Medical Journal
of
Tabriz University of Medical Sciences and Health Services

Original Article

Effect of 12- weeks aerobic training on some indices of skeletal muscle apoptosis in male rats

Marefat Siahkohian[1*], Masoud Asgharpour-Arshad[1,2], Lotfali Bolboli[1], Afshar Jafari[3], Farzam Sheikhzadeh Hesari[4]

[1]Department of Physical Education and Sport Sciences, School of Psychology and Educational Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
[2]Department of Physical Education, Amin Police University, Tehran, Iran
[3]Department of Exercise Physiology, School of Physical Education and Sport Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[4]Department of Animal Biology, School of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran
*Corresponding author; E-mail: m_siahkohian@uma.ac.ir

Received: 3 December 2015 Accepted: 12 April 2016 First Published online: 9 December 2017
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2018 February-March; 39(6):35-43

Abstract

Background: Apoptosis in skeletal muscle plays an important role in tissue dysfunction disease such as muscle atrophy. Current evidence suggests that exercise trainings may alter apoptosis-related signaling in skeletal muscle. Therefore, the present study was investigated the effect of 12 weeks of aerobic training on some indices of skeletal muscle apoptosis in rats.

Methods: This study was conducted as a two-group experimental design on 20 randomly selected three month old male rats. Then divided them into two groups of training group (n=10) and control group (n=10). Rats in training group participated in 12 weeks of aerobic training program. 48 hours after the last training session, the soleus muscle of rats in both group were isolated and Bax, Bcl2 and caspase-3 genes expression evaluated by Real Time-PCR.

Results: The results indicated that there is a significant difference in gene expression of Bcl-2 ($P< 0.01$) and Bax to Bcl-2 ratio ($P< 0.05$) between control and training group. Furthermore, there was no significant difference between the two groups in expression of Bax and caspase-3 ($P> 0.05$).

Conclusion: The 12 weeks of aerobic training was effective in increasing skeletal muscle mitochondrial anti-apoptotic protein. However, considering the alterations of caspase-3 expression**,** more researches are needed to identify the effects of exercise training on skeletal muscle apoptosis.

Keywords: Aerobic exercise, Skeletal muscle, Apoptosis, Caspase-3

How to cite this article: 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]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2018 February-March;39(6):35-43. Persian.

© 2018 The Author(s). This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

مقاله پژوهشی

تأثیر دوازده هفته تمرین هوازی بر برخی از شاخص‌های آپوپتوز عضله‌ی اسکلتی موش‌های صحرایی نر

معرفت سیاه‌کوهیان[*۱]، مسعود اصغرپورارشد[۱و۲]، لطفعلی بلبلی[۱]، افشار جعفری[۳]، فرزام شیخ‌زاده حصاری[۴]

[۱]گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روان‌شناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
[۲]گروه تربیت بدنی، دانشگاه علوم انتظامی امین، تهران، ایران
[۳]گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
[۴]گروه علوم زیست جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
[*] نویسنده رابط؛ ایمیل: m_siahkohian@uma.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۴/۹/۱۲ پذیرش: ۱۳۹۵/۱/۲۴ انتشار برخط: ۱۳۹۶/۹/۱۸
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. بهمن و اسفند ۱۳۹۶؛ ۳۹(۶): ۳۵-۴۳

چکیده

زمینه: آپوپتوز عضله‌ی اسکلتی نقش مهمی در بیماری‌های مرتبط با تخریب عملکرد بافتی مانند آتروفی عضلانی بازی می‌کند. برخی شواهد حاکی از آن است که تمرینات ورزشی ممکن است تعدادی از مسیرهای پیام‌رسانی مربوط به آپوپتوز را در عضله‌ی اسکلتی تحت تاثیر قرار دهد. بنابراین، مطالعه حاضر با هدف تعیین تأثیر ۱۲ هفته تمرین هوازی بر برخی از شاخص‌های آپوپتوز عضله‌ی نعلی موش‌های صحرایی نر انجام گردید.

روش کار: مطالعه حاضر در قالب یک طرح تجربی دو گروهی روی ۲۰ سر موش صحرایی نر سه ماهه انجام گردید. آزمودنی‌ها به شکل تصادفی در دو گروه همگن تمرین و کنترل (هر گروه ۱۰ سر) جایگزین شدند. گروه تمرین به مدت ۱۲ هفته در برنامه‌ی تمرین هوازی شرکت کردند. جراحی آزمودنی‌ها ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه‌ی تمرین انجام و بیان پروتئین‌های Bax، Bcl-2 و کاسپاز-۳ عضله‌ی نعلی با استفاده از روش Real Time-PCR بررسی شد. داده‌ها با استفاده از آزمون t مستقل در سطح معنی‌داری $P>۰/۰۵$ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: یافته‌ها نشان داد که بین گروه کنترل و تمرین در بیان ژن Bcl-2 ($P<۰/۰۱$) و نسبت Baxبه Bcl-2 ($P<۰/۰۵$) تفاوت معنی‌داری وجود دارد. اما در بیان ژن Bax و کاسپاز-۳ بین دو گروه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد ۱۲ هفته تمرین هوازی تاثیر قابل‌توجهی بر افزایش پروتئین ضدآپوپتوز میتوکندریایی عضله‌ی نعلی دارد. با این حال و باتوجه به عدم تفاوت معنی‌دار پروتئین کاسپاز-۳، اظهار نظر قطعی در مورد تأثیر تمرینات ورزشی بر شاخص‌های مربوط به آپوپتوز عضله‌ی اسکلتی، منوط به انجام مطالعات بیشتری می‌باشد.

کلید واژه‌ها: تمرین هوازی، عضله‌ی اسکلتی، آپوپتوز، کاسپاز ۳

نحوه استناد به این مقاله: سیاه‌کوهیان م، اصغرپورارشد م، بلبلی ل، جعفری ا، شیخ‌زاده حصاری ف. تأثیر دوازده هفته تمرین هوازی بر برخی از شاخص‌های آپوپتوز عضله‌ی اسکلتی موش‌های صحرایی نر. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. ۱۳۹۶؛ ۳۹(۶): ۳۵-۴۳

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.
این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز تحت مجوز کریتیو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی یک فرآیند ژنتیکی است که بخش تفکیک‌ناپذیر از رشد، توسعه و هومئوستاز موجود زنده می‌باشد و برای حذف سلول‌های زاید با روشی هدفمند به کار می‌رود (۴-۱). این فرآیند با قطعه‌قطعه شدن برگشت ناپذیر DNA و تشکیل اجسام آپوپتوتیکی چسبیده به غشاء اتفاق می‌افتد که نتیجه‌ی نهایی آن گسسته شدن پروتئین‌های حیاتی سلول است (۶،۵). با این حال اختلال در تنظیم آپوپتوز شرایطی را به وجود می‌آورد که می‌تواند منجر به بیماری‌های مختلف عضله‌ی اسکلتی مانند دیستروفی‌های عضلانی، تخریب عضله، سارکوپنیا و سالخوردگی شود (۷). در این بین رویدادهای مولکولی که منجر به فعال‌سازی و اجرای برنامه‌ی آپوپتوتیکی می‌شوند، اغلب به واسطه‌ی تعادل بین پروتئین‌های پیش و ضد آپوپتوزی کنترل می‌شوند (۷،۸). خانواده‌ی پروتئین‌های Bcl-2 به عنوان تنظیم‌کننده‌های بالا دست آپوپتوز شامل پروتئین‌های Bax و Bcl-2 به عنوان پروتئین‌های کلیدی مشهور در شکل‌گیری کانال‌های آپوپتوزی و تنظیم پیام‌های آپوپتوز میتوکندریایی شناخته شده‌اند (۱۰،۹،۷).

اغلب مطالعات نشان داده‌اند که جابجایی پروتئین Bax به طرف میتوکندری و جاسازی آن در داخل غشای بیرونی منتج به رهایش سایر عوامل آپوپتوزی (مانند سیتوکروم c) از فضای بین غشایی میتوکندری می‌شود. این در حالی است که پروتئین Bcl2 با فعالیت پیش‌آپوپتوزی پروتئین Bax مخالفت کرده و موجب حفظ یکپارچگی غشای میتوکندری می‌شود (۷،۸،۱۰،۱۱). در نهایت پیام‌های آپوپتوزی در فعال‌سازی کاسپازهای اثر کننده‌ی متداول از جمله کاسپاز-۳ همگرا شده و باعث تخریب احتمالی سلول می‌گردند (۱۲،۱۰،۹،۷،۶). بنابراین پژوهشگران همواره به دنبال اتخاذ راهکارهای مناسب برای پیشگیری از آپوپتوز و بیماری‌های مختلف عضلانی مرتبط با آن هستند. در دهه‌ی اخیر، تاثیر فعالیت‌ها و تمرینات ورزشی بر آپوپتوز مورد علاقه‌ی محققان حوزه‌ی ورزش قرار گرفته است (۹). در این زمینه، تعدادی از محققان عنوان کردند که یک جلسه فعالیت ورزشی شدید تا ۴۸ ساعت می‌تواند موجب تسریع در فرآیند آپوپتوز شود (۱۳،۹). این در حالی است که بر خلاف فعالیت ورزشی، انجام تمرینات ورزشی با شدت متوسط و مداوم احتمالاً موجب کاهش آپوپتوز در بافت‌های مختلف می‌شود (۱۵،۱۴،۱۰،۷،۳). در این راستا Song و همکاران اشاره داشتند که تمرین هوازی میزان پروتئین ضدآپوپتوزی Bcl2 را افزایش داده در حالی که به طور مشخصی قطعه قطعه شدن DNA، فعالیت کاسپاز-۳، پروتئین Bax و نسبت Bax/Bcl2 را در عضلات ساق پا و نعلی موش های صحرایی کاهش می‌دهد (۸). همچنین McMillan و همکاران گزارش کردند که شش هفته تمرین استقامتی موجب کاهش قطعه قطعه شدن DNA، رهایش سیتوکروم c و پروتئین Bax می‌شود (۱۰). با این حال و برخلاف نتایج مطالعات مذکور، Liu و همکاران نشان دادند که ۹ هفته تمرین استقامتی موجب افزایش معنی‌دار پروتئین Bax و نسبت Bax/Bcl2 در عضله‌ی اسکلتی موش‌های صحرایی می‌شود (۱۱). باید به این نکته توجه نمود که تفاوت در نوع، شدت و مدت تمرینات هوازی مورد استفاده در مطالعات مختلف باعث به دست آمدن نتایج متناقضی در آپوپتوز عضله‌ی اسکلتی شده است. همچنین، با توجه به اهمیت تمرینات هوازی و فشارهای مکانیکی و متابولیکی نسبتاً شدید و طولانی مدت حین این تمرینات و نقش عضلات اسکلتی در سلامتی و موفقیت ورزشکاران، این موضوع یکی از چالش‌های جدی است که می‌تواند ذهن پژوهشگران ورزشی را به خود جلب کند. با این وجود، با توجه به اینکه مطالعه جامعی در زمینه‌ی تاثیر تمرینات هوازی با شدت بالاتر از متوسط بر آپوپتوز عضله‌ی اسکتی انجام نشده است و اغلب مطالعات از تمرینات هوازی با شدت متوسط استفاده کرده و یا برخی جنبه‌های مورفولوژیکی آپوپتوز عضله-ی اسکلتی در طی فعالیت ورزشی حاد را مورد آزمایش قرار داده‌اند، انتظار می‌رود با انجام تحقیق حاضر بتوان ضمن پاسخ به برخی ابهامات موجود و تعیین تاثیر تمرینات ورزشی هوازی با شدت بالاتر از متوسط بر آپوپتوز عضله‌ی اسکلتی، پیشنهادات کاربردی متناسبی در راستای نحوه‌ی انجام تمرینات و نیز پیش‌بینی پیامدهای احتمالی ارائه داد.

روش کار

پژوهش حاضر از نوع تجربی- آزمایشگاهی و مدل حیوانی روی ۲۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار ۱۴۸۴۸ انجام شد. در مراحل مختلف پژوهش، ضمن رعایت مسائل اخلاقی، مطابق دستورالعمل کمیته‌ی اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی مستخرج از دستورالعمل هلسینکی از هرگونه آزار جسمی و روش‌های غیرضروری کار با حیوانات اجتناب گردید. موش‌های صحرایی در سن هشت هفتگی از انستیتو پاستور ایران خریداری و به آزمایشگاه حیوانات منتقل و در شرایط دمایی ۳±۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت ۴۰ تا ۶۰ درصد و تحت چرخه‌ی روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲ نگهداری شدند. جهت جلوگیری از استرس و تغییر شرایط فیزیولوژیکی، نمونه‌ها به مدت دو هفته تحت شرایط جدید در قفس‌های پلی‌اتیلن نگهداری شدند. آزمودنی‌ها به صورت آزادانه از غذای استاندارد و آب در طول دوره‌ی پژوهش استفاده کردند. قبل از

شروع دوره‌ی تمرینی، آزمودنی‌ها به مدت ۲ هفته و ۵ روز در هفته تحت برنامه‌ی آشنایی با نحوه‌ی فعالیت روی نوارگردان دیجیتالی (محصول مشترک دانشگاه تبریز و شرکت تجهیز آزمای پویا) قرار گرفتند. در طی این دوره، شیب نوارگردان صفر درصد، سرعت ۱۵-۱۰ متر بر دقیقه و مدت تمرین ۱۰-۵ دقیقه در روز بود. در پایان این دوره، موش‌ها پس از مطابقت وزنی به طور تصادفی به دو گروه کنترل و تمرین (هرگروه ۱۰ سر) جایگزین شدند. گروه تمرین برای ۵ روز در هفته و به مدت ۱۲ هفته در برنامه‌ی تمرین هوازی روی نوارگردان الکترونیکی هوشمند حیوانی شرکت کردند (۱۶). شیب نوار گردان در سرتاسر برنامه‌ی تمرین ۱۵٪ بود، اما سرعت در هفته‌ی اول تمرین ۲۴ متر در دقیقه بود که در هفته‌ی آخر به ۳۳ متر در دقیقه رسید. مدت زمان تمرین از ۱۰ دقیقه در روز در هفته‌ی اول شروع و به ۶۰ دقیقه در روز در هفته‌ی پنجم رسیده و تا انتهای دوره حفظ گردید(جدول ۱). لازم به ذکر است که قبل از تمرین ۱۰ دقیقه گرم کردن با سرعت ۱۰ الی ۱۵ متر در دقیقه در شیب صفر درصد انجام می‌شد و شیب و سرعت نوار گردان به صورت تدریجی افزایش می‌یافت تا به مقدار مورد نظر برسد. همچنین بعد از تمرین ۵ دقیقه سرد کردن انجام می‌گرفت. در طول این ۱۲ هفته آزمودنی‌های گروه کنترل بدون انجام تمرین در آزمایشگاه حیوانات نگهداری می‌شدند.

۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه‌ی تمرین، موش‌های صحرایی گروه‌های تمرین و کنترل که تقریباً شش ماهه بودند توسط تزریق درون صفاقی کتامین (۸۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) بی‌هوش شدند (۱۷). موش‌ها بلافاصله توسط متخصصین کارآزموده جراحی و عضله‌ی نعلی آنها استخراج و در مایع فیزیولوژیک انداخته شد. سپس، عضله‌ی نعلی موش‌ها برای بررسی میزان بیان ژنی یا mRNA پروتئین‌های Bax، Bcl-2 و کاسپاز-۳ در دمای ۷۰- درجه نگهداری شد. برای استخراج RNA از نمونه‌ها، طبق روش پیشنهادی کیت (Thermo,K0731, USA) و با اندکی تغییرات به شرح زیر عمل شد. حدود ۵۰ میلی‌گرم از بافت عضله‌ی نعلی در حضور ۱ میلی‌لیتر AccuZol (Bioneer, South Korea) هموژنه شده و سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس به هر میکروتیوب ۰/۲ میلی‌لیتر کلروفروم افزوده شد و میکروتیوب به شدت با دست به مدت ۱۵ ثانیه تکان داده شده و ۵ دقیقه دردمای ۴ درجه انکوبه گردید و در ادامه به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط ۴ درجه و ۱۳۷۰۰g سانتریفیوژ شد. سپس به دقت و بدون تکان دادن تیوب، فاز روئی که حاوی RNA بود، جداسازی گردید و به میکروتیوب دیگر منتقل شده و به محلول جدا شده حجم مساوی از ایزوپروپانول سرد اضافه گردید و برای۱۰دقیقه در دمای۲۰-درجه انکوبه شد. بعد از آن میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در شرایط ۴ درجه و ۱۳۷۰۰g سانتریفیوژ شده، مایع روئی بیرون ریخته شده و سپس یک میلی‌لیتر اتانول۸۰ درصد به میکروتیوب اضافه گردید. بلافاصله میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه در شرایط ۴ درجه و ۱۳۷۰۰g سانتریفیوژ شده، مایع رویی بیرون ریخته شد و به دقت اتانول خالی شد و حدود ۲۰ دقیقه اجازه داده شد تا الکل تبخیرگردد. سپس مجدداً در آب تیمار شده با دی اتیل پیروکربنات (DEPC) حل شد. پس از استخراج RNA، مقدار و خلوص آن توسط روش اسپکتروفتومتری (Bio-Rad, CA, USA) بررسی شد. همچنین، RNA تام به وسیله الکتروفورز روی ژل آگاروز حاوی اتیدیوم بروماید قرار گرفت و مشاهده دو باند مشخص ۱۸s و ۲۸s مربوط به RNA ریبوزومی کنترل شد. RNA استخراج شده برای استفاده بعدی در دمای ۸۰- درجه نگهداری شد. از کیت (Fermentas, Canada) Revert AIDTM Firs Standard cDNA synthesis و طبق دستورالعمل شرکت سازنده به صورت زیر استفاده شد: یک میکرولیتر RNA و یک میکرولیتر از DNase I reaction buffer 10X در یک تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شده و توسط DEPC-traeted eater به حجم ۹ میکرولیتر رسید. یک میکرولیتر DNase به تیوب اضافه (برای از بین بردن آلودگی احتمالی با DNA) و پس از افزودن یک میلی‌لیتر از اتانول مطلق، تیوب مربوطه به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر ۷۰- درجه قرار گرفت. تیوب مربوطه به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط ۴ درجه و ۱۴۰۰۰g سانترفیوژ شد و پس از آن، در زیر هود به دقت اتانول خالی شده و حدود ۱۰ دقیقه اجازه داده شد تا الکل تبخیر گردد. به تیوب مربوطه یک میکرولیتر DEPC-treated water و یک میلکرولیتر پرایمر(oligi (dt یا پرایمر Random hexamer افزوده شد و ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه بر روی Dry block انکوبه گردید. ۴ میکرولیتر reaction buffer 5X و دو میکرولیتر dNTP 10mM mix و یک میکرولیتر Ribo lock Ribo nuclease Transcription Inhibitor به تیوب افزوده شد و پس از سانترفیوژ مختصر، به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه گردید. یک میکرولیتر آنزیم Rverert AidTM H Minus M-MuLV Reverse به تیوب قبل افزوده شد. در ادامه در صورت استفاده از پرایمر(oligodt)، ۶ دقیقه در ۴۲ درجه و در صورت استفاده از پرایمر Random hexamer ، ابتدا ۵ دقیقه در ۲۵ درجه و به دنبال آن ۹۰ دقیقه در ۴۲ درجه انکوباسیون صورت گرفت. واکنش با قرار دادن تیوب به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه پایان پذیرفت و نمونه در فریزر ۷۰- درجه نگهداری شد.

برای اندازه گیری میزان بیان ژنی پروتئین‌های Bax، Bcl-2 و کاسپاز-۳ از دستگاه مربوطه Corbett-Rotor gene-6000(Corbett, Research Australia) استفاده شد. جفت پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از نرم افزار Primer 3 طراحی شده و توسط بایونیر (Bioneer-Germany) سنتز شده و برای کار با غلظت نهایی ۸۰nm مورد استفاده قرار گرفتند.

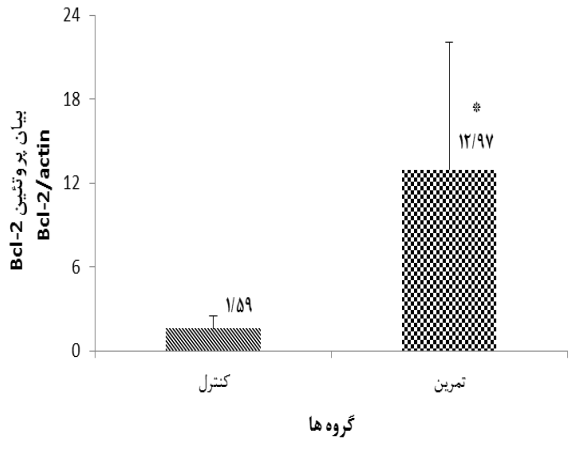
واکنش‌ها بر مبنای استفاده از رنگ Syber green انجام شد. رنگ Syber green طی واکنش Real-time PCr به DNA دو رشته‌ای متصل شده و نور فلورسنت ساطع می‌کند. به عنوان بلانک از تیوبی که حاوی همه مواد موجود در واکنش به جز cDNA بود، استفاده شد و به جای cDNA، به تیوب مربوطه DEPC water افزوده شد. در پایان قبل از آنالیز داده‌ها، منحنی ذوب (Melting curve) بدست آمده از هر واکنش Real-time PCR بررسی شد تا پیک مربوط به ژن مورد نظر و فقدان پرایمر دایمر تایید شود. برای آنالیز داده‌ها ابتدا، CtΔ ژن در هر نمونه از افتراق Ct ژن مربوطه و Ct ژن β-actin به عنوان رفرنس محاسبه شد. توزیع طبیعی داده‌ها و برابری واریانس‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف و لون مشخص شد. سپس داده‌های حاصله توسط آزمون تی مستقل برای تعیین اختلاف میزان شاخص‌های مورد نظر بین دو گروه کنترل و تمرین مورد بررسی قرار گرفتند. تمامی محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ در سطح معنی‌داری **P<۰/۰۵** تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

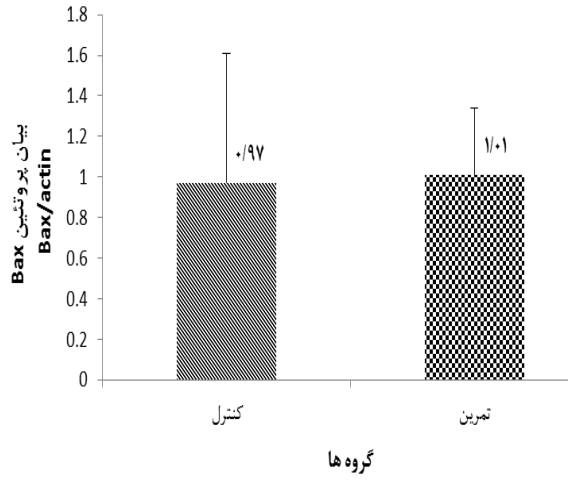
نتایج مربوط به شاخص‌های آپوپتوز عضله‌ی نعلی نشان داد که پس از ۱۲ هفته تمرین هوازی، بیان ژن Bcl-2 بین دو گروه تفاوت معنی‌داری داشت و در گروه تمرین ۸ برابر بیشتر از گروه کنترل بود (**P<۰/۰۱**) (شکل ۱). اما تفاوت معنی‌داری بین دو گروه تمرین و کنترل در رابطه با بیان ژن Bax مشاهده نشد (**P>۰/۰۵**)، با این حال میزان بیان ژن Bax عضله‌ی نعلی در گروه تمرین ۳ درصد بیشتر از گروه کنترل بود (شکل ۲). همچنین، نسبت Bax به Bcl-2 در گروه تمرین به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود (**P<۰/۰۵**). این نسبت در گروه کنترل تقریباً ۵ برابر گروه تمرین بود (شکل ۳). همچنین، علیرغم این که بیان ژن کاسپاز-۳ در گروه تمرین ۵۳ درصد بیشتر از گروه کنترل بود، اما این اختلاف معنی‌دار نبود (**P>۰/۰۵**) (شکل ۴).

جدول ۱: پروتکل تمرین هوازی ۱۲ هفته‌ای مورد استفاده در پژوهش (۵ جلسه در هفته)

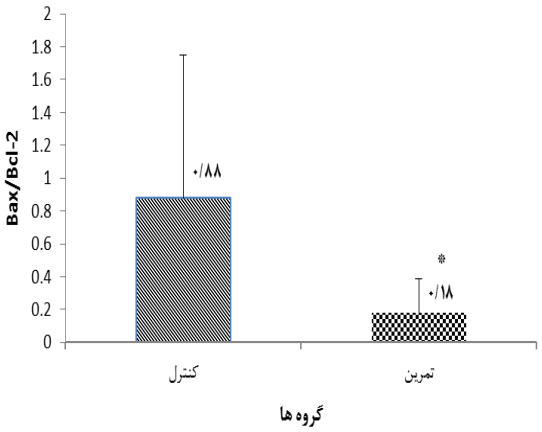
	هفته‌های تمرین											
	اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم	هفتم	هشتم	نهم	دهم	یازدهم	دوازدهم
مدت تمرین (دقیقه در روز)	۱۰	۲۰	۳۵	۴۵	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰
سرعت نوارگردان (متر بر دقیقه)	۲۴	۲۴	۲۵	۲۵	۲۶	۲۷	۲۸	۲۹	۳۰	۳۱	۳۲	۳۳
شیب نوارگردان (درصد)	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵



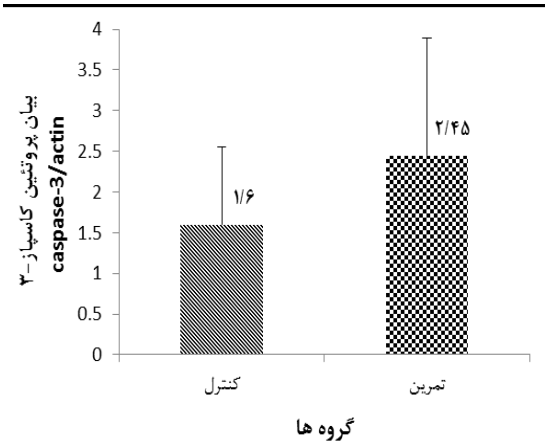
شکل ۱: مقادیر بیان ژن Bcl-2 در عضله‌ی نعلی گروه‌های تمرین و کنترل (*: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل در سطح معنی‌داری P<۰/۰۱)



شکل ۲: مقادیر بیان ژن Bax در عضله‌ی نعلی گروه‌های تمرین و کنترل



شکل ۳: نسبت Bax به Bcl-2 در عضله‌ی نعلی گروه‌های تمرین و کنترل (*: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل در سطح معنی‌داری P<۰/۰۵)



شکل ۴: مقادیر بیان ژن کاسپاز-۳ در عضله‌ی نعلی گروه‌های تمرین و کنترل

بحث

نتایج تحقیق در رابطه با تعیین تاثیر دوازده هفته تمرین هوازی بر شاخص‌های آپوپتوز عضله‌ی اسکلتی شامل Bax، Bcl-2 و نسبت Bax به Bcl-2 در موش‌های صحرایی نر نشان داد که پس از سه ماه تمرین هوازی بیان پروتئین ضد آپوپتوزی Bcl-2 در عضله‌ی نعلی گروه تمرین به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود. البته با وجود نبود تفاوت در بیان پروتئین Bax بین دو گروه پس از سه ماه تمرین، نسبت Bax به Bcl-2 به طور معنی‌داری در گروه تمرین کمتر از گروه کنترل بود. در چندین مطالعه نیز نشان داده شده است که فعالیت ورزشی منظم پروتئینBcl-2 عضله‌ی اسکلتی را افزایش می‌دهد و نسبت Bax به Bcl-2 را به سمت یک محیط ضد آپوپتوزی تغییر می‌دهد (۱۸،۱۷،۱۰،۸،۷). برای نمونه، McMillan و همکاران گزارش کردند که شش هفته تمرین روی نوارگردان باعث کاهش معنی‌دار نسبت Bax به Bcl-2 در موش‌های صحرایی می‌شود (۱۰). همچنین، Vainshtein و همکاران نیز در مطالعه‌ی خود اشاره کردند که پس از هشت الی ۱۰ هفته تمرین هوازی نسبت Bax به Bcl-2 در آزمودنی‌های گروه تمرین کمتر از گروه کنترل بود (۱۷). چندین سازوکار برای اثرات محافظتی تمرینات ورزشی روی آپوپتوز عضله مطرح شده است که شامل تغییر مستقیم در بیان پروتئین‌های مربوط به آپوپتوز، کاهش آزادسازی عوامل آپوپتوژنیک میتوکندری و تغییرات تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و وضعیت ضداکسایشی می‌باشد (۱۰). به نظر می‌رسد میتوکندری نقش مهمی در تنظیم آپوپتوز سلول‌های عضله‌ی اسکلتی بازی می‌کند. نسبت Bax به Bcl-2 شاخصی برای نشان دادن پتانسیل آپوپتوز میتوکندریایی می‌باشد که Bcl-2 با فعالیت پیش‌آپوپتوزی Bax به وسیله‌ی جلوگیری از جابجایی آن به میتوکندری مخالفت می‌کند. هنگامی که Bax به میتوکندری وارد می‌شود، منافذی را در غشای میتوکندری شکل می‌دهد که در نتیجه پروتئین‌هایی از جمله سیتوکروم c آزاد شده و وارد سیتوزول می‌شود و باعث شروع پیام‌رسانی آپوپتوتیک آبشارهای کاسپاز پایین‌دستی می‌شود (۷). اهمیت نفوذپذیری میتوکندری در مطالعه‌ی Fang و همکاران نشان داده شده است. آن‌ها بیان کردند که مسدود کردن منافذ نفوذپذیری میتوکندری میزان آپوپتوز را کاهش می‌دهد (۱۹). این نتایج همراستا با ایده‌ای است که کاهش نسبت Bax به Bcl-2 در اثر تمرینات ورزشی می‌تواند آپوپتوز را به وسیله‌ی به حداقل رساندن نفوذپذیری میتوکندری کاهش دهد (۲۰،۷).

اعتقاد بر این است که ROS نیز یک محرک قوی برای فعال کردن آپوپتوز در انواع مدل‌های آزمایشی و سلول‌های مختلف می‌باشد (۱۴). همچنین گزارش شده است که ROS آپوپتوز را به طور عمده از طریق تعدیل مسیر مربوط به میتوکندری تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۴،۹). احتمالاً استرس اکسایشی بالا هومئوستاز غشای میتوکندری را بی‌ثبات کرده و بنابراین تشکیل منافذ نفوذپذیری غشای میتوکندری را تحریک می‌کند و باعث آزادسازی فاکتورهای پیش آپوپتوزی مثل سیتوکروم c می‌شود (۱۴،۱۱). اعتقاد بر این است که تمرینات ورزشی با افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و تعدیل استرس اکسایشی باعث کاهش ژن‌های پیش آپوپتوزی می‌شوند (۲۱،۱۴،۷). با این حال، نتایج پژوهش حاضر و مطالعات مذکور با برخی از تحقیقات انجام شده همسو نمی‌باشد.

Liu و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که ۹ هفته تمرین استقامتی موجب افزایش معنی‌دار نسبت Bax/Bcl2 در عضله‌ی اسکلتی موش‌های صحرایی می‌شود (۱۱). علت این تناقض ممکن است ناشی از زمان برداشت بافت باشد (۷). چون اندازه‌گیری‌ها در مطالعه‌ی کنونی، روی بافت‌هایی انجام شد که ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین استخراج شده بودند، اما در پژوهش لیو و همکاران استخراج بافت ۳۶ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین انجام شده بود.

اگر چه در تحقیق حاضر بیان Bcl-2 بیشتر و نسبت Bax/Bcl-2 کمتری در حیوانات تمرین‌کرده مشاهده شد، اما اختلاف معنی‌داری در میزان بیان ژن کاسپاز-۳ عضله‌ی نعلی موش‌های صحرایی در دو گروه تمرین و کنترل وجود نداشت. این یافته‌ها با نتایج Siu و همکاران و مک‌میلان و همکاران (۲۰۱۲) همسو می‌باشد. سیو و همکاران عدم وجود اختلاف بین گروه تمرین و کنترل در فعالیت کاسپاز-۳ را پس از هشت هفته تمرین روی نوارگردان گزارش کردند (۱۴). با توجه به گزارش McMillan و همکاران عدم وجود کاهش در فعالیت و بیان کاسپاز-۳ در اثر تمرینات ورزشی ممکن است نتیجه‌ی کاهش چشمگیر سطوح XIAP (مهار کننده‌ی قوی کاسپاز-۳) و افزایش سطوح Smac (مهار کننده‌ی XIAP) باشد (۱۰) که به علت برخی محدودیت‌ها در این مطالعه اندازه‌گیری نشده‌اند. همچنین این احتمال وجود دارد که افزایش TNF-α و IL-6 پلاسما با فعال کردن مستقیم کاسپاز-۳ از طریق مسیر خارجی میانجی‌گری کرده و باعث حفظ کاسپاز-۳ گردد (۹). این مطالعات نشان می‌دهند که افزایش سطوح TNF-α گردش خون، منجر به افزایش لیگاند متصل شونده به گیرنده TNF-α در سارکولمای عضله اسکلتی شده و باعث افزایش آپوپتوز از طریق مسیر خارجی می‌شود. همه این اثرات ممکن است باعث فعال شدن کاسپاز-۸ و کاسپاز-۳ از طریق مسیر خارجی شود. به علاوه رابطه بالقوه دیگر بین استرس اکسایشی و آپوپتوز، کنترل فعالیت کاسپاز ۳ می باشد. کنترل کاسپاز-۳ فرآیند پیچیده‌ای است و چندین مسیر پیام‌رسانی آپوپتوز را درگیر می‌کند. نشان داده شده است که کاسپاز-۳ به وسیله‌ی فعال شدن کاسپاز-۱۲ از طریق مسیر آزادسازی کلسیم یا به وسیله‌ی فعال شدن کاسپاز-۹ در مسیر داخلی و یا افزایش TNF-α سرم در مسیر خارجی فعال می‌شود (۹). همچنین، کاسپاز-۳ نقش مهمی در تغییر حالت عضله‌ی اسکلتی بازی می‌کند و برای تفکیک سلولی عضله‌ی اسکلتی ضروری می‌باشد. بنابراین، حفظ شدن فعالیت کاسپاز-۳ پس از تمرینات ورزشی ممکن است برای سایر اعمال سلولی از قبیل تغییر حالت ناشی از فعالیت ورزشی و تفکیک سلول‌های ماهواره‌ای مورد نیاز باشد (۱۰) که هنوز مورد بررسی و تحقیق قرار نگرفته‌اند. به علاوه، عدم موفقیت در به دست آوردن کاهش فعالیت پروتئاز کاسپاز-۳ در حیوانات تمرین کرده ممکن است ناشی از زمان برداشت بافت باشد. چون اندازه‌گیری‌ها در مطالعه کنونی، روی بافت‌هایی انجام شد که ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین استخراج شده بودند، این احتمال وجود دارد که تغییرات فعالیت کاسپاز-۳ در حیوانات تمرین کرده زمانی اتفاق افتاده باشد (۷) که در این مطالعه مورد آزمایش قرار نگرفته است.

یافته‌های پژوهش حاضر در رابطه با تغییرات کاسپاز-۳ پس از تمرینات ورزشی با نتایج برخی مطالعات از جمله Song و همکاران در تناقض می‌باشد. سانگ و همکاران گزارش کردند که پس از ۱۲ هفته تمرین استقامتی بیان کاسپاز-۳ در عضله‌ی اسکلتی موش‌های پیر تمرین کرده کمتر از گروه کنترل بود (۸). علت این تناقض را می‌توان به سن حیوانات نسبت داد، چون موش های تحقیق حاضر در شروع پژوهش سه ماهه بودند، در حالی که آزمودنی‌های مطالعه سانگ را موش های پیر ۲۴ ماهه تشکیل می‌دادند. به نظر می‌رسد که افزایش سن یکی از مهمترین عوامل بروز و تشدید آپوپتوز و افزایش استعداد آسیب، التهاب و استرس اکسایشی در عضله‌ی اسکلتی می‌باشد. استرس اکسایشی، سایتوکین‌های التهابی و اختلال در محافظت از استرس سلول سازوکارهای احتمالی هستند که در افزایش آپوپتوز بافت‌های پیر مشارکت می‌کنند (۸). در همین راستا Marzetti و همکاران گزارش کردند که موش‌های سالم و جوان به طور طبیعی سطوح پایینی از آپوپتوز عضله اسکلتی و کاسپاز-۳ را در حالت پایه دارا می باشند و تغییرات این شاخص در مقایسه با موش‌های پیر در آن‌ها کمتر است (۲۰). به عبارت دیگر، زمانی که احتمال بروز آپوپتور در این بافت سوماتیک افزایش و تشدید یابد، تأثیرات تمرینات ورزشی بر شاخص‌های آپوپتوز عضله‌ی اسکلتی مشهودتر خواهد بود. با این حال و با توجه به عدم تغییر معنی‌دار بیان کاسپاز-۳ و نتایج برخی از مطالعات اخیر، اظهار نظر قطعی در مورد نحوه تأثیرپذیری شاخص‌های مربوط به آپوپتوز عضله‌ی اسکلتی از تمرینات ورزشی مختلف، منوط به انجام تحقیقات و مطالعات بیشتر در این زمینه می‌باشد.

نتیجه‌گیری

در رابطه با شاخص‌های مربوط به آپوپتوز عضله‌ی نعلی، یافته‌ها نشان داد که پس از ۱۲ هفته تمرین هوازی، در بیان ژن Bcl-2 و نسبت Bax به Bcl-2 تفاوت معنی‌داری بین دو گروه تمرین و کنترل وجود دارد، با این حال میزان بیان ژن

Bax و کاسپاز-۳ در دو گروه تفاوت معنی‌داری نداشت. با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق، تمرینات هوازی منظم دارای شدت و مدت مناسب ممکن است به عنوان یک مداخله در جهت کاهش آپوپتوز عضله‌ی نعلی توصیه شود. با این حال، با توجه به کاهش معنی‌دار نسبت Bax به Bcl-2 و افزایش غیر معنی‌دار کاسپاز-۳، اظهار نظر قطعی در مورد تاثیر تمرینات ورزشی مختلف بر شاخص‌های مربوط به آپوپتوز عضله‌ی اسکلتی، نیازمند انجام تحقیقات و مطالعات بیشتر می‌باشد. پیشنهاد می‌شود در زمینه‌ی تاثیر تمرینات ورزشی هوازی بر آپوپتوز، تحقیقاتی طراحی و انجام شوند که امکان اندازه‌گیری شاخص‌های بیشتری از آپوپتوز (هم مسیر داخلی و هم مسیر خارجی) در آن‌ها وجود داشته باشد.

قدردانی

در پایان از تمامی کسانی که در انجام پژوهش حاضر ما را یاری نمودند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منافع متقابل

مولفان اظهار می‌دارند که منافع متقابلی از تالیف و یا انتشار این مقاله ندارند.

ملاحظات اخلاقی

ملاحظات اخلاقی مطابق دستورالعمل کمیته‌ی اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی مستخرج از دستورالعمل هلسینکی رعایت گردید.

مشارکت مولفان

م س، م الف و همکاران طراحی، اجرا و تحلیل نتایج مطالعه را بر عهده داشته‌اند. همچنین مقاله را تالیف نموده و نسخه نهایی آن را تایید کرده‌اند.

References

1. Marfe G, Tafani M, Pucci B, Di Stefano C, Indelicato M, Andreoli A, et al. The effect of marathon on mRNA expression of anti-apoptotic and pro-apoptotic proteins and sirtuins family in male recreational long-distance runners. *BMC Physiology* 2010; **10**(1): 7. doi: 10.1186/1472-6793-10-7
2. Tsalouhidou S, Petridou A, Mougios V. Effect of chronic exercise on DNA fragmentation and on lipid profiles in rat skeletal muscle. *Experimental Physiology* 2009; **94**(3): 362-370.
3. Quadrilatero J, Bombardier E, Norris SM, Talanian JL, Palmer MS, Logan H, et al. Prolonged moderate-intensity aerobic exercise does not alter apoptotic signaling and DNA fragmentation in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2010; **298**(3): E534-E547. doi: 10.1152/ajpendo.00678.2009
4. Siu PM, Bryner RW, Murlasits Z, Alway SE. Response of XIAP, ARC, and FLIP apoptotic suppressors to 8 wk of treadmill running in rat heart and skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* 2005; **99**(1): 204-209. doi: 10.1152/japplphysiol.00084.2005
5. Farrell P, Joyner J, Caiozzo V. *Acm's Advanced Exercise Physiology*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2012.
6. Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)* 2012; **4**(5): 330. doi: 10.18632/aging.100459
7. 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. *Journal of Applied Physiology* 2008; **105**(6): 1934-1943. doi: 10.1152/japplphysiol.00037.2008
8. Song W, Kwak HB, Lawler JM. Exercise training attenuates age-induced changes in apoptotic signaling in rat skeletal muscle. *Antioxidants & Redox Signaling* 2006; **8**(3-4): 517-528. doi:10.1089/ars.2006.8.517
9. Koçtürk 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. *European Journal of Applied Physiology* 2008; **102**(5): 515-524.
10. 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. *Journal of Applied Physiology* 2012; **113**(7): 1048-1057. doi: 10.1152/japplphysiol.00290.2012
11. Liu WY, He W, Li, H. Exhaustive training increases uncoupling protein 2 expression and decreases Bcl-2/Bax ratio in rat skeletal muscle. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity* 2013; **10**: 7. doi: 10.1155/2013/780719
12. Cury-Boaventura MF, Levada-Pires AC, Folador A, Gorjão R, Alba-Loureiro TC, Hirabara SM, et al. Effects of exercise on leukocyte death: prevention by hydrolyzed whey protein enriched with glutamine dipeptide. *European Journal of Applied Physiology* 2008; **103**(3): 289-294.

13. Phaneuf S, Leeuwenburgh C. Apoptosis and exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 2001; **33**(3): 393-396.
14. Siu PM, Bryner RW, Martyn JK, Alway SE. Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles. *The FASEB Journal* 2004; **18**(10): 1150-1152. doi: 10.1096/fj.03-1291fje
15. Alway SE, Siu PM. Nuclear apoptosis contributes to sarcopenia. *Exercise and Sport Sciences Reviews* 2008; **36**(2): 51.
16. Naito H, Powers SK, Demirel HA, Junichiro A. Exercise training increases heat shock protein in skeletal muscles of old rats. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 2001; **33**(5): 729-734.
17. Vainshtein A, Kazak L, Hood DA. Effects of endurance training on apoptotic susceptibility in striated muscle. *Journal of Applied Physiology* 2011; **110**(6): 1638-1645. doi: 10.1152/japplphysiol.00020.2011
18. Adhihetty PJ, Taivassalo T, Haller RG, Walkinshaw DR, Hood DA. The effect of training on the expression of mitochondrial biogenesis-and apoptosis-related proteins in skeletal muscle of patients with mtDNA defects. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2007; **293**(3): E672-E680. doi: 10.1152/ajpendo.00043.2007
19. Fang J, Wu L, Chen L. Postconditioning attenuates cardiocyte ultrastructure injury and apoptosis by blocking mitochondrial permeability transition in rats. *Acta cardiologica* 2008; **63**(3): 377-387. doi: 10.2143/AC.63.3.1020316
20. Marzetti E, Lawler JM, Hiona 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 Radical Biology and Medicine* 2008; **44**(2): 160-168. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.05.028
21. Musumeci G, Imbesi R, Szychlinska MA, Castrogiovanni P. Apoptosis and Skeletal Muscle in Aging. *Open Journal of Apoptosis* 2015; **4**(2): 41. doi: 10.4236/ojapo.2015.42004