‌شود. کاسپاز ۳ فعال PARP<sup>۵</sup> را می‌شکافد که باعث از بین رفتن عملکرد ترمیم DNA و القای آپوتوز می‌شود (۳۰). از طرفی نتایج پژوهش حاضر نشان داد با اجرای فعالیت ورزشی منظم، بیان ژن Bcl-2 افزایش و بیان ژن BAX کاهش می‌یابد. در پژوهش ماهری‌نیا و همکاران (۲۰۲۲)

## بحث

پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر تمرین هوازی بر بیان برخی ژن‌های پرو و آنتی آپوتوتیک میوکارد رت‌ها پس از ترک مت‌آفتماین انجام شد. نتایج نشان داد که مصرف مت‌آفتماین موجب افزایش بیان ژن BAX و کاهش بیان ژن BCL-2 شده و ترک مصرف و اجرای فعالیت بدنی بصورت منظم و با شدت متوسط بعد از دوره ترک منجر به کاهش بیان ژن BAX و افزایش بیان ژن BCL-2 گردید. در پژوهش، گروه CON نماینده رهایافتگان از مصرف مت‌آفتماین، گروه METH نماینده معادان در حال مصرف، گروه METH/w نماینده شرایط بلافاصله پس از ترک مت‌آفتماین و گروه METH/w/Tr نماینده شرایط ورزش پس از ترک مت‌آفتماین می‌باشد.

پژوهشگران بیان کردند که سوء مصرف مزمن مت‌آفتماین باعث القای آپوتوز از طریق فعال کردن مسیر مرگ سلولی میتوکندری در بافت‌های خاص می‌شود (۲۲ و ۲۳). از نظر افزایش احتمالی آپوتوز به دنبال مصرف مت‌آفتماین، پژوهش حاضر با پژوهش لو و همکاران (۲۰۲۱) همسو است (۵). از آنجایی که مت‌آفتماین یک مولکول لیوفیل کاتیونی است، می‌تواند از طریق غشای سلولی به میتوکندری وارد شده و منجر به اختلال در عملکرد طبیعی میتوکندری و سمیت میتوکندری شود (۲۴). مطالعات هیستوپاتولوژیک سمیت قلبی مت‌آفتماین در مدل‌های موش را اثبات می‌کنند که شامل التهاب قلب، بیماری عروق کرونر با بزرگ شدن قلب، پارگی میوکارد، فیروز قلبی و اختلال عملکرد میتوکندری میوکارد است (۲۵). بنا به پژوهش همسوی سان و همکاران (۲۰۱۹) بروز آپوتوز بعد از مصرف مزمن مت‌آفتماین در موش‌ها و

1. Integrin Subunit Beta 1 Binding Protein 2  
2. Protein kinase B  
3. glycogen synthase kinase 3 $\beta$   
4. Extracellular signal-regulated kinases  
5. Poly (ADP-ribose) polymerase

میزان صدمات سلولی را کاهش می‌دهد (۳۷). وانگ و همکاران (۲۰۲۱) بیان کردند که اجرای هشت هفته تمرین ترکیبی هوازی- مقاومتی منجر به کاهش عوامل التهاب محیطی مانند فاکتور نکروز تومور آلفا، اینترلوکین ۶ و اینترلوکین ۱ بتا در افراد ترک‌کننده مت‌آفتامین می‌شود (۳۸). با توجه به اینکه با افزایش التهاب، فرآیند آپوپتوز نیز تسریع و فاکتورهای آنتی آپوپتوتیک سرکوب می‌گردند، احتمالاً یکی از دلایل کاهش آپوپتوز بعد از دوره ترک (کاهش BAX و افزایش Bcl-2) همین مساله می‌باشد.

### نتیجه‌گیری

به‌طور کلی نتایج مطالعه حاضر نشان داد که شش هفته تمرین هوازی باعث کاهش فاکتورهای پروآپوپتوتیک (BAX) و افزایش فاکتورهای آنتی آپوپتوتیک (Bcl-2) در رت‌ها بعد از ترک مصرف مت‌آفتامین شد. چنین می‌توان گفت که به دنبال مصرف مت‌آفتامین فرآیند آپوپتوز افزایش می‌یابد، اما به دنبال ترک مصرف و به خصوص اجرای فعالیت هوازی با شدت متوسط این روند کاهش می‌یابد. علت این امر می‌تواند کاهش التهاب، بهبود ظرفیت ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی و یا تغییرات آنزیمی باشد. با این حال این امر نیاز به مطالعات بیشتر دارد. بررسی همزمان ژن پیش‌برنده آپوپتوز و ژن ضدآپوپتوزی از نقاط قوت پژوهش حاضر و عدم آنالیز بیان پروتئین‌های BAX و Bcl-2 به روش وسترن بلات از محدودیت‌های پژوهش حاضر است. همچنین پیشنهاد می‌شود که در پژوهش‌های آینده به بررسی شدت‌های مختلف تمرین هوازی و نیز به بررسی ژن‌های دیگر درگیر در آپوپتوز مانند ملوسین، کاسپاز-۳ و غیره پرداخته شود.

### تشکر و قدردانی

محققین از تمامی پرسنل محترم مرکز تحقیقات علوم حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) صمیمانه تشکر می‌کنند.

نشان داده شد که با اجرای فعالیت‌های هوازی، میزان کاسپاز ۳ کاهش یافت (۳۰). از دیگر مکانیسم‌های اثرگذار بر اثر تمرین منظم می‌توان به افزایش نسبت ADP به ATP و جلوگیری از بیان ژن BAX و افزایش بیان ژن Bcl-2 نام برد (۳۰). روشن است که بر اثر مصرف مت‌آفتامین فاکتور نکروز تومور آلفا و سایتوکاین‌های التهابی افزایش می‌یابد (۳۱). با مصرف مت‌آفتامین ترشح فاکتور نکروز تومور آلفا یک ساعت بعد و ترشح اینترلوکین ۶، ۲۴ ساعت بعد افزایش می‌یابد (۳۲). از طرفی فعالیت هوازی می‌تواند بر دستگاه‌های عصبی و هورمونی اثر گذاشته و منجر به کاهش فاکتور نکروز تومور آلفا گردد (۳۳). همچنین فعالیت بدنی هوازی منجر به افزایش بیان ژن اینترلوکین ۱۰ می‌شود و متعاقباً تولید عوامل پیش‌التهابی از جمله فاکتور نکروز تومور آلفا و اینترلوکین ۶ و نیز بیان ژن این عوامل را در عضله قلبی کاهش می‌دهد (۳۴).

متأسفانه پژوهشی که اثر ترک مصرف مت‌آفتامین را روی فاکتورهای آپوپتوتیک بسنجد، بسیار کم است. در مطالعه لوآن و همکاران (۲۰۱۸) مشخص شد که سطح مالون دی‌آلدئید در بیماران مصرف‌کننده مت‌آفتامین بالا است و این مقدار در اوایل دوره ترک همچنان بالا است ولی با افزایش مدت زمان دوره ترک، رفته رفته کاهش می‌یابد (۳۵). مالون دی‌آلدئید می‌تواند با دیگر اجزای سلولی مثل پروتئین‌های ساختار ژنومی واکنش داده و منجر به تولید ضایعات متنوعی شود که در نهایت باعث افزایش آپوپتوز همراه با علائم گسترده بیماری شود (۳۶). اما فعالیت ورزشی با شدت کم تا متوسط نیز منجر به کاهش مالون دی‌آلدئید شده (۳۷) و می‌توان چنین برداشت کرد که یکی از سازوکارهای کاهش فرآیند آپوپتوز بعد از دوره ترک و بعد از اجرای فعالیت هوازی در این پژوهش، احتمالاً همین مساله باشد. از طرفی اجرای فعالیت ورزشی بعد از ترک مصرف مت‌آفتامین‌ها، منجر به کاهش سطح رادیکال‌های آزاد در بدن و نیز تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی می‌شود. همچنین موجب افزایش مقاومت در برابر استرس اکسیداتیو شده و

### منابع

- Xu E, Liu J, Liu H, Wang X, Xiong H. Inflammasome activation by methamphetamine potentiates lipopolysaccharide stimulation of IL-1 $\beta$  production in microglia. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2018;13:237-53. <http://doi.org/10.1007/s11481-018-9780-y>.
- Kelly KA, Miller DB, Bowyer JF, O'Callaghan JP. Chronic exposure to corticosterone enhances the neuroinflammatory and neurotoxic responses to methamphetamine. *Journal of neurochemistry*. 2012;122(5):995-1009. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07864.x>.
- Akhgari M, Mobaraki H, Etemadi-Aleagha A. Histopathological study of cardiac lesions in methamphetamine poisoning-related deaths. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017;25:1-9. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07864.x>.

4. Galinato MH, Orio L, Mandyam CD. Methamphetamine differentially affects BDNF and cell death factors in anatomically defined regions of the hippocampus. *Neuroscience*. 2015;286:97-108. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.11.042>.
5. Luo Y, He H, Ou Y, Zhou Y, Fan N. Elevated serum levels of TNF -  $\alpha$ , IL - 6, and IL - 18 in chronic methamphetamine users. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental*. 2022;37(1):e2810. <http://doi.org/10.1002/hup.2810>.
6. Communal C, Sumandea M, de Tombe P, Narula J, Solaro RJ, Hajjar RJ. Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(9):6252-6. <http://doi.org/10.1073/pnas.092022999>.
7. Parrish AB, Freeland CD, Kornbluth S. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013;5(6):a008672. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a008672>.
8. Marzetti E, Privitera G, Simili V, Wohlgemuth SE, Aulisa L, Pahor M, et al. Multiple pathways to the same end: mechanisms of myonuclear apoptosis in sarcopenia of aging. *The Scientific World Journal*. 2010;10:340-9. <http://doi.org/10.1100/tsw.2010.27>.
9. Gross A. BCL-2 family proteins as regulators of mitochondria metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 2016;1857(8):1243-6. <http://doi.org/10.1016/j.bbabo.2016.01.017>.
10. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014;15(1):49-63. <http://doi.org/10.1038/nrm3722>.
11. Krasnova IN, Ladenheim B, Cadet JL. Amphetamine induces apoptosis of medium spiny striatal projection neurons via the mitochondria - dependent pathway. *The Federation of American Societies for Experimental Biology journal*. 2005;19(7):1-22. <http://doi.org/10.1096/fj.04-2881fje>.
12. Shan K, Kurrelmeyer K, Seta Y, Wang F, Dibbs Z, Deswal A, et al. The role of cytokines in disease progression in heart failure. *Current Opinion in Cardiology*. 1997; 12(3):218-23. <http://doi.org/10.1097/00001573-199705000-00002>.
13. Marshall D, Sack MN. Apoptosis: a pivotal event or an epiphenomenon in the pathophysiology of heart failure?. *Heart*. 2000; 84(4): 355-356. <http://doi.org/10.1136/heart.84.4.355>.
14. Akbar AY, Cui ZY, Hsu CJ, Li YZ, Rahman FF, Xia C, Yang AL, Lee SD. Anti-apoptotic and anti-fibrotic efficacy of exercise training in hypertensive hearts: A systematic review. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2023;10:1138705. <http://doi.org/10.3389/fcvm.2023.1138705>.
15. Aro J, Tokola H, Ronkainen VP, Koivisto E, Tenhunen O, Ilves M, et al. Regulation of cardiac melusin gene expression by hypertrophic stimuli in the rat. *Acta Physiologica*. 2013;207(3):470-84. <http://doi.org/10.1111/apha.12044>.
16. 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. <http://doi.org/10.1007/s11332-020-00670-2>.
17. Jahani M, Matin Homaie H, Farzanegi P. Effect of Continuous and Interval Exercise on the Necroptosis and Apoptosis of Endoplasmic Reticulum Proteins in the Heart of Diabetic Wistar Rats. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 2020;28(5):53-63. [In Persian]. <http://doi.org/10.29252/sjmu.28.5.53>
18. Mirdar S, Moghadasi N, Hamidain G. Effect of High Intensity Interval Training on Heart Apoptosis of Young Rats The Effect of High Intensity Interval Training on Heart Apoptosis of Young Rats. *Journal of Sport Biosciences*. 2019;11(1):49-61. [In Persian]. <http://doi.org/10.22059/jsb.2018.260980.1285>.
19. Liang L-Y, Wang M-M, Liu M, Zhao W, Wang X, Shi L, et al. Chronic toxicity of methamphetamine: oxidative remodeling of pulmonary arteries. *Toxicology In Vitro*. 2020;62:104668. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104668>.
20. Rezaeian L, Kalalian-Moghaddam H, Mohseni F, Khaksari M, Rafeiee R. Effects of berberine hydrochloride on methamphetamine-induced anxiety behaviors and relapse in rats. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2020 Nov;23(11):1480. <http://doi.org/10.22038/ijbms.2020.47285.10884>.
21. Ávila RA, Rossi EM, de Carvalho GM, Krause M, Leopoldo AS, Carneiro MTW, et al. Moderate - intensity aerobic training reduces cardiac damage attributable to experimental iron overload in rats. *Experimental Physiology*. 2021;106(8):1772-84. <http://doi.org/10.1113/EP089429>.
22. Shin EJ, Tran HQ, Nguyen PT, Jeong JH, Nah SY, Jang CG, Nabeshima T, Kim HC. Role of mitochondria in methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity: involvement in oxidative stress, neuroinflammation, and pro-apoptosis—a review. *Neurochemical research*. 2018;43:66-78. <http://doi.org/10.1007/s11064-017-2318-5>.
23. Pillai S, Cesarz B, Boulware C, Khan A. Hypotension, severe hyperthermia (42 C), rhabdomyolysis, and disseminated intravascular coagulation induced by lethal dose of methamphetamine. *Cureus*. 2019;11(7). <http://doi.org/10.7759/cureus.5245>.
24. Wenlock MC, Potter T, Barton P, Austin RP. A method for measuring the lipophilicity of compounds in mixtures of 10. *Journal of Biomolecular Screening*. 2011;16(3):348-55. <http://doi.org/10.1177/1087057110396372>.
25. Liou C-M, Tsai S-C, Kuo C-H, Williams T, Ting H, Lee S-D. Chronic methamphetamine exposure induces cardiac fas-dependent and mitochondria-dependent apoptosis. *Cardiovascular toxicology*. 2014 ;14(2):134-44 . <http://doi.org/10.1007/s12012-013-9237-8>.
26. Sun X, Wang Y, Xia B, Li Z, Dai J, Qiu P, et al. Methamphetamine produces cardiac damage and apoptosis by decreasing melusin. *Toxicology and applied pharmacology*. 2019;378:114543. <http://doi.org/10.1016/j.taap.2019.03.015>.
27. Unsöld B, Kaul A, Sbroggiò M, Schubert C, Regitz-Zagrosek V, Brancaccio M, et al. Melusin protects from cardiac rupture and improves functional remodelling after myocardial infarction. *Cardiovascular research*. 2014;101(1):97-107. <http://doi.org/10.1093/cvr/cvt235>.
28. Gu R, Zheng D, Bai J, Xie J, Dai Q, Xu B. Altered melusin pathways involved in cardiac remodeling following acute myocardial infarction. *Cardiovascular Pathology*. 2012;21(2):105-11. <http://doi.org/10.1016/j.carpath.2011.03.002>.



29. Yang G, Zeng X, Li J, Leung C-K, Zhang D, Hong S, et al. Protective effect of gastrodin against methamphetamine-induced autophagy in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells via the AKT/mTOR signaling pathway. *Neuroscience Letters*. 2019;707:134287. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134287>.
30. Maherinia H, Peeri M, Azarbayjani MA, Delfan M. Aerobic exercise training combined with probiotic supplement improves antioxidant defence of cardiomyocytes by regulating Nrf2 and caspase3 gene expression in type 2 diabetic rats. *Comparative Exercise Physiology*. 2022;18(3):255-63. <http://doi.org/10.3920/CEP200089>.
31. Gonçalves J, Martins T, Ferreira R, Milhazes N, Borges F, Ribeiro CF, Malva JO, Macedo TR, Silva AP. Methamphetamine - induced early increase of il - 6 and tnf -  $\alpha$  mRNA expression in the mouse brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008 ;1139(1):103-11. <http://doi.org/10.1196/annals.1432.043>.
32. Coelho-Santos V, Gonçalves J, Fontes-Ribeiro C, Silva AP. Prevention of methamphetamine-induced microglial cell death by TNF- $\alpha$  and IL-6 through activation of the JAK-STAT pathway. *Journal of neuroinflammation*. 2012;9(1):1-14. <http://doi.org/10.1186/1742-2094-9-103>.
33. Kordi N, Shafiee N, Mirzaei S, Minavand K, Heidari N. The effect of continuous and interval cardiac rehabilitation exercise training on tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ), and interleukin 6 (IL-6) in patients with coronary artery bypass graft. *Journal of Isfahan Medical School*. 2018;36(486):737-42. [In Persian] <http://doi.org/10.22122/JIMS.V36I486.10019>.
34. Mohammad K, Mateen Homaie H, Farzanegi P. The effect of aerobic exercise with pistachio skin extract on the expression of Bax, caspase-3 and Bcl-2 in heart tissue of fat-fed rats. *Kashan University of Medical Sciences Journal (FEYZ)*. 2022;26(5):521-9. [In Persian]. <http://doi.org/10.48307/FMSJ.2022.26.5.521>.
35. Luan X, Chen H, Qiu H, Shen H, Zhao K, Ren W, et al. Association between serum malondialdehyde levels and depression during early methamphetamine withdrawal. *Neuroscience letters*. 2018;687:22-5. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.09.021>.
36. Ansley DM, Wang B. Oxidative stress and myocardial injury in the diabetic heart. *The Journal of pathology*. 2013;229(2):232-41. <http://doi.org/10.1002/path.4113>.
37. Toborek M, Seelbach MJ, Rashid CS, András IE, Chen L, Park M, Esser KA. Voluntary exercise protects against methamphetamine-induced oxidative stress in brain microvasculature and disruption of the blood-brain barrier. *Molecular neurodegeneration*. 2013;8:1-1. <http://doi.org/10.1186/1750-1326-8-22>.
38. Wang J, Lu C, Zheng L, Zhang J. Peripheral inflammatory biomarkers of methamphetamine withdrawal patients based on the neuro-inflammation hypothesis: the possible improvement effect of exercise. *Frontiers in Psychiatry*. 2021;12:795073. <http://doi.org/10.3389/fpsy.2021.795073>.



# The Effects of aerobic training on the expression of some pro- and anti-apoptotic genes in the myocardium of rats after methamphetamine withdrawal

Negin Kordi<sup>1</sup>, Mohammad Azizi<sup>2\*</sup>, Mohammad Samadi<sup>3</sup>, Worya Tahmasebi<sup>4</sup>

1. PhD Candidate, Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Razi University, Kermanshah, Iran
2. Associate Professor, Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Razi University, Kermanshah, Iran
3. Assistant Professor, Exercise Physiology Research Center, Life Style Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Assistant Professor, Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Razi University, Kermanshah, Iran

Received: 2023/09/01

Revised: 2023/09/11

Accepted: 2023/10/19

## Abstract

### \*Correspondence:

### Email:

azizimhammad@gmail.com

**Introduction and Purpose:** The use of methamphetamine leads to numerous cell damage. This study aimed to investigate the effect of six weeks of aerobic training on the expression of pro- and anti-apoptotic genes in the myocardium of rats after withdrawal from ethamphetamine.

**Materials and Methods:** 32 male Wistar rats were randomly assigned to four groups (methamphetamine group, methamphetamine then withdrawal group, methamphetamine then withdrawal then training group and methamphetamine then withdrawal then normal life without intervention group (control group)). Methamphetamine was injected intraperitoneally and in the first week in the amount of 10 mg/kg twice a day. From the second to the sixth week, every week, 1 mg/kg was added to the injection dose. The training protocol includes 6 weeks of aerobic training on a treadmill with moderate intensity for 60 minutes a day and 5 days a week. The expression levels of BAX and Bcl-2 genes were evaluated in rat myocardial tissue. The data were analyzed by one-way analysis of variance at a significance level of  $P \leq 0.05$ .

**Results:** Methamphetamine increased apoptosis by increasing BAX gene expression, decreasing Bcl-2 gene expression and BAX/Bcl-2 ratio. methamphetamine withdrawal and aerobic training caused a significant decrease in BAX gene expression, BAX/Bcl-2 ratio and an increase in Bcl-2 gene expression ( $P \leq 0.05$ ).

**Discussion and Conclusion:** Methamphetamine use can increase the expression of some pro-apoptotic genes and decrease the expression of myocardial anti-apoptotic genes. On the other hand, methamphetamine withdrawal and aerobic training can reduce the process of apoptosis in the myocardium of rats.

**Key Words:** Continuous Training, BAX, Bcl-2, Heart, Crystal Meth.