



Research Article

The Effect of 8 Weeks of Moderate Intensity Continuous Training on the Expression of Apoptotic Genes in Heart Tissue of Aged Rats

Sajjad Ramezani¹ , Farnaz Seifi – Skishahr^{2*}

¹PhD Student Department of Sports Physiology, Faculty of Educational Sciences and Psychology, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran

²Associate Professor Department of Sports Physiology, Faculty of Educational Sciences and Psychology, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran

***Corresponding author:** Farnaz Seifi – Skishahr, Associate Professor Department of Sports Physiology, Faculty of Educational Sciences and Psychology, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran. E-mail: f.seify@yahoo.com.

DOI: [10.32592/nkums.16.2.45](https://doi.org/10.32592/nkums.16.2.45)

How to Cite this Article:

Ramezani S, Seifi – Skishahr F. The Effect of 8 Weeks of Moderate Intensity Continuous Training on the Expression of Apoptotic Genes in Heart Tissue of Aged Rats. J North Khorasan Univ Med Sci. 2024;16(2):45-53. DOI: 10.32592/nkums.16.2.45

Received: 21 Aug 2023

Accepted: 07 Jan 2024

Keywords:

Continuous exercise
Apoptosis
Heart
elderly

Abstract

Introduction: Aging process with progressive decrease of cardiac function is due to the death of cardiac myocyte characterized by apoptosis. On the other hand, physical activity not only improves heart function, but also reduces the risk of heart disease. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of 8 weeks of continuous moderate exercise on *BAX*, *P53*, and *caspase 3* gene expression in the heart tissue of aged male rats.

Method: In this experimental study, 16 male Wistar rats with an average age of 19 ± 2.25 months and weight of 350.02 ± 20.12 grams were randomly divided into two groups of moderate intensity continuous training (MT) and control (C). The continuous aerobic exercise program (MICT) was performed for 8 weeks and five sessions per week with an intensity of 60-75% of the maximum speed. Then, 48 hours after the last exercise session, heart tissue was removed under general anesthesia. *BAX*, *P53*, and *caspase 3* gene expression values were measured by real time PCR method. Independent t statistical method was used in SPSS 21 software for data analysis.

Results: The results showed that performing eight weeks of moderate-intensity continuous training caused a significant decrease in the apoptotic indices of *BAX* ($P=0.012$), *P53* ($P=0.015$), and *caspase 3* ($P=0.002$) in the heart tissue of elderly rats compared to the control group.

Conclusion: It seems that regular aerobic exercises with moderate intensity can significantly reduce the apoptosis index of heart tissue and the aging process.



تأثیر ۸ هفته تمرینات تداومی با شدت متوسط بر بیان ژن‌های آپوپتوزی بافت قلب موش‌های صحرایی سالمند

سجاد رضائی^۱ ID، فرناز سیفی اسگ شهر^۲ ID*

^۱ دانشجوی دکتری گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روان‌شناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
^۲ دانشیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روان‌شناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
*نویسنده مسئول: فرناز سیفی اسگ شهر، دانشیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روان‌شناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. ایمیل: f.seify@yahoo.com

DOI: 10.32592/nkums.16.2.45

چکیده مقدمه: فرایند پیری با کاهش پیش‌رونده عملکرد قلبی به واسطه از دست دادن میوسیت‌های قلبی از طریق آپوپتوز مشخص می‌شود. از طرفی، فعالیت بدنی نه تنها باعث بهبود عملکرد قلبی می‌شود، بلکه خطر بیماری‌های قلبی را هم کاهش می‌دهد. از این رو، هدف پژوهش حاضر بررسی تأثیر ۸ هفته تمرین تداومی با شدت متوسط بر بیان ژن <i>BAX</i>، <i>P53</i> و کاسپاز ۳ بافت قلب موش‌های صحرایی نر سالمند بود.	تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۱۷
روش کار: در این مطالعه تجربی، ۱۶ سر موش صحرایی نر از نژاد ویستار با میانگین سنی $19 \pm 2/25$ ماه و وزن $350 \pm 20/12$ گرم به طور تصادفی به دو گروه تمرین تداومی با شدت متوسط (<i>MT</i>) و کنترل (<i>C</i>) تقسیم شدند. برنامه تمرین هوازی تداومی (<i>MICT</i>) به مدت ۸ هفته و ۵ جلسه در هفته با شدت ۶۰ تا ۷۵ درصد حداکثر سرعت به صورت فزاینده انجام شد. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، پس از بیهوشی کامل، بافت قلب برداشته شد. مقادیر بیان ژن <i>BAX</i>، <i>P53</i> و کاسپاز ۳ با روش <i>Real time PCR</i> اندازه‌گیری شد. از روش آماری <i>t</i> مستقل در نرم‌افزار <i>SPSS</i> نسخه ۲۱ برای تجزیه و تحلیل داده استفاده شد. یافته‌ها: نتایج نشان داد که انجام ۸ هفته تمرین تداومی با شدت متوسط باعث کاهش معنی‌دار شاخص‌های آپوپتوزی <i>BAX</i> ($P=0/012$)، <i>P53</i> ($P=0/015$) و کاسپاز ۳ ($P=0/002$) در بافت قلب موش‌های سالمند نسبت به گروه کنترل شد. نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که انجام منظم تمرینات هوازی تداومی با شدت متوسط می‌تواند در کاهش شاخص‌های آپوپتوز بافت قلب و کند شدن سرعت فرایند پیری نقش بسزایی داشته باشد.	واژگان کلیدی: تمرین تداومی آپوپتوز قلب سالمند

مقدمه

آپوپتوزی از میتوکندری به سیتوزول، موجب فعال‌سازی پروکاسپاز ۹ و سپس، کاسپاز ۹ و در نهایت، فعال‌سازی کاسپاز ۳ به عنوان کاسپاز اجرایی و فصل مشترک همه مسیرهای داخلی و خارجی آپوپتوز می‌شود [۲]. در مسیر خارجی، زمانی که گیرنده‌های مرگ غشای سلولی (*TNFR1*، *TRAIL-R1* و *TRAIL-R2*) به لیگاند خود یعنی اینترلوکین ۱ بتا ($IL-1\beta$)، عامل مرگ بافتی تومور آلفا (*TNF-α*)، لیگاند *Fas* (*FasL*) و... متصل می‌شوند، موجب فعال‌سازی کاسپازها می‌شوند و در نهایت، مرگ سلولی اتفاق می‌افتد [۴]. فرایند آپوپتوز به طور دقیق به کنش و برهم‌کنش این محصولات ژنی بستگی دارد که فرایند خودکشی سلول را مهار یا فعال می‌کند. به این معنی که آپوپتوز توسط رونویسی ژن پیش‌آپوپتوزی *Bax* و ممانعت ژن آنتی‌آپوپتوزی *Bcl-2* تعیین می‌شود [۵]. همچنین، پیشینه پژوهشی بیانگر ارتباط بین پروتئین *P53* یا سرکوبگر تومور با فرایند آپوپتوز است [۶]. پروتئین *P53* در تنظیم چرخه سلولی، پیری، آپوپتوز و ثبات ژنوم فعال است و

فرایند پیری با کاهش تدریجی عملکرد قلب، برون‌ده قلبی، جریان خون و مصرف اکسیژن و افزایش حساسیت به التهاب، استرس اکسیداتیو و بیماری مشخص می‌شود. اختلال در عملکرد قلب باعث افزایش سیتوکین‌های التهابی و استرس اکسیداتیو می‌شود که از ویژگی‌های مشترک بین پیری و بیماری‌های قلبی و عروقی است [۱]. به نظر می‌رسد که کاهش درخور توجه در میوسیت‌های قلب به طور مستقیم در اختلال عملکرد انقباضی، کاردیومیوپاتی، بیماری‌های قلبی و نارسایی قلبی دخیل است. این در حالی است که مطالعات نشان داده‌اند میوسیت‌های قلب یک مرد ۷۰ ساله در مقایسه با یک بزرگسال جوان ۳۰ درصد کمتر است [۱]. از دیدگاه فیزیولوژیکی، مرگ سلولی در بافت قلب مسیر مهمی معرفی شده است که بر انواع رویدادهای سلولی غیرپاتولوژیک نظارت می‌کند [۲] که از طریق دو مسیر داخلی (وابسته به اعضای خانواده لنفم *B* (*BCL-2*) و *BAX* و مسیر خارجی یا گیرنده‌های مرگ) اتفاق می‌افتد [۳]. به عبارتی، رهایش عوامل

بررسی تأثیر ۸ هفته تمرین هوازی تداومی (MICT) با شدت متوسط بر بیان شاخص‌های آپوپتوزی BAX، کاسپاز ۳ و P53 در بافت قلب موش‌های صحرایی نر سالمند بود.

روش کار

پژوهش حاضر از نوع تجربی و بنیادی است که به صورت گروه مداخله‌ای و کنترل انجام گرفت. در این پژوهش، ۱۶ سر موش صحرایی سالمند نر از نژاد ویستار با میانگین سنی ۱۸ تا ۲۰ ماه و محدوده وزنی ۳۰۰ تا ۳۸۰ گرم از مرکز پرورش و تکثیر حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه و به آزمایشگاه تخصصی این واحد دانشگاهی منتقل شدند. پژوهش حاضر مطابق دستورالعمل‌های مؤسسه ملی بهداشت (NIH) و با تأیید کمیته اخلاق دانشگاه محقق اردبیلی به شماره IR.UMA.REC.1402.022 انجام شد. تمامی موش‌های صحرایی در قفس‌های تمیز و استریل شده شفاف تحت شرایط استاندارد با چرخه تاریکی و روشنایی ۱۲ ساعته و دمای ۱۹ تا ۲۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. حیوانات با رژیم غذایی استاندارد آزمایشگاهی جوندگان (پروتئین خام ۱۹/۵۰ تا ۲۰/۵۰ درصد، چربی ۴/۵ تا ۵/۳ درصد، فیبر ۴ تا ۴/۵ درصد، کلسیم ۰/۹۵ تا ۱ درصد، فسفر ۰/۶۵ تا ۰/۷ درصد، نمک ۰/۵ تا ۰/۵۵ درصد، لیزین ۱/۱۵ درصد، متیونین ۰/۳۳ درصد، ترئونین ۰/۷۲ درصد، تریپتوفان ۰/۲۵ درصد و کالری ۱۶/۱۶ تا ۱۷ mg/kg) و آب لوله‌کشی به صورت دسترسی نامحدود تغذیه شدند. پس از طی یک دوره یک‌هفته‌ای سازگاری با محیط آزمایشگاه، موش‌های صحرایی به طور تصادفی به ۲ گروه ۸ سره کنترل (C) و تمرین تداومی (MT) تقسیم شدند.

پروتکل تمرین تداومی با شدت متوسط

پروتکل تمرین تداومی با شدت متوسط (جدول ۱) به گونه‌ای تدریجی در طول ۸ هفته افزایش می‌یافت تا حیوان با محرک تمرینی جدید سازگار شود و استرس ناشی از تمرینات به گونه‌ای تدریجی افزایش یابد. در ابتدای پژوهش، همه موش‌ها به منظور کاهش استرس و همچنین آشنایی با دویدن روی تردمیل، در یک برنامه آشناسازی تمرینی به مدت یک هفته با سرعت ۱۰ متر در دقیقه و مدت زمان ۱۰ دقیقه شرکت کردند. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه آشناسازی، موش‌ها متحمل یک آزمون ورزشی فزاینده تا مرز خستگی شدند تا حداکثر سرعت دویدن روی تردمیل مشخص شود. این آزمون فزاینده با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه شروع می‌شد و هر ۳ دقیقه، سرعتی معادل با ۳ متر بر دقیقه به سرعت آن افزوده می‌شد. زمان رسیدن به خستگی با عدم توانایی موش‌ها در دویدن روی تردمیل با وجود ایجاد شوک الکتریکی مشخص شد [۱۶]. بر اساس سرعت حداکثر به دست آمده، تمرینات به مدت ۸ هفته و ۵ جلسه در هفته برای گروه تمرینی طراحی شد. پروتکل تمرینی در هفته اول پس از آشناسازی با شدتی حدود ۶۰ درصد حداکثر سرعت و به مدت ۱۵ دقیقه شروع شد که تا هفته هشتم به صورت فزاینده به شدت ۷۵ درصد حداکثر سرعت رسید و به مدت

نقش مؤثری دارد. این پروتئین با فعال‌سازی فرایند آپوپتوز از تکثیر و ترمیم سلول‌های عضلانی جلوگیری می‌کند و باعث تسریع در مرگ سلولی می‌شود [۱۶]. نتایج مطالعات نشان داده‌اند که با پیر شدن، میزان آپوپتوز به شکل درخور توجهی در قلب افزایش می‌یابد که می‌تواند احتمالاً به علت افزایش بیان ژن‌های مولد P53، کاسپازها و کاهش بیان BCL2 باشد و این داده‌ها نشان می‌دهند که قلب پیر بیشتر از قلب جوان مستعد ابتلا به آپوپتوز است [۷]؛ بنابراین، پژوهشگران همواره به دنبال روش‌های مناسب پیشگیری از آپوپتوز و بیماری‌های مختلف قلبی مرتبط با سالمندی هستند. در دهه‌های اخیر، تأثیر فعالیت‌ها و تمرین ورزشی بر آپوپتوز مورد علاقه محققان حوزه ورزش بوده است [۸]. در این باره، برخی از پژوهشگران عنوان کردند یک جلسه فعالیت ورزشی تا ۴۸ ساعت می‌تواند موجب افزایش سرعت آپوپتوز شود [۹، ۱۰]. این در حالی است که برخی مطالعات نشان داده‌اند انجام تمرینات ورزشی با شدت متوسط و مداوم احتمالاً موجب کاهش آپوپتوز در بافت‌های مختلف می‌شود. در این راستا، آذربایجانی و همکاران (۲۰۲۲) در مطالعه خود نشان دادند که تمرین هوازی باعث کاهش آپوپتوز، به خصوص کاسپاز ۳، در بافت قلب می‌شود [۱۱].

کی واک (۲۰۱۳) نیز در مطالعه خود بیان کرد که تمرین استقامتی آرایش پیام‌رسانی آپوپتوزی و فرایند آپوپتوز را معکوس می‌کند و نشان داد که تمرین استقامتی از قلب در مقابل آپوپتوز محافظت می‌کند [۱]. اگرچه سازوکارهای دقیق فعالیت ورزشی منظم بر تنظیم مسیر آپوپتوزی حاصل از پیری به درستی مشخص نیست، پیشینه پژوهش‌ها نشان می‌دهد که فعالیت ورزشی می‌تواند از طریق کاهش فعالیت مولکول P53 در نتیجه مهار آزادسازی سیتوکروم C مانع از فعال شدن کاسپازهای آغازگر و اجرایی (کاسپاز ۳) و تداوم ایجاد فرایند آپوپتوز شود [۱۲]. در این زمینه، مرادیان و همکاران بیان کردند که ۸ هفته تمرین ورزشی، صرف‌نظر از نوع آن، باعث ایجاد تأثیرات مثبت در عوامل آپوپتوزی می‌شود [۱۳]. کین و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که ۷ هفته تمرینات شنا میزان کاسپاز ۳ و بیان فاکتور مشتق از آپوپتوزیس (BAX) را به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد، اما موجب افزایش BCL-2 در موش‌های مبتلا به التهاب روده می‌شود [۱۴].

همچنین، سان (Sun) و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که یک جلسه فعالیت وامانده‌ساز شنا موجب کاهش چشمگیر بیان ژن BCL-2 در ۶ ساعت پس از ورزش می‌شود، اما تأثیری بر BAX و نسبت BAX به BCL-2 ندارد [۱۵]. پی بردن به عملکردهای مداخلات ورزشی شناخت بهتری از واکنش‌های فرایند سالمندی ایجاد می‌کند و فرصت بالینی نویدبخشی را برای پیشگیری از پیری انسان و بیماری‌های مرتبط با آن فراهم می‌کند. لذا با توجه به نقش آپوپتوز در فرایند پیری و مطرح شدن مؤلفه‌های گوناگون تمرینی در تغییرات نشانگرهای آپوپتوز و متناقض بودن نتایج پژوهش‌های انجام شده و محدود بودن پژوهش‌ها در زمینه مداخله فعالیت ورزشی در نمونه‌های سالمند سالم، هدف پژوهش حاضر

Tube قرار داده شد و ۵۰ µl از RNase-free ddH₂O به RB Mini Column اضافه شد و ۱ دقیقه به آن زمان داده شد و بعد از ۱ دقیقه، به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ RPM سانتریفیوژ شد. محلول درون Elution Tube، RNAهای استخراج شده بود که در ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

سنتز cDNA طبق دستورالعمل شرکت Thermo Scientific کشور آمریکا انجام گرفت. واکنش رونویسی معکوس با استفاده از آنزیم RevertAidTM-MuLV Reverse trans -criptas صورت گرفت. هنگام تهیه cDNA نمونه خالص شده، پس از مشاهده جذب، ۱۰۰۰ نانوگرم RNA برداشته شد و سپس، ۰/۵ میکرولیتر Random Hexamers (الیگودنوکسی ریبونوکلوئید به عنوان پرایمری برای شروع سنتز cDNA استفاده می شود)، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر dT Oligo و سپس تا حجم ۱۲ میکرولیتر آب موجود به کیت اضافه شد و به دمای ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه منتقل شد و سپس به مدت ۲ دقیقه روی یخ قرار گرفت. در مرحله بعد، ۴ µl از 5 Reaction Buffer و ۲ µl از dNTP Mix و ۱ µl از ۱ RiboLock RNase Inhibitor و ۱ µl از RevertAid RT به ترکیب قبل که برای ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار گرفته بود، اضافه شد. سپس، ترکیب به مدت ۵ دقیقه در دمای ۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. بعد از آن، به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد قرار گرفت. در آخر، به منظور از کار افتادن آنزیم RT، تیوب های واکنش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد قرار داده شد. cDNA آماده شده برای انجام RT-PCR به کار رفت.

پس از بهینه سازی واکنش، cDNA مربوط به گروه های مورد آزمایش تحت واکنش RT-PCR قرار گرفت. اصول انجام RT-PCR مشابه PCR معمولی بود، با این تفاوت که به جای MasterMix معمولی از MasterMix حاوی سایبرگرین (تاکارا، ژاپن) استفاده شد. دمای اتصال برای همه پرایمرها ۶۰ درجه سانتی گراد بود. توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه در جدول ۲ ارائه شده است. همچنین، به منظور بررسی بیان ژن های BAX، P53 و کاسپاز ۳ برای گروه های سلولی از مخلوط RealQ 2x Master mix Green Dye (ساخت AMPLQON آلمان) طبق دستورالعمل کیت استفاده شد. برنامه دستگاه Real-time PCR شرکت ترموفیشر کشور آمریکا به صورت دومرحله ای تنظیم شد. پس از اتمام فعالیت دستگاه و مشاهده نمودارها مبنی بر افزایش تعداد قطعه مدنظر و میزان نشر فلورسانس با محاسبه $\Delta\Delta C_t$ میزان تغییر در بیان ژن مدنظر نسبت به B2m و گروه کنترل سنجیده شد [۱۸].

روش تجزیه و تحلیل داده ها

برای تجزیه و تحلیل داده ها ابتدا توزیع طبیعی داده ها با استفاده از آزمون شاپیروویلک مشخص شد. همچنین، برای بررسی اثر تمرین تداومی بر متغیرهای وابسته از آزمون t مستقل و برای بررسی رابطه بین وزن و متغیرهای آپوپتوز از آزمون ضریب همبستگی پیرسون در نرم افزار SPSS نسخه ۲۶ استفاده شد. سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

۳۰ دقیقه انجام شد. در پایان هر جلسه نیز موش ها با سرعتی حدود ۱۰ تا ۱۲ متر بر دقیقه سرد کردند. شیب نوار گردان صفر درجه بود و در ۸ هفته تغییری نداشت [۱۶، ۱۷].

جدول ۱. پروتکل تمرین تداومی با شدت متوسط (MICT)

هفته	شدت فعالیت (درصد)	مدت فعالیت (دقیقه)
اول	۶۰	۱۵
دوم	۶۰	۱۵
سوم	۶۵	۲۰
چهارم	۶۵	۲۰
پنجم	۷۰	۲۵
ششم	۷۰	۲۵
هفتم	۷۵	۳۰
هشتم	۷۵	۳۰

مراحل نمونه گیری بافت و اندازه گیری تغییرات آپوپتوزی در بافت قلب

در زمان ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، موش های صحرایی به وسیله تزریق کتامین با دوز ۹۵ میلی گرم بر کیلوگرم و زایلازین با دوز ۵ میلی گرم بر کیلوگرم (شرکت آلفاسان کشور هلند) به صورت داخل صفاقی و با سرنگ انسولین بیهوش شدند و بافت قلب موش های صحرایی را متخصصان آزمایشگاه جداسازی کردند و در ادامه، بلافاصله در ازت مایع فریز شده و در دمای ۷۰- نگهداری شد. برای بررسی های مولکولی در سطح بیان ژن، ابتدا استخراج RNA از بافت قلب طبق پروتکل شرکت سازنده (سینا ژن، ایران)، انجام گرفت. برای این منظور، پس از کوبیدن در آونگ استریل، ۳۰ میلی گرم بافت قلب درون تیوب ۱/۵ قرار داده شد. اولین مرحله برای استخراج RNA از سلول های حیوانی از ردن دیواره سلول ها با یک بافر لیزکننده (RB Buffer) است. ۳۵۰ µl از RB Buffer به نمونه رسوب سلولی حاصل از سانتریفیوژ اضافه شد (از قبل به ازای هر ۱ میلی لیتر، ۱۰ میکرولیتر mercaptoethanol به بافر اضافه شده بود) و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. در مرحله بعد، Filter Column درون Collection Tube قرار گرفت و مخلوط نمونه به Filter Column انتقال داده شد و با دور ۱۴۰۰۰ RPM به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شد. بعد از سانتریفیوژ، محلول روشن از Collection Tube به یک تیوب میکروسانتریفیوژ جدید انتقال یافت. سپس، هم حجم آن، یعنی ۳۵۰ µl، اتانول ۷۰ درصد به آن اضافه شد و به خوبی ورتکس شد. RB Mini Column درون Collection Tube قرار گرفت و نمونه ای که اتانول به آن اضافه شده بود به RB Mini Column انتقال یافت و با سرعت ۱۴۰۰۰ RPM به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول درون Collection Tube دور ریخته شد. در مرحله بعد، ۵۰۰ µl از Wash Buffer ۲ با سرعت ۱۴۰۰۰ RPM به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شد. این مرحله ۲ بار تکرار شد و سپس به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ RPM سانتریفیوژ شد. سپس، RB Mini Column درون Elution

جدول ۲. توالی پرایمرهای مورد مطالعه

Genes	Primer Sequences	Sizes (bp)
<i>Bax</i>	Forward: 5'- CTGCAGAGGATGATTGCTGA -3' Reverse: 5'- GATCAGCTCGGGCACTTTAG -3'	142
<i>P53</i>	Reverse: 5'- GGCTCCGACTATACCACTATCC -3' Reverse: 5'- GAGTCTTCCAGCGTGATGATG -3'	110
<i>Caspase 3</i>	Forward: 5'- AGCTTGGAACGCGAAGAA -3' Reverse: 5'- GCTTCCATGGATAGTCTTTGTTTC -3'	118
<i>B2m</i>	Forward: 5'- CGTGCTTGCCATTCAGAAA -3' Reverse: 5'-ATATACATCGGTCTCGGTGG -3'	244

یافته‌ها

وزن موش‌های صحرایی در گروه‌های مورد تحقیق در جدول ۳ ارائه شده است. نتایج آزمون *t* مستقل نشان داد که ۸ هفته تمرین تداومی باعث کاهش معنی‌دار وزن در موش‌های صحرایی سالمند شد، این در حالی است که در گروه کنترل، افزایش وزن معنی‌دار پس از ۸ هفته مشاهده شد ($P=0/001$).

میزان نسبی بیان شاخص آپوپتوزی *BAX* در گروه تمرین تداومی با میانگین و انحراف استاندارد $19/73 \pm 0/0$ کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل با میانگین و انحراف استاندارد $21/52 \pm 0/1$ داشت ($P=0/012$ و $t=4/122$). بیان ژن *P53* بافت قلب در گروه تمرین با

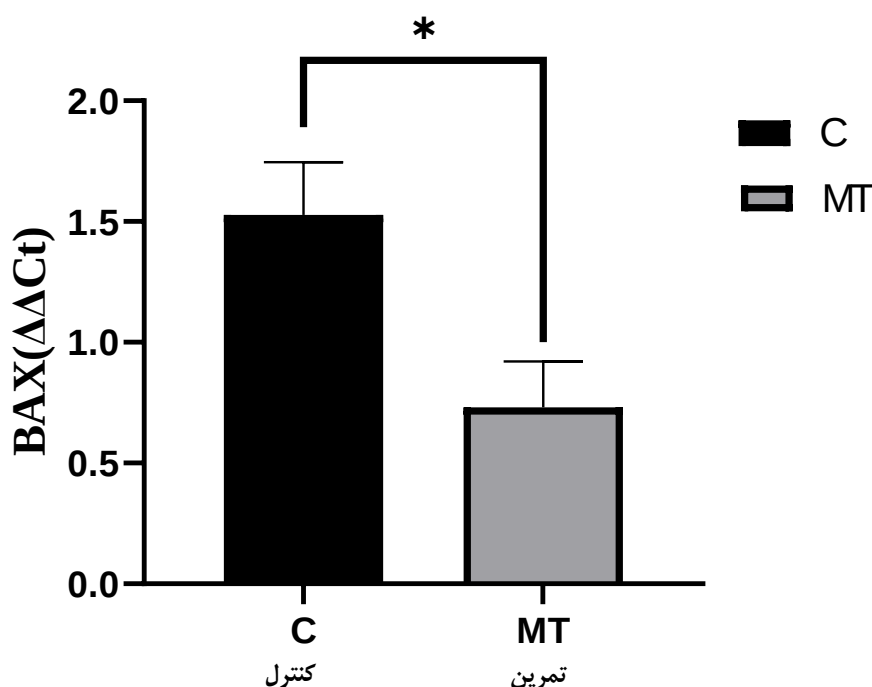
میانگین و انحراف استاندارد $20/81 \pm 0/0$ کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل با میانگین و انحراف استاندارد $23/21 \pm 0/1$ داشت ($P=0/015$ و $t=4/103$) (شکل ۲).

همچنین، بیان ژن کاسپاز ۳ در بافت قلب موش‌های گروه تمرین با میانگین و انحراف استاندارد $9/77 \pm 0/0$ کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل با میانگین و انحراف استاندارد $(16/24 + 0/1)$ داشت ($P=0/002$ و $t=2/436$) (شکل ۳). نتایج به‌دست‌آمده از بررسی ضریب هم‌بستگی نشان داد که بین متغیر وزن و شاخص‌های آپوپتوزی *BAX*، *P53* و کاسپاز ۳ ارتباط معناداری وجود ندارد (جدول ۴).

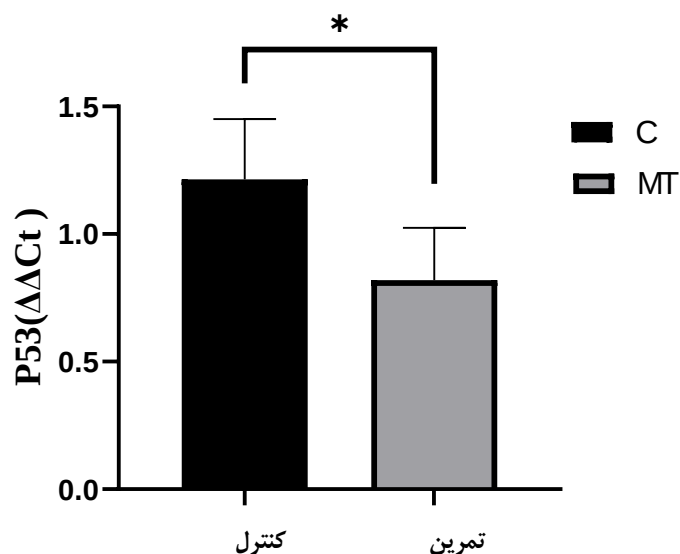
جدول ۳. سطوح پیش‌آزمون و پس‌آزمون وزن موش‌های صحرایی در گروه‌های مورد مطالعه

P-value	گروه	
	پیش‌آزمون (گرم)	پس‌آزمون (گرم)
	میانگین و انحراف استاندارد	میانگین و انحراف استاندارد
$\dagger 0/001$	$320/4 \pm 31/57$	$345/4 \pm 57/64$
$* 0/001$	$350/5 \pm 27/68$	$277/4 \pm 00/32$

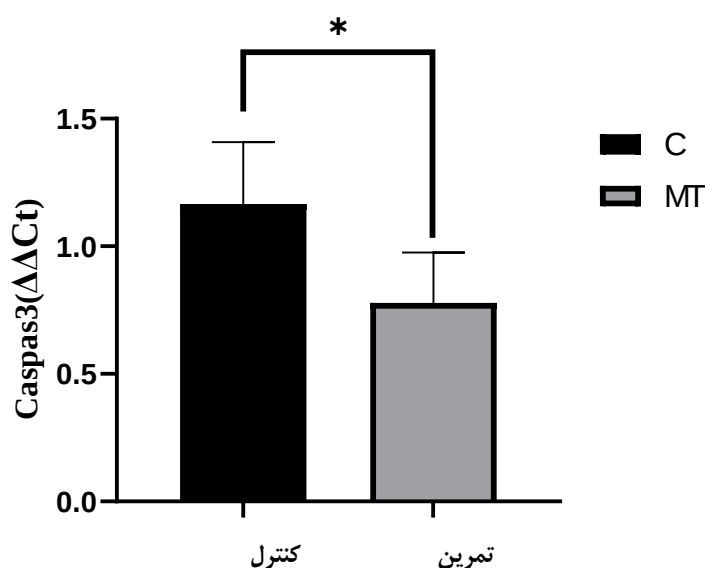
* کاهش معنادار نسبت به گروه کنترل، † افزایش معنادار نسبت به گروه کنترل



شکل ۱. میزان نسبی بیان ژن *BAX* در گروه‌های تمرین تداومی (MT) و کنترل (C) * تفاوت معنادار گروه تمرین با کنترل ($P=0/012$) (میانگین ± انحراف استاندارد)



شکل ۲. میزان نسبی بیان ژن P53 در گروه‌های تمرین تداومی (MT) و کنترل (C)
* تفاوت معنادار گروه تمرین با کنترل ($P=0/012$) (میانگین $\pm$ انحراف استاندارد)



شکل ۳. میزان نسبی بیان ژن کاسپاز ۳ در گروه‌های تمرین تداومی (MT) و کنترل (C)
* تفاوت معنادار گروه تمرین با کنترل ($P=0/002$) (میانگین $\pm$ انحراف استاندارد)

جدول ۴. بررسی رابطه بین وزن و شاخص‌های آپوپتوزی

وزن	همبستگی پیرسون	BAX	P53	Caspas3
	مقدار P	۰/۷۲۳	۰/۹۶۷	۰/۵۰۶
	همبستگی پیرسون	۰/۱۵۰	-۰/۰۱۸	۰/۲۷۷

بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که ۸ هفته تمرین تداومی با شدت متوسط تأثیر معنی‌داری بر کاهش بیان ژن BAX و کاسپاز ۳ بافت قلب موش‌های صحرایی نر سالمند دارد. بر اساس مطالعات، افزایش نسبت BAX/BCL2 با پیری قلب مستقیماً با افزایش سیگنال‌دهی کاسپاز پایین‌دستی از جمله کاسپاز ۹ و کاسپاز ۳ مرتبط است که باعث تکه‌تکه

شدن DNA و مرگ سلولی می‌شود. این در حالی است که نشان داده شده است فعالیت ورزشی در قلب سالخورده به بهبود تغییرات ناشی از افزایش سن در مسیرهای آپوپتوز با واسطه میتوکندری منجر می‌شود. همچنین، به‌طور خاص کاسپاز ۳ الگوی مشابهی را با تکه‌تکه شدن DNA در اثر پیری نشان داد که نشان‌دهنده این است که کاسپاز ۳ مشخصه‌ای اساسی در آپوپتوز است [۱]. در همین راستا، رضایی و همکاران

(۲۰۲۱) در مطالعه‌ای درباره تأثیر تمرینات هوازی بر آپوپتوز بافت قلب موش‌های مسموم‌شده با آب‌اکسیژنه نشان دادند که تمرینات هوازی تأثیر معنی‌داری بر کاهش شاخص‌های آپوپتوزی *BAX* و کاسپاز ۳ دارد [۱۹]. همچنین، نتایج کواک و همکاران به کاهش آپوپتوز عضله میوکارد موش‌های صحرایی مسن در پی تمرین استقامتی اشاره داشت. در این مطالعه نشان داده شد که ۱۲ هفته تمرین استقامتی با شدت متوسط به‌طور معنی‌داری موجب کاهش شاخص‌های آپوپتوزی در میوکارد موش‌های مسن می‌شود [۲۰]. قجری شلمزاری و همکاران نیز در مطالعه خود نشان دادند که گذر عمر باعث افزایش شاخص‌های آپوپتوزی *BAX* و کاسپاز ۹ در بافت قلب موش‌های صحرایی می‌شود، درحالی‌که انجام ۸ هفته تمرین تداومی و تناوبی باعث کاهش معنی‌دار این شاخص‌ها شد [۲۱] که همسو با نتایج مطالعه حاضر است. بالین‌حال، نتایج برخی از مطالعات با نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر ناهم‌سوست. در همین راستا، تبریزی و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که ۱۲ هفته برنامه تمرینی هوازی با شدت ۷۵ تا ۸۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه به‌طور معنی‌داری باعث افزایش بیان ژن کاسپاز ۹ در عضله قلبی موش‌های صحرایی نر مسن در گروه تمرین می‌شود. به عبارتی، ۱۲ هفته تمرین هوازی روی نوار گردان با شدت ۷۵ تا ۸۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه، موجب افزایش درخور توجه هر دو ژن مربوط به آپوپتوز میتوکندریایی عضله قلبی موش‌های صحرایی می‌شود و این احتمال وجود دارد که این موضوع در نهایت، موجب تشدید بروز فرایند آپوپتوز از طریق مسیر داخلی شود [۹]. Olah و همکاران (۲۰۱۵) نیز در مطالعه خود نشان دادند که یک جلسه تمرین مقاومتی در موش‌های صحرایی و ۳ ساعت شنای اجباری موجب افزایش *BAX* می‌شود که نشان‌دهنده افزایش سیگنالینگ آپوپتوز است و ورزش حاد به اختلال در سیستم ماتریکس میتوکندری می‌انجامد [۲۲]. کاظمی و همکاران (۲۰۲۲) نیز در مطالعه‌ای به بررسی بیان ژن *BAX* و *BCL2* بافت قلب در رت‌های مسن در پاسخ به یک جلسه فعالیت وامانده‌ساز پس از ۱۲ هفته مصرف عصاره جای سبز پرداختند و نشان دادند که یک وهله فعالیت ورزشی باعث افزایش بیان ژن *BAX* و نسبت *BAX* به *BCL2* شد [۲۳]. از دلایل اختلاف در نتایج به‌دست‌آمده می‌توان به عواملی مانند نوع نمونه‌های انتخابی، سن، سطح آمادگی و همچنین وضعیت سلامتی، تغذیه، پروتکل تمرینی و نحوه سنجش متغیرها اشاره کرد که ممکن است در این ناهم‌سو بودن نتایج نقش داشته باشد. اگرچه مکانیسم‌های دقیق آپوپتوز ناشی از فعالیت ورزشی به‌طور دقیق مشخص نیست، فرضیه‌های احتمالی زیادی وجود دارند که به بررسی‌های بیشتر نیاز دارند. یکی از فرضیه‌های مهم در این زمینه این است که حین فعالیت ورزشی، متابولیسم عضلانی افزایش می‌یابد که به تولید ROS منجر می‌شود. کمیت زیاد ROS می‌تواند آسیب اکسیداتیو تولید کند و این‌گونه به آپوپتوزیس از طریق مسیر داخلی منجر شود [۲۳]. گزارش شده است که کاهش درخور توجه بیان پروتئین کاسپاز ۳ در

پی تمرین هوازی با کاهش عوامل پیش‌آپوپتوزی مانند بیان پروتئین *BAX* و نسبت *BAX* به *BCL2* و نیز افزایش معنی‌دار پروتئین ضدآپوپتوزی *BCL2* همراه است. این کاهش پتانسیل آپوپتوز میتوکندریایی در پی تمرین هوازی در موش‌های سالخورده احتمالاً با کاهش ره‌ایش عوامل آپوپتیک، مانند سیتوکروم C و *APAF1*، موجب کاهش معنی‌دار بیان ژن کاسپاز ۳ شده است [۲۳]. همچنین، مطالعات نشان داده است که فعالیت ورزشی باعث بهبود فعالیت آنزیم‌های ضداکسایشی از جمله سوپراکسیددیسموتاز می‌شود که می‌تواند در تنظیم مسیر آپوپتوزی سالمندی اهمیت داشته باشد. از طرفی، نشان داده شده است که فعالیت ورزشی از طریق تنظیم پروتئین‌هایی از جمله ایزوفرم منگنز سوپراکسیددیسموتاز ($Mn-SOD$)، *NF-kB*، گیرنده واسطه کیناز مرتبط با خارج سلولی (*ERK*)، مسیر *IGF/AKT*، مسیر سیرتوئین‌ها (*Sirtuins*) و پروتئین‌های شوک حرارتی (*HSPs*) که تنظیم‌کننده بالادست آپوپتوز هستند، فرایند آپوپتوز را کاهش می‌دهند [۲۴].

یکی دیگر از نتایج به‌دست‌آمده از پژوهش حاضر کاهش معنی‌دار بیان ژن *P53* بافت قلب موش‌های صحرایی سالمند پس از ۸ هفته تمرین تداومی با شدت متوسط بود. در این راستا، همسو با مطالعه حاضر، هوشمند و همکاران (۲۰۲۱) در پژوهش خود نشان دادند که انجام ۱۲ هفته تمرین مقاومتی تأثیر معنی‌داری بر کاهش مقادیر سرمی *P53* مردان سالمند دارد [۲۵]. جان بزرگی و همکاران (۲۰۲۲) در مطالعه خود به این نتیجه رسیدند که انجام ۸ هفته تمرین هوازی با شدت ۵۰ تا ۶۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی باعث کاهش معنی‌دار پروتئین سالمندی *P53* در موش‌های دیابتی می‌شود [۲۶]. ژانگ‌تنگ (Zhengtang) و همکاران (۲۰۱۱) نیز در پژوهشی گزارش کردند که ۴ هفته فعالیت ورزشی تغییرات وابسته به سن فعالیت *P53* را کاهش می‌دهد و در نتیجه، اثرات محافظتی و ضدپیری در عضلات قلبی موش‌ها دارد [۲۷]. از طرفی، ناهم‌سو با پژوهش حاضر، کلایی و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه خود به این نتیجه رسیدند که تمرینات ترکیبی باعث افزایش سطح سرمی پروتئین *P53* در مردان مبتلا به سرطان پروستات می‌شود [۲۸]. سید قمی و همکاران (۲۰۱۷) نیز در پژوهشی نبود تغییرات معنی‌داری در بیان ژن *P53* عضله نعلی موش‌های صحرایی نر به دنبال سه ماه تمرین را گزارش کردند [۶]. زرباف و همکاران (۲۰۱۸) نیز نبود تغییرات معنی‌دار در بیان ژن *P53* به دنبال سه هفته تمرین با شدت متوسط در رت‌ها را گزارش کردند [۲۹]. از جمله دلایل ناهم‌سو بودن نتایج مطالعات ذکرشده می‌توان به بافت مورد بررسی، نوع آزمودنی‌ها، تعداد جلسات تمرین و شدت تمرین اشاره کرد. با توجه به پژوهش‌های انجام‌شده، از دلایل اصلی افزایش مقادیر *P53* فرایندهای ایجادشده ناشی از فشارهای اکسایشی است. نشان داده شده است که تمرینات منظم باعث کاهش استرس اکسیداتیو و بالا رفتن دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن می‌شود [۲۵]. در همین زمینه،

بافت قلب باشند.

نتیجه‌گیری

به‌طور خلاصه، به نظر می‌رسد که افزایش سن باعث افزایش مسیرهای آپوپتوزی با میانجی‌گری میتوکندری از جمله سطوح پروتئین‌های پیش‌آپوپتوزی مثل *Bax*، *P53*، کاسپاز ۳ و آپوپتوز می‌شود. با وجود این، تمرین تداومی با شدت متوسط توانست افزایش سیگنالینگ آپوپتوزی و آپوپتوز را برعکس کند که نشانه اثرات محافظتی این نوع تمرین برای عضله قلبی در مقابل آپوپتوز است. با این حال، پژوهش‌های بیشتری لازم است تا مکانیسم‌های مولکولی و سلولی حفاظت از عضله قلبی در برابر آپوپتوز ناشی از پیری را مشخص سازد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل طرح تحقیقی با حمایت دانشگاه محقق اردبیلی است. نویسندگان مقاله از تمامی عزیزی که در اجرای این پژوهش همکاری کرده‌اند، کمال تشکر و قدردانی را به عمل می‌آورند (کد اخلاق: IR.UMA.REC.1402.022).

تعارض منافع

نویسندگان این مقاله هیچ نفع متقابل از انتشار آن ندارند.

References

- Kwak HB. Effects of aging and exercise training on apoptosis in the heart. *J Exerc Rehabil*. 2013;9(2):212-9. DOI: 10.12965/jer.130002 PMID: 24278863
- Sedaghat M. Cardiac remodeling, apoptosis-related process (Bax, Bcl-2), and their ratio (Bax/Bcl-2) in cardiomyocytes of diabetic rats after combined exercise training and taurine supplementation. *Comp Clin Path*. 2021;30(5):801-10. DOI: 10.1007/s00580-021-03275-4
- Abadi N, Bashiri J. The effect of three-month aerobic training on the expression of AIF and caspase-9 gene in male rat soleus muscle. *JABS*. 2017;7(2):257-64. [Link]
- Huang M, Li ZX, Chen J, Chen L, Li YY. Extracts of Bauhinia Championii Alleviate Acute Neuronal Injury After Ischemic Reperfusion by Improving Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Neuronal Apoptosis. *Curr Med Sci*. 2022;42(3):483-90. DOI: 10.1007/s11596-022-2525-4 PMID: 35220494
- Morawska-Kochman M, Śmieszek A, Marcinkowska K, Marycz KM, Nelke K, Zub K, et al. Expression of Apoptosis-Related Biomarkers in Inflamed Nasal Sinus Epithelium of Patients with Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps (CRSwNP)—Evaluation at mRNA and miRNA Levels. *Biomedicines*. 2022;10(6):1400. DOI: 10.3390/biomedicines10061400 PMID: 35740420
- Seyedgomi F, Bashiri J, Gholami F. Effect of High Intensity Endurance Training on p53 and Cytochrome-c Gene Expression in Male Rat Soleus Muscle. *armaghani*. 2017;22(5):608-22. [Link]
- Shahrabadi H, Haghighi AH, Askari R, Asadi-Shekaari M, Souza DC, Gentil P. Effect of High-Intensity Interval Training on Cardiac Apoptosis Markers in Methamphetamine-Dependent Rats. *Curr Issues Mol Biol*. 2022;44(7):3030-8. DOI: 10.3390/cimb44070209 PMID: 35877433
- Sadighi A, Abdi A, Azarbayjani MA, Barari A. Effect of aerobic exercise on some factors of cardiac apoptosis in male rats. *KAUMS Journal (FEYZ)*. 2019;23(5):495-502. [Link]
- Javid Tabrizi N, Bashiri J, Narimani Rad M. Effect of 12 Weeks of Treadmill Aerobic Training on Cytochrome c and Caspase-9 gene Expression in Cardiac Muscle of Male Rats. *Qom Univ Med Sci J*. 2017;11(6):1-9. [Link]
- Koçtürk S, Kayatekin B, Resmi H, Açıkgöz O, Kaynak C, Özer E. The apoptotic response to strenuous exercise of the gastrocnemius and soleus muscle fibers in rats. *Eur J Appl Physiol*. 2008;102(5):515-24. DOI: 10.1007/s00421-007-0612-7 PMID: 18030491
- Kianmehr P, Azarbayjani MA, Peeri M, Farzanegi P. The effects of aerobic exercise training with octopamine supplementation on cardiomyocyte apoptosis induced by deep-frying oil: The role of caspase and procaspase 3. *Clin Nutr ESPEN*. 2022;49:529-35. DOI: 10.1016/j.clnesp.2022.02.008 PMID: 35623862
- Norouzi Kamareh MH, Zolfaghari MR, Ghaderi Pakdel F, Tolouei Azar J. Effect of 12 weeks aerobic training and oral green tea extract on cardiac caspase-3 expression in aged male rats. *Journal of Sport Biosciences*. 2018;10(2):221-235. DOI: 10.22059/jsb.2018.245693.1220
- Moradian F, Nazarali P, Alizadeh R. The effect of eight weeks of endurance and resistance training on apoptotic indexes in young men. *Journal of Isfahan Medical School*. 2018;36(489):845-52. DOI: 10.22122/jims.v36i489.10268
- Qin L, Yao ZQ, Chang Q, Zhao YI, Liu NN, Zhu XS, et al. Swimming attenuates inflammation, oxidative stress, and apoptosis in a rat model of dextran sulfate sodium-induced chronic colitis. *Oncotarget*. 2017;8(5):73917404. DOI: 10.18632/oncotarget.14080 PMID: 28030847
- Sun Y, Cui D, Zhang Z, Zhang T, Shi J, Jin H, et al. Attenuated oxidative stress following acute exhaustive swimming exercise was accompanied with modified gene expression profiles of apoptosis in the skeletal muscle of mice. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:8381242. DOI: 10.1155/2016/8381242 PMID: 27143996
- Motiei Haghighi M, Soori R, Shabkhiz F, Choobine S. Comparison of the effect of high intensity interval training and moderate intensity continuous training on gene expression of IL-6 and NF-kB in lung tissue of old and young male rats. *J Ilam Uni Med Sci*. 2019;27(5):54-64. DOI: 10.29252/sjimu.27.5.54
- Jokar M, Sherafati MM, Salehi M. The effect of endurance exercise

- on the content of ampk and pgc1 α proteins in the left ventricular heart tissue of rats with type 2 diabetes. *ijdl*. 2020;19(5):252-60. [Link]
18. Shamsi B, Abedi B, Ramezani S. The effect of eight weeks of resistance training with consumption of Tribulus terrestris extract on antioxidant indices of hippocampal tissue in male rats exposed to stanazol. *JAHSSP*. 2022;9(1):48-60. DOI: 10.22049/jahssp.2022.27659.1441
 19. Rezaei SM, Abedi B, Elahi HF. The effect of an aerobic exercise course on cardiac tissue apoptosis in adult male rats poisoned with oxygenated water. *J Vessel Circ*. 2021;2(4):201-8. DOI: 10.32598/JVC.2.4.97.1
 20. Kwak HB, Song W, Lawler JM. Exercise training attenuates age-induced elevation in Bax/Bcl-2 ratio, apoptosis, and remodeling in the rat heart. *FASEB J*. 2006;20(6):791-3. DOI: 10.1096/fj.05-5116fje PMID: 16459353
 21. Ghajari H, Hosseini SA, Farsi S, Azarbaijani M. The effect of interval and continuous training on some apoptotic markers in the heart tissue of rats. *Spo Phy Manag Invest*. 2019;11(4):165-74. [Link]
 22. Oláh A, Németh BT, Mátyás C, Horváth EM, Hidi L, Birtalan E, et al. Cardiac effects of acute exhaustive exercise in a rat model. *Int J Cardiol*. 2015;182:258-66. DOI 10.1016/j.ijcard.2014.12.045 PMID: 25585360
 23. Kazemi A, Behpoor N, Hematfar A. The effect of 12 weeks of green tea extract consumption on expression of bax and bcl-2 genes of old rats' heart tissue in response to acute exhaustive exercise. *Journal of Animal Biology*. 2022;14(3):71-82. DOI: 10.22034/ascij.2022.1943959.1332
 24. Soori R, Zare Shahneh M, Choubineh S, Ramezankhani A. Effect of high-intensity interval training on expression of pro and anti-apoptotic genes in myocard tissue of aged male C57BL/6 mice. *J Spo A Exer Physio*. 2018;11(2):13-24. [Link]
 25. Hooshmand MB, Gaeini AA, Eskandari M, Parseh S, Hojjati MM. Twelve weeks of resistance training intervention on serum levels of some apoptosis markers in elderly men. *J. Torbat Uni Med Sci* 2021;4(8):10-9. [Link]
 26. Janbozorgi M, Choobineh S. The effect of eight weeks of aerobic exercise on the expression of senescence proteins p53 and p16 in pancreatic tissue of diabetic mice. *IJDM*. 2022;22(1):45-54. [Link]
 27. Qi Z, He J, Su Y, He Q, Liu J, Yu L, et al. Physical exercise regulates p53 activity targeting SCO2 and increases mitochondrial COX biogenesis in cardiac muscle with age. *PloS One*. 2011;6(7):e21140. DOI: 10.1371/journal.pone.0021140 PMID: 21750704
 28. Rakabdarkolaee MA, Barari A, Abdi A, Hasrak K. The Effect of eight-week concurrent training on aerobic capacity and serum level of p53 tumor suppressor protein in prostate cancer patients: a clinical trial. *JRUMS*. 2018;17(8):731-44. [Link]
 29. Zarbaf R, Koushki Jahromi M, Daryanoosh F. The effects of aerobic exercise in Sprague Dawley pregnant rats on BRCA1 and P53 gene expression of adult offspring breast tissue. *JSKUMS*. 2018;20(5):13-24. [Link]
 30. Folli F, Corradi D, Fanti P, Davalli A, Paez A, Giaccari A, et al. The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus micro-and macrovascular complications: avenues for a mechanistic-based therapeutic approach. *Curr Diabetes Rev*. 2011;7(5):313-24. DOI: 10.2174/157339911797415585 PMID: 21838680
 31. Khorram H, Ravasi A, Hedayati M, Samadi A, Gaeini A. Effect of 8 weeks of resistance training on oxidative stress in diabetic rats. *JSUMS*. 2014;20(3):389-99. [Link]