

تأثیر تمرین هوازی با شدت متوسط و زیاد بر بیان ژن‌های آپوپتوزی BAX (BCL2 associated X) و BCL2 (B-cell lymphoma 2) میوکارد موش

صحرائی پس از کم‌خونی و خون‌رسانی مجدد

حامد علی‌زاده پهلوانی^۱، حمید رجبی^۲، محمد نبیونی^۳، پژمان معتمدی^۴، ندا خالدی^۵،
اکرم تایانلو^۶

۱. استادیار فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه علوم پزشکی بهبهان، بهبهان، ایران
(نویسنده مسئول)

۲. استاد فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه خوارزمی

۳. دانشیار زیست‌شناسی سلولی و تکوین، دانشگاه خوارزمی

۴ و ۵. استادیار فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه خوارزمی

۶. دانشجوی دکتری زیست‌شناسی جانوری، دانشگاه خوارزمی

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۵/۱۱

چکیده

هدف از انجام پژوهش حاضر، تعیین تأثیر تمرین هوازی با شدت متوسط و زیاد بر بیان ژن‌های BAX و BCL2 میوکارد موش‌های صحرائی پس از کم‌خونی و خون‌رسانی مجدد بود. در این پژوهش از ۲۶ سر موش صحرائی ویستار دوماهه با وزن تقریبی $25/25 \pm 225/25$ گرم استفاده شد. برای بررسی ایجاد سکتۀ حاصل از تزریق ایزوپرنالین، مطالعه‌ای راهنما در گروه تجربی برای گروه سکتۀ (تعداد = هفت) و گروه کنترل (تعداد = هفت) انجام شد و سکتۀ بطن چپ پس از تزریق ایزوپرنالین با تکنیک تری کروماتون تأیید شد. سپس، موش‌های گروه پژوهش برای اندازه‌گیری بیان ژن‌ها به سه گروه تمرین هوازی با شدت متوسط (تعداد = چهار)، شدت زیاد (تعداد = چهار) و کنترل (تعداد = چهار) تقسیم شدند. موش‌های گروه پژوهش به مدت یک هفته با دویدن روی نوار گردان آشنا شدند و تمرین هوازی یک‌ماهه را با شدت متوسط و زیاد با تواتر سه جلسه در هفته اجرا کردند. پس از دو روز استراحت، با فاصله ۲۴ ساعت به موش‌ها ایزوپرنالین تزریق شد، اما

1. Email: alizadehh76@yahoo.com

2. Email: hrajabi@khu.ac.ir

3. Email: nabiyuni@khu.ac.ir

4. Email: Pezhman.Motamedi@yahoo.com

5. Email: n.khaledi@khu.ac.ir

6. Email: a.tayanloo@gmail.com

به موش‌های گروه کنترل فقط ایزوپرنالین تزریق شد. از فرمول ct-2 برای اندازه‌گیری بیان ژن BAX و BCL2 و از آزمون آماری تی مستقل برای مقایسه دو گروه سکنه و کنترل در مطالعه راهنما و از آزمون آنوا برای مقایسه گروه‌ها استفاده شد. نتایج پژوهش نشان داد که تمرین هوازی متوسط و زیاد می‌تواند بیان ژن BAX و BCL2 را به ترتیب کاهش و افزایش دهد، اما این تغییرات در تمرین هوازی با شدت متوسط و زیاد معنادار نبود؛ بنابراین، به نظر می‌رسد این شدت و مدت زمان تمرین نمی‌تواند مسیرهای آنتی‌آپوپتوزی حاصل از ورزش را برای به حداقل رساندن عوارض سکنه فعال کند.

واژگان کلیدی: آپوپتوز، تمرین هوازی با شدت متوسط و شدید، BAX، BCL2، ایسکمی-ریپرفیوژن، میوکارد.

مقدمه

قبل از سال ۱۹۰۰ میلادی بیماری‌های عفونی و سوءتغذیه شایع‌ترین علل مرگ‌ومیر در جهان محسوب می‌شدند، اما در حال حاضر بیماری‌های قلبی-عروقی شایع‌ترین علت مرگ‌ومیر در بسیاری از نقاط جهان هستند. اگر چنین وضعیتی ادامه یابد، میزان مرگ‌ومیر در سال‌های آینده می‌تواند افزایش یابد (۱). طبق گزارش‌های پژوهشی تجمع لیپوپروتئین‌ها، آسیب اندوتلیوم و التهاب از جمله فرایندهای متعددی هستند که در شروع و پیشرفت آترواسکلروز سهیم هستند. از طرفی، هیپوکسی یا کمبود اکسیژن میوکارد موجب مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول قلبی به نام آپوپتوز^۱ می‌شود؛ به طوری که سلول‌ها و میتوکندری‌ها متورم می‌شوند و یکپارچگی غشای خود را از دست می‌دهند و در نتیجه، مواد داخل سلولی مانند پروتئین‌های پیش‌آپوپتوزی آزاد می‌شوند که این موضوع سبب بروز واکنش‌های التهابی و تشدید آسیب اولیه می‌شود؛ در مقابل، پروتئین‌های آنتی‌آپوپتوزی می‌توانند از طریق فعالیت آنتی‌آپوپتوزی و تأثیر بر کاسپازها از مرگ سلول توسط محرک‌ها بکاهند. در عین حال، پروتئین پیش-آپوپتوزی (Bax)^۲ و پروتئین آنتی‌آپوپتوزی (Bcl-2)^۳ از جمله مهم‌ترین پروتئین‌های درگیر در آپوپتوز هستند و از آن‌ها به عنوان شاخصی برای کاهش یا افزایش مرگ سلولی استفاده می‌شود؛ از این رو، هر عاملی که بتواند نسبت Bcl-2 به Bax را افزایش دهد، می‌تواند در کاهش آپوپتوز مؤثر واقع شود (۲). به هر حال، عوامل متعددی می‌توانند از شدت آپوپتوز میوکارد بکاهند که مهم‌ترین آن‌ها فعالیت بدنی است؛ زیرا، خطر گسترش بیماری شریان کرونری در بزرگسالان آماده یا فعال در مقایسه با افراد غیرفعال ۳۰ تا ۴۰ درصد کمتر است (۱). همچنین، در تأیید این موضوع مطالعه‌ای نشان داد که

1. Apoptosis
2. BCL2 Associated X
3. B-Cell Lymphoma 2

تمرین هوازی سبب افزایش عوامل آنتی‌آپوپتوزی نظیر Bcl2 و کاهش عوامل آپوپتوزی نظیر Bad در میوکارد می‌شود (۳)؛ بنابراین، به نظر می‌رسد یکی از دلایل احتمالی فواید ورزش برای محافظت قلبی، کاهش عوامل آپوپتوزی نظیر Bax و Bad^۱ و همچنین افزایش عوامل آنتی‌آپوپتوزی نظیر Bcl2 در سلول‌های میوکاردی باشد. در این راستا، مطالعه‌ای نشان داد که فعالیت ورزشی به مدت ۱۲ هفته افزایش نسبت Bax به Bcl2، آپوپتوز و ریمودلینگ^۲ میوکارد موش‌های پیر را کاهش می‌دهد (۴). مطالعه‌ای دیگر نشان داد که نسبت Bcl2 به Bax در گروه تمرین استقامتی، به مدت هشت هفته در مقایسه با گروه کنترل و تمرین حاد بیشتر بود (۵). براساس پژوهشی دیگر نیز تمرین ورزشی بیان پروتئین‌های حفاظتی قلب نظیر Bcl2 و HSP72 را در موش‌های فشارخونی افزایش داد (۶)؛ بنابراین، می‌توان گفت که برنامه ورزشی منظم می‌تواند ظرفیت آنتی‌آپوپتوزی بیماران کرونری را بهبود بخشد، اما جعفری و همکاران (۷) در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که تمرین هوازی به مدت ۱۲ هفته بر بیان Bcl-2 تأثیر معناداری ندارد. در این راستا پژوهشی نشان داد که گروه تمرین ورزشی به تنهایی یا همراه با ویتامین E و اسید لیپوئیک آلفا نسبت به گروه بدون مکمل اثر معناداری بر bcl2، bax و bcl2/bax ندارد؛ البته این پژوهش نشان داد که در گروه تمرین کرده همراه با مکمل در مقایسه با گروه تمرین کرده بدون مکمل bax کاهش داشت (۸). پژوهشی دیگر نشان داد که بیان پروتئین آپوپتوزی BAD بعد از تمرین‌های سیزده هفته‌ای کاهش نداشت (۳). در مجموع، می‌توان گفت که رابطه آپوپتوز با برنامه ورزشی منظم می‌تواند به دلیل کم‌اکسیژنی موقت، افزایش عوامل اکسیدانی و التهابی در حین ورزش باشد؛ به طوری که ادامه فعالیت بدنی باعث افزایش برون‌ده قلبی، برداشت اکسیژن محیطی، افزایش عوامل آنتی‌اکسیدانی، کاهش عوامل التهابی و نیز بهبود ظرفیت هوازی می‌شود و در نهایت، مقاومت در برابر مرگ سلولی را افزایش می‌دهد؛ البته، مقادیر بیشتر فعالیت بدنی باعث فواید زیادتری می‌شود (۹)؛ به عبارت دیگر، افرادی که برنامه فعالیت بدنی منظم را به مدت طولانی یا با شدت زیادتری حفظ می‌کنند، احتمالاً فواید بیشتری به دست می‌آورند نسبت به افرادی که فعالیت بدنی کمتری دارند (۱۰). حال، با توجه به اینکه در برخی پژوهش‌ها میزان پروتئین‌های آپوپتوزی و آنتی‌آپوپتوزی (نه بیان ژن) بررسی شده است، دیگر مطالعات با شدت و مدت زمان متفاوت تمرین، نتایجی متناقض را گزارش کرده‌اند و همچنین، پژوهش‌های دیگر نشان داده‌اند که فعالیت ورزشی باعث اتساع عروق و محافظت میوکارد می‌شود (۱۱)، آیا می‌توان گفت افراد با صرف مدت زمان محدود برای ورزش می‌توانند با افزایش شدت و با مدت زمان کم به همان نتایج ورزش با شدت متوسط و مدت زمان زیاد

1. Bcl-2-Associated Death Promoter
2. Remodling

برسند؟ در این پژوهش سعی داریم تأثیر تمرین ورزشی هوازی با شدت متوسط و زیاد و به مدت چهار هفته را بر نشانگرهای بیان ژن bax و bcl2 به منظور کاهش میزان آپوپتوز در موش‌های متحمل به سکتة بررسی کنیم. همچنین، هدف دیگر پژوهش حاضر مقایسه دو شدت متفاوت تمرین هوازی با شدت متوسط و زیاد به منظور کاهش سکتة است.

روش پژوهش

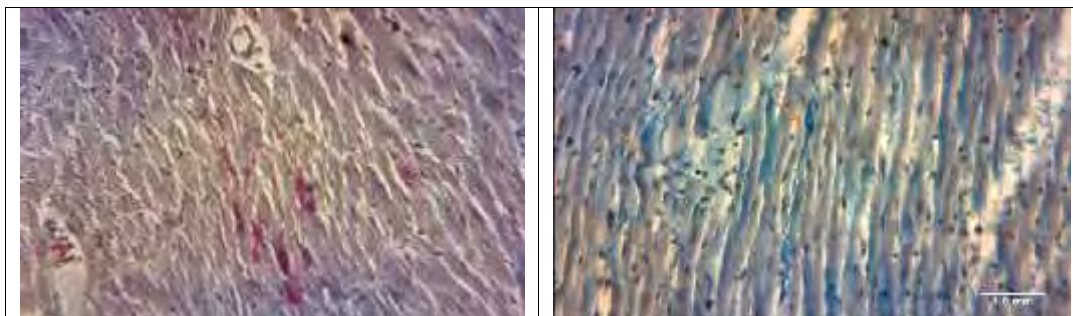
در این پژوهش از ۲۶ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار دو تا سه ماهه با وزن تقریبی $25/25 \pm$ گرم استفاده شد. موش‌های گروه راهنما به منظور تأیید سکتة با ایزوپرنالین، به گروه تجربی سکتة (تعداد = هفت) و گروه کنترل (تعداد = هفت) و موش‌های گروه پژوهش به منظور اندازه‌گیری بیان ژن به گروه‌های تمرین هوازی با شدت متوسط (تعداد = چهار)، تمرین هوازی با شدت زیاد (تعداد = چهار) و کنترل (تعداد = چهار) تقسیم شدند. در ادامه میزان فیبروز بطن چپ گروه راهنما پس از تزریق ایزوپرنالین (با کد I5627 از شرکت سیگما) در دو روز متوالی با دوز ۱۵۰ و ۱۲۵ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن (۱۲) با تکنیک رنگ‌آمیزی تری کروماسون^۱ بررسی شد. سپس مشخص شد که این مقدار دارو باعث فیبروز در گروه راهنما می‌شود؛ زیرا، آزمون تی مستقل نشان داد که شدت فیبروز به‌دست‌آمده از نرم‌افزار ایمیج جی^۲ در گروه موش‌هایی که به آن‌ها ایزوپرنالین تزریق شد و گروه سالم تفاوت معناداری وجود دارد؛ به‌طوری‌که فیبروز گروه سکتة نسبت به گروه سالم از میانگین بیشتری برخوردار بود (جدول شماره یک).

جدول ۱- میزان فیبروز (پیکسل) در گروه پابلوت

گروه	تعداد	میانگین فیبروز	انحراف معیار	لون	معناداری
ایسکمی ریپرفیوژن	۷	۱۰۷/۸۵	۱۱/۹۵	۰/۰۹۸	۰/۰۰
سالم	۷	۲۴/۵۷	۱۷/۱۷		

نتایج نشان می‌دهد که تزریق ایزوپرنالین با دوز ۱۵۰ و ۱۲۵ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن در دو روز متوالی توانایی ایجاد فیبروز در قلب موش‌ها را دارد که نشان‌دهنده سکتة قلبی است (شکل شماره یک).

1. Mason Trichrome Staining
2. Image j



شکل ۱- تصاویر گروهی که به آن‌ها ایزوپرنالین تزریق شد (راست) و گروه سالم (چپ)

سپس، گروه هوازی با شدت متوسط و زیاد به مدت یک هفته با دویدن روی نوار گردان آشنا شدند و تحت دوره تمرین یک‌ماهه با تواتر سه جلسه در هفته قرار گرفتند (۱۳) (جدول شماره دو). پروتکل تمرین شامل سه بخش گرم کردن، بدنه اصلی تمرین و سرد کردن بود. بخش گرم کردن و سرد کردن هر دو به مدت زمان شش دقیقه و با سرعت ۱۵ تا ۲۰ متر در دقیقه معادل ۵۰ تا ۶۰ درصد VO_{2max} و مسافت تقریبی ۹۰ تا ۱۲۰ متر اجرا شد. بدنه اصلی تمرین به ترتیب در تمرین هوازی با شدت متوسط و زیاد به مدت زمان ۳۰ دقیقه و ۱۵ تا ۲۳ دقیقه و سرعت ۲۳ تا ۲۵ متر در دقیقه معادل ۷۰ تا ۷۵ درصد VO_{2max} و ۳۰ تا ۳۸ دقیقه معادل ۸۵ تا ۱۰۰ درصد VO_{2max} با مسافت یکسان ۶۹۰ تا ۷۵۰ متر اعمال شد. در ادامه موش‌های گروه کنترل و موش‌های گروه هوازی با شدت متوسط و زیاد پس از یک ماه در دو روز متوالی استراحت کردند و با فاصله ۲۴ ساعت به آن‌ها داروی ایزوپرنالین تزریق شد.

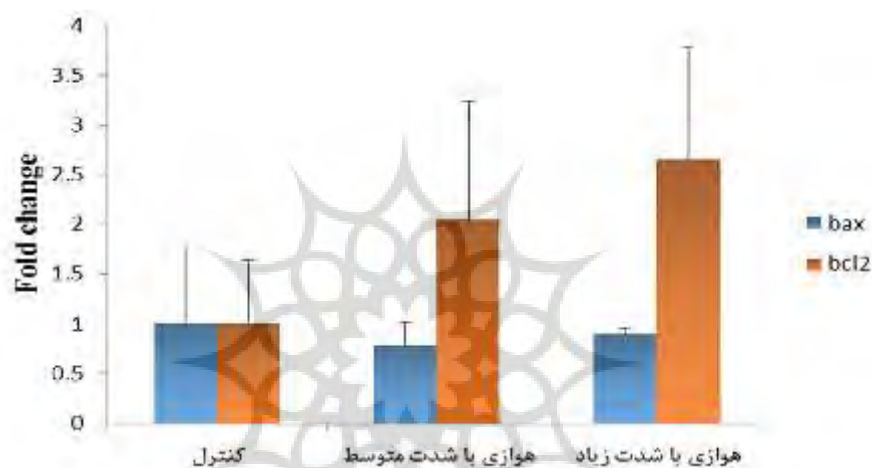
جدول ۲- پروتکل تمرین هوازی با شدت متوسط و زیاد

مؤلفه تمرین	گرم کردن	بدنه اصلی تمرین هوازی با شدت متوسط	بدنه اصلی تمرین هوازی با شدت زیاد	سرد کردن
زمان تمرین (دقیقه)	۶ دقیقه	۳۰ دقیقه	۱۵ تا ۲۳ دقیقه	۶ دقیقه
شدت تمرین (VO_{2max})	۵۰ تا ۶۰ درصد	۷۵ تا ۷۰ درصد	۸۵ تا ۱۰۰ درصد	۵۰ تا ۶۰ درصد
سرعت (دقیقه/متر)	۱۵ تا ۲۰	۲۳ تا ۲۵	۳۰ تا ۳۸	۱۵ تا ۲۰
مسافت	۹۰ تا ۱۲۰ متر	۶۹۰ تا ۷۵۰ متر	۶۹۰ تا ۷۵۰ متر	۹۰ تا ۱۲۰ متر
شیب نوار گردان (درجه)	صفر	۵ تا ۲۰ درجه	۵ تا ۲۰ درجه	صفر

برای استخراج RNA، سنتز cDNA و آماده کردن Real-time در ادامه، RNA نمونه‌های بطن چپ موش‌ها به وسیله ازلت مایع و هاون سنگی با روش استخراج دستی و پروتکل استاندارد ترایزول با کد ET101 از شرکت کانادایی Civic Bio science استخراج شدند؛ به طوری که به ازای هر ۳۰ تا ۶۰ میلی گرم بافت، یک میلی لیتر محلول ترایزول به میکروتیوب حاوی بافت اضافه شد. در ادامه نمونه‌ها پس از یک روز از فریز خارج شدند و به اندازه ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم با کد ۱۰۲۴۴۵ از شرکت مرک آلمان به محلول مایع اضافه شد. سپس، محلول حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ در دمای چهار درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. در ادامه، محلول رویی پس از سانتریفیوژ برداشته شد و به همان اندازه ایزوپروپانول با کد ۱۰۹۶۳۴ از شرکت مرک آلمان به آن اضافه شد. سپس، نمونه‌ها پس از یک شب در فریز منفی ۸۰ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ در دمای چهار درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. در ادامه، رسوب ایجاد شده در ته میکروتیوب به وسیله الکل ۷۵ درصد به مقدار یک میلی لیتر به مدت پنج دقیقه با دور ۷۵۰۰ در دمای چهار درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. در نهایت، ۳۳ میکرولیتر آب تثبیت کننده RNA به رسوب در دمای ۵۵ تا ۶۰ اضافه شد تا RNA در آب حل شود. تهیه cDNA با استفاده از پروتکل کیت ویوانتیس با کد RTPL12 از کشور مالزی انجام شد. همچنین، پرایمرهای بتا اکتین (فوروارد CTAAGGCCAACCGTGAAAAGATG و ریورز AATTGGCGATGAACTGGACAAC)، bax (فوروارد TGGTACGACCAGAGGCATACAG و ریورز AGCAAAGTAGAAAAGGGCAACC) و bcl2 (فوروارد GAGGATTGTGGCCTTCTTTG و ریورز CATGCTGGGGCCATATAGTT) با نرم افزار Primer3 طراحی و استفاده شدند. سپس، از طریق سایت ncbi به منظور اختصاصی بودن بررسی شدند. برای آماده کردن مواد ریل تایم، چهار لاندنا cDNA از هر گروه پژوهش به چاهک‌های دستگاه ریل تایم ریخته شد. سپس، شش لاندنا از محلول مستر میکس (نیم لاندنا پرایمر فوروارد و ریورز، نیم لاندنا آب و پنج لاندنا مستر میکس) به آن اضافه شد. در ادامه، نمونه‌ها ورتکس شدند و به مدت پنج دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد (واسرشته شدن اولیه)، ۱۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد (واسرشته شدن ثانویه)، ۱۵ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد (اتصال پرایمرها) و ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد (تکثیر) ران شدند. واکنش از مرحله دوم به بعد برای ۴۰ سیکل تکرار شد. ct‌های مربوط به واکنش توسط نرم افزار دستگاه استخراج و ثبت شدند. در این پژوهش از روش‌های آماری تی مستقل برای مقایسه میزان فیبروز گروه سالم و گروهی که به آن‌ها ایزوپرنالین تزریق شد، استفاده شد. همچنین، از فرمول 2^{-ct} برای fold change و در نهایت از روش آماری آنوا برای مقایسه بیان bax و bcl2 در گروه‌های هوازی با شدت متوسط و زیاد استفاده شد.

نتایج

نتایج پژوهش نشان داد که میزان بیان ژن BAX و BCL2 در گروه هوازی با شدت متوسط به ترتیب کاهش (تا حدود ۰/۷۸ برابر) و افزایش (تا حدود ۲/۰۴ برابر) و در گروه هوازی با شدت زیاد نیز کاهش (تا حدود ۰/۹ برابر) و افزایش (تا حدود ۲/۶۵ برابر) داشته است، اما در هیچ‌کدام از تمرین‌های هوازی با شدت متوسط و زیاد معنادار نبوده است (شکل شماره دو).



شکل ۲- میزان Fold change ژن‌های BAX و BCL2 در گروه‌های کنترل و تمرین هوازی با شدت متوسط و زیاد

برای بررسی سطح معناداری از مقادیر 2^{-CT} ژن‌های BAX و BCL2 استفاده شد و نیز آزمون آنوا برای مقایسه گروه‌ها به کار برده شد (جدول شماره سه).

جدول ۳- مقایسه ژن های bax و bcl2 در گروه های کنترل (ایسکمی) و تجربی (هوازی با شدت متوسط و زیاد)

گروه های پژوهش	CTBax 2-	CTBcl2 2-	میانگین		انحراف استاندارد		معناداری	
			bax	bcl2	bax	bcl2	bax	bcl2
کنترل	۱/۰۶	۲/۹۳	۱	۱	۰/۸	۰/۶۴		
	۰/۸۵	۰/۵۲						
	۰/۸۹	۰/۲۵						
هوازی با شدت متوسط	۱/۲۰	۰/۳						
	۰/۹۸	۵/۴۷	۰/۷۸	۲/۰۴	۰/۲۴	۱/۲	۰/۶۳۲	۰/۵۳۹
	۰/۶۸	۰/۵۴						
هوازی با شدت زیاد	۰/۱۷	۰/۱۶						
	۱/۳۲	۲						
	۰/۹۲	۰/۴۹	۰/۹۰	۲/۶۵	۰/۰۶	۱/۱۳		
	۱/۰۱	۵/۷۸						
	۰/۷۱	۲/۶۲						
	۰/۹۸	۱/۷۱						

با توجه به نتایج جدول شماره سه، میزان بیان ژن bax و bcl2 در گروه های کنترل و تجربی تغییرات معناداری نداشته است؛ زیرا، مقدار آماره bax و bcl2 به ترتیب (۰/۶۳۲ و ۰/۵۳۹) $P =$ گزارش شد که بزرگ تر از مقدار معناداری ۰/۰۵ است، اما همان طور که در نمودار fold change مشاهده شد، میزان بیان ژن bax و bcl2 با تمرین هوازی با شدت متوسط و زیاد در مقایسه با گروه کنترل کاهش و افزایش نشان داد.

بحث و نتیجه گیری

یافته های گروه پیلوت نشان داد که تزریق ایزوپرنالین با دوز ۱۵۰ و ۱۲۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن می تواند سبب القای فیبروز در میوکارد شود. در این راستا، در پژوهش ها مسیر ایجاد کم اکسیژنی میوکارد با القای ایزوپرنالین شامل مواردی از قبیل افزایش پراکسیداسیون لیپید، افزایش رادیکال های آزاد، کاهش آنتی اکسیدان های اگزوزنی، افزایش تجمع لیپید، تحریک زیاد گیرنده 1 میوکارد، افزایش کلسیم درون سلولی و نکروز همراه با انتشار التهاب ذکر شده است که همه این عوامل به آسیب غشای سلول منجر می شوند. در نهایت، آسیب غشای سلول موجب رهائش آنزیم های درون سلولی و آسیب به میوکارد می شود (۱۴). در تأیید این مطلب پژوهشی اثر مشتقات ایزوپرنالین

به نام ایزوپروتونول را نشان داد؛ به طوری که ایزوپروتونول سبب افزایش بیش از حد کلسیم درون سلولی ناشی از کاتکولامین‌ها و افزایش ورودی کلسیم از کانال کلسیم نوع L می‌شود. در ادامه، کلسیم سیتوزولی و میتوکندری افزایش می‌یابد و به کاهش کلسیم پلازما منجر می‌شود و گیرنده حساس به کلسیم غده پاراتیروئید تحریک شده و ترشح هورمون پاراتیروئید فعال می‌شود. این هورمون الکتروپیک بیشتر به افزایش کلسیم درون سلولی کمک می‌کند و تجمع بیش از حد کلسیم به افزایش کم اکسیژنی در ارگانل‌ها و نفوذپذیری میتوکندری منجر می‌شود. تورم اسمزی و تجزیه ارگانل‌ها با فقدان ATP، سبب نکروز و فیبروز و جراحی میوکارد می‌شود که در نهایت ROS به این وقایع کمک می‌کند (۱۵). همچنین، هنگام آسیب ایسکمی ریبریویژن قلبی، تولید بیش از حد ROS، افزایش کلسیم درون سلولی، نشت H در سطوح میتوکندری و التهاب تحمیل می‌شود که به باز شدن منافذ نفوذپذیر میتوکندری منجر می‌شود. این موضوع می‌تواند موجب کاهش ATP، اکسیداسیون برگشت‌ناپذیر پروتئین، چربی و DNA در کاردیومیوسیت‌ها شود و فرایند آپوپتوز را شروع کند (۱۶)؛ زیرا، اکسیداسیون در نهایت به جابه‌جایی بازها در DNA مانند تبدیل جفت باز AT به GC و CG به TA منجر می‌شود و سبب ایجاد جهش ترانس ورژن می‌گردد (۱۷)؛ در مقابل، پژوهش‌ها نشان داده‌اند که تمرین ورزشی عملکرد سیستمیک میوکارد را در موش‌های مبتلا به انفارکتوس بهبود می‌بخشد که از تعدیل بیان پروتئین‌های سیگنالینگ کلسیم درون سلولی مانند کلسیکوئسترین و کانال کلسیم نوع L ناشی می‌شود (۱۸). در تأیید مطلب ذکر شده، مطالعه دیگری نشان داد که صرف نظر از شدت، حجم و نوع فعالیت ورزشی، شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی و پیش‌اکسیدانی پس از تمرین بدنی به افزایش و کاهش تمایل دارند (۱۹). همه این موارد نشان‌دهنده محافظت میوکارد در برابر انفارکتوس حاصل از انجام تمرین‌های ورزشی هستند.

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که یک ماه تمرین هوازی با شدت متوسط، میزان بیان ژن bax و bcl2 را پس از القای کم اکسیژنی و خون‌رسانی مجدد به وسیله تزریق ایزوپرنالین به ترتیب کاهش و افزایش می‌دهد، اما این کاهش و افزایش معنادار نبود. برخلاف نتایج این پژوهش، کانگ^۱ و همکاران (۲۰) در سال ۲۰۰۴ هاپیروتروفی فیزیولوژیک و پاتولوژیک را به ترتیب با رژیم ورزشی و تغذیه با نمک زیاد ایجاد کردند و نشان دادند که تمرین ورزشی سبب ایجاد تغییرات پروتئین خانواده bcl2، کاسپازها و افزایش نسبت bcl2/bax می‌شود. لاجویی و همکاران (۶) در سال ۲۰۰۴ نشان دادند که تمرین ورزشی به مدت پنج روز در هفته و به مدت هشت هفته با سرعت ۱۸ متر در دقیقه به مدت ۱۲۰ دقیقه

در روز می‌تواند پروتئین‌های آنتی‌آپوپتوزی bcl2 و hsp72 را افزایش دهد. همچنین، دلشیو^۱ و همکاران (۵) در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که میزان bcl2 در گروه تمرین استقامتی، به مدت هشت هفته نسبت به دیگر گروه‌های پژوهش بیشتری افزایش را داشته است. در تأیید پیشینه پژوهش حاضر، مارف^۲ و همکاران (۲۱) در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که تمرین ورزشی با افزایش (SIRT1)^۳ و (SIRT7) به کاهش BAX و افزایش BCL2 منجر می‌شود. همچنین، در سال ۲۰۱۳ بوم واک^۴ و همکاران (۴) نشان دادند که تمرین ورزشی می‌تواند سطح کاسپاز ۳ و نیز نسبت BAX/BCL2 را کاهش دهد و در نهایت باعث افزایش و کاهش پروتئین BCL2 و BAX شود. در این راستا، سانتانا^۵ و همکاران (۳) در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که تمرین ورزشی به مدت ۱۳ هفته سبب افزایش بیان mRNA و پروتئین عوامل آنتی‌آپوپتوزی مانند bcl2، Survivin، ILK^۶ و AKT^۷ می‌شود. از طرف دیگر، جعفری و همکاران (۷) در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که مقدار ژن bax و نسبت bax/bcl2 گروه ورزشی کمتر از گروه کنترل بوده است، اما جعفری و همکاران تفاوت معناداری را بین دو گروه در ژن bcl2 مشاهده نکردند؛ البته مقدار bcl2 در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل بیشتر گزارش شد. همچنین، چنژی^۸ و همکاران (۲۲) در سال ۲۰۱۶ نشان داد که در گروه ورزش هوازی مبتلا به انفارکتوس میوکارد، در مقایسه با گروه MI بیان BCL2/BAX به طور معناداری کاهش نداشته است. حال، با توجه به این نتایج به نظر می‌رسد که ابعاد متفاوت پژوهش حاضر و پژوهش‌های پیشین مانند مدت تمرین می‌تواند بر معناداری بیان ژن bax و bcl2 تأثیر بگذارد؛ زیرا، هر چه مدت زمان تمرین بیشتر باشد، سازگاری تمرین بهتر اتفاق می‌افتد و ابعاد مفید ورزش مانند کاهش لیپوپروتئین‌های چربی و نیز افزایش عوامل آنتی‌اکسیدانی نسبت به اکسیدان‌ها و در پی آن، کاهش عوامل التهابی بهتر روی می‌دهد؛ زیرا، در بیشتر پژوهش‌ها مدت زمان هشت هفته و ۱۳ هفته برای تمرین در نظر گرفته شده است؛ در حالی که در پژوهش حاضر مدت زمان چهار هفته بررسی شده است. از طرف دیگر، در برخی پژوهش‌ها پنج جلسه تمرین در هفته تجویز شده است، اما پژوهش حاضر سه جلسه در هفته بررسی شده است. همچنین، لاجویی و همکاران (۶) (۱۲۰ دقیقه موش‌ها را تمرین داده‌اند، اما در پژوهش حاضر رت‌ها ۳۵ و ۴۲ دقیقه در هر جلسه تمرین داده شدند؛ بنابراین، می‌توان گفت که با حداقل محرک‌های

-
1. Delchev
 2. Marfe
 3. Member of the Sirtuin Family
 4. Hyo-Bum kwak
 5. Santana I
 6. Integrin Linked Kinase
 7. Protein Kinase B
 8. Chengji W

تمرینی یعنی سه روز در هفته و به مدت چهار هفته تمرین همراه با شدت متوسط و زیاد نمی‌توان به نتیجه مطلوب کاهش سکتۀ قلبی رسید. از طرف دیگر، با سازگاری تمرین، عوامل اکسیدانی، التهابی، پروفایل‌های چربی و در نهایت عوامل آپوپتوزی مانند کاسپاز سه کاهش می‌یابند و در مقابل، عوامل آنتی‌اکسیدانی پیش‌بقای سلولی مانند مسیر IGF1-R/PI3K/AKT افزایش می‌یابند که در مجموع می‌توانند آپوپتوز قلبی را کاهش دهند.

افزون‌براین، یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که یک ماه تمرین هوازی با شدت زیاد میزان بیان ژن bax و bcl2 را پس از القای کم‌اکسیژنی و خون‌رسانی مجدد به وسیلۀ تزریق ایزوپرنالین به ترتیب کاهش و افزایش می‌دهد، اما این کاهش و افزایش معنادار نیست؛ بنابراین، به نظر می‌رسد شدت تمرین نیز می‌تواند بر نتایج تأثیرگذار باشد؛ زیرا هرچه شدت تمرین بیشتر باشد، فواید تمرین نیز بیشتر است. حال، به نظر می‌رسد اگر مدت زمان تمرین و تعداد جلسه‌ها در هفته افزایش یابند، بتوان نتیجه مطلوب‌تری را از میزان کاهش و افزایش ژن‌های bax و bcl2 گرفت تا در ادامه شاهد کاهش حجم آپوپتوز میوکارد باشیم؛ زیرا، عواملی مانند کاهش لیپوپروتئین‌ها همچون LDL، VLDL و لپتین، افزایش آنتی‌اکسیدان‌ها مانند گلوکاتینون و سوپراکسید دسموتازها و کاهش عوامل التهابی مانند TNF- α ، IL-6 و رادیکال‌های آزاد و از طرف دیگر، افزایش عوامل رشدی مانند IGF-1، AKT و NFAT که با افزایش سازگاری ورزش ایجاد می‌شوند، در مجموع می‌توانند از حجم آپوپتوز قلبی بکاهند؛ زیرا، با کاهش عوامل مختل‌کننده هموستاز سلولی مانند کاسپازها، کالپاین‌ها، ROS، RNS و افزایش عوامل پیش‌بقا سلولی مانند STATs، PI3K، PGC1-، MEK و ERK همراه هستند.

در تأیید این مطالب اسکات^۱ و همکاران (۲۳) در سال ۲۰۰۸ در پژوهشی بیان کردند که تمرین ورزشی محافظتی در مقابل آسیب کم‌اکسیژنی و خون‌رسانی مجدد میوکارد است؛ زیرا، تمرین استقامتی در مقابل تمام سطوح آسیب‌های کم‌اکسیژنی و خون‌رسانی مجدد از قلب محافظت می‌کند. در این پژوهش مسیرهای مورد نظر اثرهای محافظت قلبی ناشی از ورزش شامل افزایش گردش شریان کرونری و اتساع رگی (۱۱)، بیان پروتئین‌های استرس شبکۀ آندوپلاسمی، افزایش فعالیت سیکلوآکسیژناز دو، القای پروتئین‌های شوک گرمایی میوکارد، افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سیتوزولی میوکارد، افزایش سیگنالینگ نیتریک اکساید، تغییر فنوتیپ میتوکندریایی، تغییر و افزایش کانال‌های پتاسیم حساس به ATP سارکولمایی و غشای داخلی میتوکندریایی ذکر شد. در نهایت، پژوهشگران نشان دادند که افزایش سطوح آنتی‌اکسیدانی میوکارد و افزایش بیان کانال‌های پتاسیمی

حساس به ATP به محافظت قلبی ناشی از ورزش در مقابل آسیب کم‌اکسیژنی و خون‌رسانی مجدد کمک می‌کنند؛ زیرا، این عوامل سبب کاهش آسیب میتوکندری می‌شوند و استحکام غشای میتوکندری را افزایش می‌دهند و درنهایت، سبب افزایش ژن BCL2 در میتوکندری می‌شوند (۲۳).

پیام مقاله: نمونه‌های این پژوهش نمونه‌های حیوانی بوده‌اند و نه انسانی و همچنین انجام این پژوهش روی نمونه‌های انسانی به دلیل القای انفارکتوس غیرممکن است و تعمیم نتایج این پژوهش بر روی بیماران انفارکتوس باید با ملاحظات بیشتری انجام گیرد؛ بنابراین، پیشنهاد می‌شود بیمارانی که مستعد کم‌اکسیژنی شریان کرونر هستند، انجام دادن تمرین هوازی سه روز در هفته به مدت چهار هفته با شدت متوسط و زیاد نمی‌تواند از حجم سکنه آن‌ها بکاهد، اما با توجه به اینکه میزان بهبود در تمرین هوازی با شدت زیاد بهتر بوده است، به نظر می‌رسد با افزایش مدت زمان و شدت تمرین بتوان به کاهش حجم سکنه احتمالی امید داشت.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل انجام‌شدن پژوهشی در آزمایشگاه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی دانشگاه خوارزمی است که بدین‌وسیله از همکاری بی‌دریغ این مجموعه تقدیر و تشکر می‌کنم.

منابع

1. Longo F, Kasper H, Loscalzo, J. Harrison's principles of internal medicine. 18th ed. New York, NY: McGraw-Hill Professional; 2012. p. 104-5.
2. Sheryatzadeh M. Apoptosis programmed cell death. Arak: Arak University Press; 2009. p. 34-5.
3. Santana ET, Serra AJ, Junior J, Bocalini D, Barauna V, Krieger J, et al. Aerobic exercise training induces an anti-apoptotic milieu in myocardial tissue. Motriz: Revista de Educação Física. 2014;20:233-8.
4. Hyo-Bum kwak, Song W, Lawler JM. Exercise training attenuates age-induced elevation in Bax/Bcl-2 ratio, apoptosis, and remodeling in the rat heart. The FASEB Journal. 2006;20(6):791-3.
5. Delchev S, Georgieva K, Koeva Y, Atanassova P. Bcl-2/Bax ratio, mitochondrial membranes and aerobic enzyme activity in cardiomyocytes of rats after submaximal training. Folia Med (Plovdiv) 2006;48:50-6.
6. Lajoie C, Calderone A, Béliveau L. Exercise training enhanced the expression of myocardial proteins related to cell protection in spontaneously hypertensive rats. Pflügers Archiv. 2004;449(1):26-32.
7. Jafari A, Pourrazi H, Nikookheslat S, Baradaran B. Effect of exercise training on Bcl-2 and Bax gene expression in the rat heart. Gene Cell Tissue. 2015;2(4): 1-5.
8. Marsh SA, Laursen PB, Pat BK, Gobe GC, Coombes JS. Bcl-2 in endothelial cells is increased by vitamin E and -lipoic acid supplementation but not exercise training.

- Journal of Molecular and Cellular Cardiology. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2005;38(3):445-51.
9. Sagiv M. Exercise cardiopulmonary function in cardiac patients. London: Springer-Verlag; 2012. p. 205-55.
 10. Pescatello LS. ACSM's guidelines for exercise testing and prescription. Baltimore: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health; 2014. p. 244-5.
 11. Zaheri S, Tadibi V, Monazami A., Naaleini F. Acute effects of an interval aerobic session on flow-mediated dilation and blood pressure in women with prehypertension. *Sport Physiology*. 2017;34(9):35-48.
 12. Azamianjazi A, Haffezi M, Cheraghi J, Abdi H. The Combined effect of endurance training and atorvastatin on the extent of necrosis damage and fibrosis tissue in male Wistar rats heart after experimental myocardial infarction. *Medilam*. 2016;23(7):28-38.
 13. Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen O. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation*. 2007;14(6):753-60.
 14. Vibha L, Asdaq S, Nagpal S, Rawri R. Protective effect of medicinal garlic against isoprenaline induced myocardial infarction in rats. *International Journal of Pharmacology*. 2011;7:510-5.
 15. Shahbaz AU, Zhao T, Zhao W, Johnson PL, Ahokas RA, et al. Calcium and zinc dyshomeostasis during isoproterenol-induced acute stressor state. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011;300(2): 636-44.
 16. Jin Ha S, Weon Kim W. Mechanism of ischemia and reperfusion injury to the heart: From the viewpoint of nitric oxide and mitochondria. *Chonnam Medical Journal*. 2010;46(3):129-39.
 17. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: Mechanisms, mutation, and disease. *Faseb J*. 2003;17(10):1195-214.
 18. Guizoni DM, Oliveira-Junior SA, Noor SL, Pagan LU, Martinez PF, et al. Effects of late exercise on cardiac remodeling and myocardial calcium handling proteins in rats with moderate and large size myocardial infarction. *Int J Cardiol*. 2016;221:406-12.
 19. de Sousa CV, Sales MM, Rosa TS, Lewis JE, de Andrade RV, et al. The antioxidant effect of exercise: A systematic review and meta-analysis. *Sports Med*. 2017;47(2):277-93.
 20. Kang PM, Yue P, Liu Z, Tarnavski O, Bodyaket N, ET al. Alterations in apoptosis regulatory factors during hypertrophy and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004;287(1): 72-80.
 21. Marfe G, Manzi V, Tafani M, Pucci B, Gambacurtaet A, et al. The modulation of sirtuins and apoptotic proteins in rats after exhaustive exercise. *Open Journal of Molecular and Integrative Physiology*. 2012;2:65-74.
 22. Chengji W, Shoujun H. Aerobic exercise can ameliorate heart function in patients with myocardial infarction through up-regulating M3 receptor. *IJC Metabolic & Endocrine*. 2016;13(Supplement C):1-5.

23. Scott K Powers, Quindry JC, Kavazis AN. Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia–reperfusion injury. *Free Radical Biology and Medicine*. 2008;44(2):193-201.

ارجاع دهی

علی زاده پهلوانی حامد، رجبی حمید، نبیونی محمد، معتمدی پژمان، خالدی ندا، تایانلو اکرم. تأثیر تمرین هوازی با شدت متوسط و زیاد بر بیان ژن های آپوپتوزی BAX (BCL2 associated X) و BCL2 (B-cell lymphoma 2) میوکاردا موش صحرائی پس از کم خونی و خون رسانی مجدد. *فیزیولوژی ورزشی*. بهار ۱۳۹۹؛ ۱۲(۴۵): ۳۱-۴۴. شناسه دیجیتال: 10.22089/spj.2018.4598.1618

Alizadeh Pahlavani H, Rajabi H, Nabiuni M, Motamedi P, Khaledi N, Tayanloo A. The Effect of Aerobic Exercise with Medium and High Intensity on the Gene Expression of Bax (BCL2 Associated X) and Bcl-2 (B-Cell Lymphoma 2) Markers in Rat Myocard after Ischemic-Reperfusion. *Sport Physiology*. Spring 2020; 12(45): 31-44. (In Persian). DOI:10.22089/spj.2018.4598.1618

The Effect of Aerobic Exercise with Medium and High Intensity on the Gene Expression of Bax (BCL2 Associated X) and Bcl-2 (B-Cell Lymphoma 2) Markers in Rat Myocard After Ischemic-Reperfusion

H. Alizadeh Pahlavani¹, H. Rajabi², M. Nabiuni³, P. Motamedi⁴, N. Khaledi⁵, A. Tayanloo⁶

1. Assistant Professor of Exercise Physiology, Behbahan University of Medical Sciences
2. Professor of Exercise Physiology, Kharazmi University
3. Associate Professor of Exercise Physiology, Kharazmi University
- 4,5. Associate Professor of Exercise Physiology, Kharazmi University
6. Ph.D. Student in Animal Biology, Shahed University, Tehran

Received: 2017/08/02

Accepted: 2018/01/02

Abstract

The present research aims to examine the effect of aerobic exercise with medium and high intensity on the gene expression of Bax and Bcl-2 markers in rat myocard after ischemic-reperfusion by isoprenaline. 26 male Wistar rats were used weighing approximately 225.25 ± 25.25 g with two to three months old; Then pilot study with stroke group (n = 7) and control Group (n = 7) was knock to examine of isopernalin induced-infarct and the infarct of left ventricle were confirmed in isopernalin into normal groups used Masson-trichrom teqnique. Then rats were divided into three groups to Measure gene expression: control (n=4), aerobic exercise with middle (n=4) and many intensity (n=4). The rats in research group were introduced to treadmill for a week, then the rats were exposed medium and high intensity aerobic training with frequency of three times weekly for one month. After two days of rest, rats were injected with isoprenaline within 24 hours; but control group were injected only with isoprenaline in the end of one month. The formula 2- ct were used to measure the gene expression of BAX and BCL2, and independent t-test was used to compare the two groups of stroke and control in the pilot study and ANOVA were used to compare the groups. The results of study showed that aerobic exercise with medium and high intensity could reduce and increase the gene expression of BAX and BCL2, but these changes were not significant. Therefore, it seems that this intensity and period of training cannot active anti-apoptotic routes of exercise to minimize the effects of stroke.

Keywords: Aerobic Exercise, Medium and High Intensity, Bax, bcl2, Reperfusion - Ischemia, Myocard.

1. Email: alizadehh76@yahoo.com
2. Email: hrajabi@khu.ac.ir
3. Email: nabuni@khu.ac.ir
4. Email: Pezhman.Motamedi@yahoo.com
5. Email: n.khaledi@khu.ac.ir
6. Email: a.tayanloo@gmail.com