Original Article

The effect of high-intensity interval training along with curcumin consumption on mitochondrial caspase 3 and 9 gene expression of cardiomyocyte in male rat of the stroke model

Rouzbehani AR[1], Rahmati S[2*]

1- Department of Exercise Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. Iran.
2- Department of Physical Education, Pardis Branch, Islamic Azad University, Pardis, I.R. Iran.

Received: 2023/01/23 | Accepted: 2023/07/10

Abstract:

Background: Apoptosis is a protective cellular process and physical activity and curcumin may affect some signaling pathways related to apoptosis. The aim of the present study was to evaluate the effect of high-intensity interval training (HIIT) and curcumin consumption on mitochondrial caspase 3 and 9 gene expression of cardiomyocyte in male rat of the stroke model.

Materials and Methods: In this experimental study, 32 male rats with myocardial infarction were assigned randomly into 4 equal groups (n=8) of HIIT, supplement, control, and supplement+HIIT. The HIIT groups were subjected to high-intensity interval training (10 bouts of 4-minute activity with an intensity of 85-90% of VO2max) for 8 weeks. The amount of 15 mg of pure curcumin per kilogram of body weight was given by a gavage to the supplement and HIIT+supplement groups, 5 days a week. All rats were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine and xylazine, 48 hours after the last training session, then surgery and dissection of the rats were performed.

Results: The results showed a significant decrease in the expression of caspase 3 and 9 genes in the HIIT and HIIT+supplement groups compared to the control and supplement groups.

Conclusion: It seems that HIIT and curcumin consumptions lead to a reduction of mitochondrial apoptosis in cardiac muscle. The present findings show that the expression of caspase 3 and 9 in cardiac tissue is a trainable factor.

Keywords: HIIT, Curcumin, Cardiac infarction, Apoptosis, rat

***Corresponding Author**
Email: salehrahmati@pardisiau.ac.ir
Tel: 0098 217 628 1010
Fax: 0098 217 628 1011

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, August, 2023; Vol. 27, No 3, Pages 254-261

Please cite this article as: Rouzbehani AR, Rahmati S. The effect of high-intensity interval training along with curcumin consumption on mitochondrial caspase 3 and 9 gene expression of cardiomyocyte in male rat of the stroke model. ***Feyz*** 2023; 27(3): 254-61.

تاثیر تمرین تناوبی شدید و مصرف کورکومین بر بیان ژن کاسپاز ۳ و ۹ کاردیومیوسیت‌های موش‌های نر مدل سکته قلبی

علیرضا روزبهانی[۱]، صالح رحمتی[۲*]

خلاصه:

سابقه و هدف: آپوپتوز یک فرایند سلولی محافظت‌کننده است و فعالیت بدنی و کورکومین ممکن است برخی از مسیرهای پیام‌رسانی مربوط به آپوپتوز را تحت تأثیر قرار دهد. هدف از پژوهش حاضر، ارزیابی تاثیر تمرین تناوبی شدید و مصرف کورکومین بر بیان ژن کاسپاز ۳ و ۹ میتوکندریایی کاردیومیوسیت موش‌های نر مدل سکته قلبی بود.

مواد و روش‌ها: ۳۲ سر موش صحرایی نر مبتلا به آنفارکتوس میوکارد به طور مساوی و تصادفی به ۴ گروه (۸ تایی) تمرین تناوبی با شدت بالا، مکمل، کنترل و مکمل+تمرین تقسیم شدند. گروه‌های تمرینی به مدت ۸ هفته تحت تاثیر تمرین تناوبی با شدت بالا (۱۰ وهله فعالیت ۴ دقیقه‌ای با شدت ۹۰-۸۵ درصد VO_2max) قرار گرفتند. مقدار ۱۵ میلی‌گرم کورکومین خالص به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن، ۵ روز در هفته و به صورت گاواژ به گروه‌های مکمل و تمرین+مکمل داده شد. تمامی موش‌های صحرایی، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، توسط تزریق درون صفاقی کتامین و زایلازین بیهوش گردیدند، سپس جراحی و تشریح موش‌های صحرایی انجام شد.

نتایج: تحلیل آماری بیانگر کاهش معنی‌دار در بیان ژن کاسپاز ۳ و ۹ در گروه تمرین و تمرین+مکمل نسبت به دو گروه کنترل و مکمل بود.

نتیجه‌گیری: تمرین تناوبی شدید و مصرف کورکومین به کاهش آپوپتوز میتوکندری عضله قلبی منجر می‌شوند. یافته‌های حاضر نشان داد که بیان کاسپاز ۳ و کاسپاز ۹ در بافت قلبی فاکتوری تمرین‌پذیر است.

واژگان کلیدی: تمرین تناوبی با شدت بالا، کورکومین، انفارکتوس قلبی، آپوپتوز، موش صحرایی

دوماه‌نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و هفتم، شماره ۳، مرداد-شهریور ۱۴۰۲، صفحات ۲۶۱-۲۵۴

مقدمه

در عصر حاضر، الگوی بیماری در اغلب کشورها به ویژه کشورهای در حال توسعه از بیماری‌های واگیردار به بیماری‌های غیرواگیردار تغییر کرده است [۱]. آنفارکتوس میوکارد یک وضعیت نکروزی حاد عضله قلب است [۲]. عوامل متعددی در سطح سلولی برای بروز بیماری‌های قلبی-عروقی مورد بررسی قرار گرفته‌اند که می‌توان به تغییرات ردوکس (Redox) سیتوزولی و آپوپتوز اشاره کرد [۳]. آپوپتوز یک فرایند سلولی محافظت‌کننده است که نقش مهمی در هموستاز و نیز عوامل پیدایش بیماری‌ها دارد. شواهد اخیر حاکی از آن است که تمرینات ورزشی ممکن است برخی از مسیرهای پیام‌رسانی مربوط به آپوپتوز را تحت تأثیر قرار دهد [۴]. پیام‌های آپوپتوزی به طور عمده توسط دو مسیر کنترل می‌شوند. مسیر داخلی شامل پیام‌رسانی و متعاقب آن آزادسازی عوامل آپوپتوزی مانند سیتوکروم c از میتوکندری است [۵]. سیتوکروم c موجب راه‌اندازی واکنش‌های کاسپازی در مسیر داخلی با فعالسازی پروکاسپاز ۹ و سپس کاسپاز ۹ به عنوان آغازگر آپوپتوز می‌شود [۶]. کاسپازها پس از فعال شدن، بسیاری از پروتئین‌های حیاتی سلولی را هیدرولیز و باعث ورود به مرحله غیرقابل برگشت مرگ می‌شوند [۷]. کاسپاز ۳ یکی از مهم‌ترین پروتئازهای اجراکننده در مسیر آپوپتوز است و تا قبل از فعال‌سازی به صورت خاموش باقی می‌ماند. کاسپاز ۳ فعال‌شده، مهارکننده DNase فعال‌کننده کاسپاز را می‌شکند و به مرگ سلولی منجر می‌شود [۸]. تمرینات تناوبی با شدت بالا اثر معنی‌داری بر بهبود ردوکس سلولی و افزایش بیوژنز میتوکندریایی دارند [۱۳-۱۱]. برخی از محققان معتقدند که بروز فشار در حین فعالیت‌های شدید ممکن است با افزایش عوامل پیش‌آپوپتوزی، باعث تشدید این فرایند و پیامدهای بعدی آن شود [۱۲]. تبریزی و همکاران نشان دادند ۱۲ هفته برنامه تمرین هوازی با شدت ۷۵ تا ۸۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه به طور معنی‌داری باعث افزایش بیان ژن کاسپاز ۹ در عضله قلبی موش‌های صحرایی نر در گروه تمرین می‌شود [۱۴]. در مقابل سیاهکوهیان و همکاران در پژوهش خود به این نتیجه رسیدند که ۱۲ هفته تمرین هوازی

۱. دانشجو، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. استادیار، گروه تربیت بدنی، واحد پردیس، دانشگاه آزاد اسلامی، پردیس، ایران

* نشانی نویسنده مسؤول:

گروه تربیت بدنی، واحد پردیس، دانشگاه آزاد اسلامی، پردیس، ایران

تلفن: ۰۲۱۷۶۲۸۱۰۱۰ دورنویس: ۰۲۱۷۶۲۸۱۰۱۱

پست الکترونیک: salehrahmati@pardisiau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۳ تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۲/۴/۱۹

باعث کاهش غیرمعنی‌دار پروتئین کاسپاز ۳ در موش‌های صحرایی می‌شود [۱۵]. همچنین McMilan و همکاران گزارش کردند که ۶ هفته تمرین استقامتی موجب کاهش قطعه قطعه شدن DNA، رهایش سیتوکروم c و پروتئین Bax می‌گردد [۱۶]. در بیماری‌های قلبی عروقی، دینامیک میتوکندری‌های بافت عضله قلبی دستخوش تغییر می‌شود و آپوپتوز افزایش می‌یابد. دینامیک میتوکندری یکی از روش‌های دفاعی سلول در برابر استرس اکسایشی و آپوپتوز است که نقش حفاظتی برای سلول دارد. استرس اکسایشی، از عوامل مهم ایجاد آپوپتوز و پیشرفت بیماری‌های نورودژنریتیو (Neurodegenerative) است [۱۷]. در میان مکانیسم‌های مختلف، تجمع رادیکال‌های آزاد در پاتوفیزیولوژی انفارکتوس حاد میوکارد موثر قلمداد شده است [۱۸]. کورکومین دارای اثرات ضد استرس اکسایشی و ضد التهاب است. این ماده در فرایندهایی مانند تکثیر سلولی، تمایز و مهاجرت سلولی نیز نقش ایفا می‌کند و می‌تواند مسیرهای پیام‌رسانی مرتبط با فاکتورهای رشد نظیر کینازهای خارج سلولی و پروتئین کیناز C را مهار کند [۱۹]. مطالعات اثر ترکیبی تمرین و کورکومین روی عملکرد قلب و عروق را نشان می‌دهد که تمرین منظم و مصرف کورکومین موجب افزایش عملکرد بطن چپ و همچنین عملکرد اندوتلیال عروق می‌شود [۲۰]. در ارتباط با تاثیر تمرینات تناوبی خیلی شدید بر متابولیسم سلولی مشخص شده که این تمرین محرکی قوی برای سازگاری‌های قلبی-عروقی و عضلانی بوده و به طور بالقوه می‌تواند رسیدن به سلامتی را در یک مدت زمانی موثر و کارآمد میسر کند [۲۱]. تمرینات تناوبی با شدت بالا، بازسازی فیزیولوژیکی قابل مقایسه با تمرین تداومی با شدت متوسط را در بزرگسالان سالم، با وجود الزام زمان کمتر قابل ملاحظه و کاهش حجم کل ورزش نشان داده است [۲۲]. در رابطه با نقش HIIT در آپوپتوز میتوکندریایی اطلاعات کمی در دست است. سنجش تعامل بین عوامل موثر در این فرایند و همچنین سازوکار احتمالی تاثیرگذاری HIIT بر آن برای ارتقای عملکرد قلبی و عروقی ممکن است در ارتقای کیفیت زندگی بیماران مبتلا به سکته قلبی موثر باشد [۲۳]. از سویی، تمرینات تناوبی شدید با دارا بودن فواصل استراحتی مناسب، حجم کمتر و بهره‌وری زمانی بیشتر، انتخاب بهتری در مقایسه با تمرین‌های تداومی سنتی برای بیماران هستند [۲۴]. لذا تحقیق حاضر در قالب یک طرح تجربی انجام شد تا پاسخ برخی از شاخص‌های آپوپتوز میتوکندریایی در عضله قلبی، متعاقب ۸ هفته تمرین تناوبی با شدت بالا و مصرف مکمل کورکومین را در موش‌های صحرایی نر مدل سکته قلبی مورد بررسی قرار دهد.

مواد و روش‌ها

در مطالعه تجربی حاضر، ۳۲ سر موش صحرایی نر ۷ ماهه ویستار با دامنه وزنی ۱۰±۱۹۰ گرم از مؤسسه پاستور ایران خریداری شد. شرایط نگهداری برای همه نمونه‌ها یکسان بود و دما، رطوبت محیط و چرخه روشنایی- تاریکی نیز به صورت ۱۲:۱۲ کنترل شد. برای ایجاد سازگاری، موش‌ها به مدت ۲ هفته در حیوان‌خانه مرکزی آزمایشگاه، تحت شرایط جدید قرار گرفتند.

برای ایجاد آنفارکتوس میوکارد، تزریق درون صفاقی ایزوپروترنول به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن به صورت محلول در نرمال سالین در ۲ روز متوالی و با فاصله ۲۴ ساعت انجام شد. برای اطمینان از القای آنفارکتوس میوکارد تجربی، از اندازه‌گیری تروپونین I قلبی استفاده شد [۱۵].

پس از اطمینان از القای آنفارکتوس میوکارد، موش‌ها، برای آشنایی با نحوه فعالیت روی نوارگردان الکترونیکی هوشمند حیوانی، در برنامه آشنایی شرکت داده شدند. ابتدا موش‌های صحرایی به مدت یک هفته در طی ۵ جلسه به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در هر جلسه با سرعت ۸ تا ۱۰ متر بر دقیقه روی نوارگردان به فعالیت پرداختند. گفتنی است به منظور آشنا کردن حیوانات با پروتکل‌های اصلی، شیب نوارگردان به تدریج در هر جلسه افزایش پیدا کرد تا در جلسه‌های چهارم و پنجم به شیب ۲۵ درجه رسید. موش‌های صحرایی پس از آشنایی با نحوه فعالیت روی نوارگردان، به طور تصادفی به ۴ گروه (هر گروه ۸ موش) شامل تمرین تناوبی با شدت بالا، مکمل (مصرف کورکومین)، تمرین تناوبی با شدت بالا+مکمل و کنترل، تقسیم شدند. ۴۸ ساعت پس از تزریق دوم ایزوپروترنول، مداخلات تمرینی و مصرف مکمل به مدت ۸ هفته آغاز شد.

تجویز کورکومین: مقدار ۱۵ میلی‌گرم کورکومین به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت حل شده در ۴ میلی‌لیتر آب مقطر در طی ۲ وهله (در هر وهله نصف دوز) به صورت گاواژ خوراکی در گروه‌های مکمل و تمرین+مکمل مصرف شد [۲۶].

پروتکل تمرین تناوبی: پروتکل HIIT مورد استفاده، برنامه تمرینی تعدیل‌شده توسط Hafstad و همکاران بود که به مدت ۸ هفته و ۵ جلسه در هفته بر روی نوارگردان اجرا شد. پروتکل HIIT شامل اجرای ۱۰ وهله فعالیت ۴ دقیقه‌ای با شدت ۹۰-۸۵ درصد VO_2max و با دوره‌های استراحتی فعال ۲ دقیقه‌ای بود که به صورت پیش‌رونده تا هفته ششم، سرعت نوارگردان افزایش یافت و ۲ هفته پایانی (هفتم و هشتم) سرعت نوارگردان حفظ شد. بر این اساس، سرعت نوارگردان از ۲۵ متر بر دقیقه در هفته اول به ۳۲ متر بر دقیقه در هفته ششم رسید و ۲ هفته پایانی این سرعت حفظ شد. همچنین، دوره‌های استراحت فعال از سرعت ۱۱ متر بر دقیقه در

هفته اول به سرعت ۱۶ متر بر دقیقه در هفته هشتم رسید و دو هفته پایانی این سرعت حفظ شد. توان هوازی از پروتکل غیرمستقیم با استفاده از نوارگردان برآورد شد. بر این اساس، بعد از ۱۰ دقیقه گرم کردن، آزمون دویدن شروع و سرعت نوارگردان هر ۲ دقیقه یک بار به میزان ۰/۰۳ m/s (۱/۸ m/min تا ۲) افزایش یافت تا حیوانات دیگر قادر به دویدن نباشند. سرعتی که در آن VO_2max به دست آمد به عنوان سرعت ماکزیمم تعریف شد [۲۴].

جراحی حیوانات آزمایشگاهی و استخراج نمونه: تمامی موش‌های صحرایی، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، توسط تزریق درون صفاقی کتامین (۹۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) بیهوش گردیدند. سپس جراحی و تشریح موش‌های صحرایی انجام شد و در ادامه پس از شکافتن و کنار زدن بافت‌های سطحی، بافت قلب خارج شد. استخراج نمونه‌های بافتی از طریق هموژن کردن، انجام گرفت. نمونه‌های هموژن به مدت ۴۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ روی یخ سانتریفوژ شدند. سپس بخش سطحی سانتریفیوژ جمع‌آوری و تا زمان تحلیل در دمای ۸۰ - درجه نگهداری شد. بافت عضله قلبی نمونه‌برداری شده پس از شستشو در سرم فیزیولوژیک در میکروتیوب‌های ۱/۸ حاوی مایع RNAlaterTM با نسبت ۲۰ درصد غوطه‌ور گردیده و برای انجام آزمایش‌های ژنتیک به آزمایشگاه انتقال داده شد.

اندازه‌گیری بیان ژن‌های موردنظر در سطح رونویسی از بافت عضله قلبی به‌وسیله تکنیک PCR–time Real سنجش و پس از کمی‌سازی مقادیر بیان ژن با استفاده از فرمول ctΔΔ تجزیه و تحلیل شد. واکنش PCR با استفاده از master mix PCR (Applied Biosystems) و SYBR Green در دستگاه (Applied Biosystems, Sequence ABI Step One Detection Systems. Foster City, CA) طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ ارائه شده است. برای سنجش کمی بیان ژن‌ها در سطح رونویسی از کیت (SYBR-green Real Time RT-PCR, TAKARA) (ژاپن) استفاده شد. غلظت‌های ۱/۲۰، ۱/۱۰ و ۱/۵۰ میکرولیتر از cDNA سنتز شده تهیه شد. غلظت ۱/۲۰ به عنوان الگو برای Real-time PCR استفاده شد. cDNA با پرایمرهای مخصوص برای بیان ژن‌ها تکثیر شد. طبق دستورالعمل کیت، واکنش تکثیری در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد که مشتمل بر ۱۰ میکرولیتر از محلول اصلی (Master Mix)، ۰/۳ میکرولیتر از پرایمر Forward، ۰/۳ میکرولیتر از پرایمر Reverse، دو میکرولیتر از cDNA سنتز شده و ۷/۴ میکرولیتر آب مقطر بود. در ادامه ۲ میکرولیتر از cDNA رقیق‌سازی شده داخل میکروتیوپ‌های مخصوص RT-PCR ریخته شد. سپس ۰/۶ میکرولیتر از مخلوط پرایمر حاوی ۰/۳ میکرولیتر پرایمر Forward و ۰/۳ میکرولیتر پرایمر Reverse به داخل میکروتیوپ اضافه گردید و در نهایت ۱۰ میکرولیتر Syber green master mix و ۷/۴ میکرولیتر آب مقطر به محلول نهایی ریخته شد. پس از اتمام واکنش تکثیر، برای هر واکنش PCR یک نمودار رسم و سپس بر این اساس CT تعیین شد. در پایان قبل از آنالیز داده‌ها، منحنی ذوب (Melting curve) بدست آمده از هر واکنش Real-time PCR بررسی شد تا پیک مربوط به ژن موردنظر و فقدان پرایمر دایمر تایید شود. برای آنالیز داده‌ها ابتدا، ΔCt ژن در هر نمونه از افتراق Ct ژن مربوطه و Ct ژن β-actin به عنوان رفرنس محاسبه شد [۱۲]. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ ارائه شده است.

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها، ابتدا از نرمال بودن توزیع داده‌ها به کمک آزمون شاپیرو- ویلک اطمینان حاصل شد. در ادامه برای مقایسه بین‌گروهی داده‌ها پس از پایان مداخله، از تحلیل واریانس دوطرفه استفاده شد که در صورت معنی‌دارشدن یکی از عامل‌ها و تأثیر تعاملی آنها مقایسه بین‌گروهی داده‌ها با استفاده از تحلیل واریانس تکراهه انجام شد. همچنین در ادامه برای مقایسه دوبه دوی گروه‌ها از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. در تمام آزمون‌ها سطح اطمینان آماری ۹۵ درصد در نظر گرفته شد.

در پژوهش حاضر قوانین و نحوه رفتار با حیوانات بر اساس AAALAC رعایت گردید. به جهت پیروی از اصول اخلاق پژوهش، پروتکل این مطالعه در کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه آزاد واحد تهران مرکز به شماره IR.IAU.TNB.REC.1400.037 به تأیید رسیده است.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر

Gene	Forward/ Reverse	Primer(5 to3)	tm	Product length	Accession Number
کاسپاز ۳	Forward	TTCATGGCCCCAGCATGCGA	61.14	95	XM_007254288.2
	Reverse	CGTTAAGTTTGTCGACCTCA	61.21		
کاسپاز ۹	Forward	TCCGAAGACCAGGGAGGCTC	61.07	176	XM_015478844.1
	Reverse	GCATTCGCAAGGCAGTGGGA	59.28		

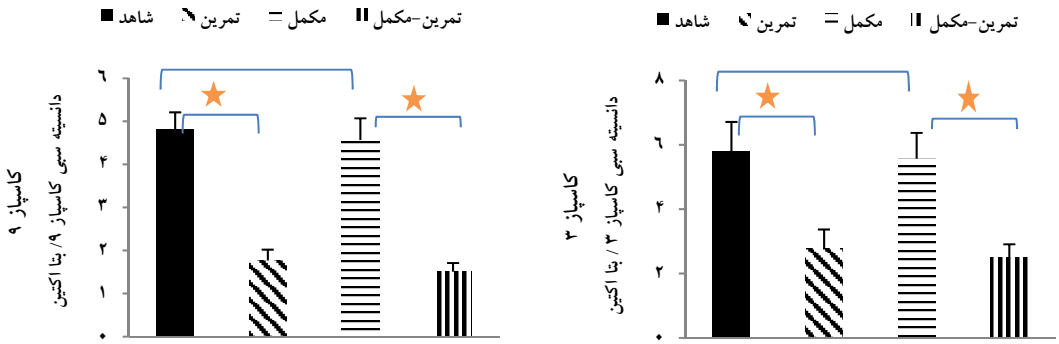
نتایج

تمامی موش‌های صحرایی دوره مداخله را بدون تلفات تکمیل کردند. وزن بدن موش‌ها در انتهای تحقیق در دو گروه تمرین و تمرین+مکمل نسبت به گروه کنترل با کاهش معنی‌داری همراه بود؛ اما نسبت به وزن ابتدای تحقیق در همه گروه‌ها افزایش یافت. مقادیر وزن بدن موش‌های صحرایی در گروه‌های کنترل از ۱۸۳/۹±۲/۳ به ۳۳۷±۱۲/۱ گرم و در گروه‌های تجربی از ۱۹۲/۱۱±۲/۳ به ۳۷۴/۲±۱۸/۳ گرم رسید.

درباره مقدار بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹ کاردیومیوسیت‌ها در سطح رونویسی، اثر عامل‌های وضعیت تمرین و وضعیت تمرین و مصرف مکمل معنی‌دار بود، اما اثر تعاملی معنی‌دار نشد. با این حال، به دلیل نزدیک بودن مقدار آماره‌ها به سطح معنی‌داری، برای اطمینان بیشتر، در ادامه مقایسه بین گروهی داده‌ها با استفاده از تحلیل واریانس تک‌راهه نیز انجام شد که نتایج در جدول ۲ آمده است. نتایج آزمون تحلیل واریانس تکراهه نشان داد که در مقادیر بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹ کاردیومیوسیت‌ها در سطح رونویسی در ۴ گروه پژوهش تفاوت معنی‌داری وجود دارد (P=۰/۰۰۱). نتایج آزمون توکی بیانگر کاهش معنی‌دار بیان ژن کاسپاز ۳ و ۹ در سطح رونویسی در دو گروه تمرین و تمرین+ مکمل نسبت به گروه مکمل و کنترل بود (P=۰/۰۰۱). همچنین تفاوت معنی‌داری بین دو گروه تمرینی وجود نداشت اما میزان بیان ژن‌ها در گروه تمرین+مکمل نسبت به گروه تمرین مزیت داشت. تحلیل واریانس یکراهه برای مقایسه بیان ژن کاسپاز ۳ و ۹ میتوکندریایی کاردیومیوسیت موش‌های نر مدل آنفارکتوس میوکارد در ۴ گروه پژوهش تفاوت معنی‌داری را نشان داد (P=۰/۰۰۱). نتایج آزمون توکی بیانگر کاهش معنی‌دار بیان ژن کاسپاز ۳ و ۹ در دو گروه تمرین و تمرین+ مکمل نسبت به گروه مکمل و کنترل بود (P=۰/۰۰۱). همچنین تفاوت معنی‌داری بین دو گروه تمرینی وجود نداشت اما میزان بیان ژن‌ها در گروه تمرین+مکمل نسبت به گروه تمرین مزیت داشت.

جدول ۲- نتایج آزمون آنالیز واریانس یک طرفه برای بیان ژن‌های برای بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹

	ANOVA	مجموع مجذورات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	P
کاسپاز ۳	درون گروهی	۵/۲۱۴	۳	۱/۱۵۴	۱۴/۲۵۸	❋ ۰/۰۰۱
	بین گروهی	۳/۱۰۵	۳۰	۰/۹۸۵		
	کل	۸/۳۱۹	۳۲	-		
کاسپاز ۹	درون گروهی	۲/۱۲۰	۳	۱/۱۰۲	۱۲/۴۵۸	❋ ۰/۰۰۱
	بین گروهی	۱/۱۰۲	۳۰	۰/۹۲		
	کل	۳/۲۲۲	۳۲	-		



نمودار ۱- میانگین متغیرها در ۴ گروه پژوهش. ❋ نشان دهنده تفاوت معنی‌دار

بین گروه‌های پژوهش در مقادیر بیان ژن‌ها در سطح رونویسی تفاوت معنی‌داری وجود داشت. نتایج بیانگر کاهش معنی‌دار بیان ژن کاسپاز ۳ و ۹ در سطح رونویسی در دو گروه تمرین و تمرین+ مکمل نسبت به گروه مکمل و کنترل بود. میزان بیان ژن‌ها در گروه تمرین+مکمل نسبت به گروه تمرین اندکی بیشتر بود اما تفاوت معنی‌داری بین دو گروه تمرین با و بدون مکمل وجود نداشت. همچنین بین دو گروه مکمل و کنترل نیز تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد، یعنی تمرین تناوبی شدید با و بدون مکمل کورکومین باعث کاهش معنی‌دار در بیان ژن‌های کاسپازی در سطح رونویسی شد.

بحث

پژوهش حاضر نشان داد ۲ ماه تمرین تناوبی با شدت بالا و مصرف کورکومین تأثیر معنی‌داری بر بیان ژن کاسپاز ۳ و کاسپاز ۹ کاردیومیوسیت‌ها به عنوان پروتئین نهایی و اجرایی آپوپتوز دارد. با این حال Heo و همکاران اشاره‌ای به وجود اختلاف بین گروه تمرین و کنترل در بیان و فعالیت کاسپاز ۳ پس از ۸ هفته تمرین روی نوارگردان نداشتند [۲۶]. در تأیید نتایج پژوهش حاضر، Song و همکاران نشان دادند که ۱۲ هفته تمرین تناوبی با شدت نسبی ۷۵ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه موجب کاهش معنی‌دار بیان پروتئین کاسپاز ۳ و ۹ و قطعه قطعه شدن DNA در عضله اسکلتی موش‌های صحرایی سالخورده (۲۴ ماهه) می‌شود [۲۸]. این پژوهشگران اظهار داشتند که کاهش معنی‌دار بیان پروتئین کاسپاز ۳ متعاقب تمرین تناوبی با کاهش عوامل پیش‌آپوپتوزی مانند بیان پروتئین Bax و نسبت بیان پروتئین Bax به Bcl-2 و نیز افزایش معنی‌دار پروتئین ضدآپوپتوزی Bcl-2 همراه بود. این کاهش پتانسیل آپوپتوز میتوکندریایی متعاقب تمرین تناوبی در موش‌های سالخورده احتمالاً با کاهش رهایش عوامل آپوپتوتیک مانند پروتئین c و Apaf-1 در عضله اسکلتی همراه شده و موجب کاهش معنی‌دار بیان کاسپاز ۳ شده است [۲۸]. همچنین، Ho و همکاران اشاره داشتند که بیان پروتئین سیتوکروم c و پروتئین کاسپاز ۳ در گروه تمرین (۱۲ هفته تمرین تناوبی) به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود [۲۹]. به نظر می‌رسد دلیل اصلی تناقض مطالعه حاضر با برخی دیگر از مطالعات، سن موش‌های صحرایی باشد و در این راستا، استرس اکسایشی، سایتوکین‌های التهابی و اختلال در محافظت از استرس سلول، سازوکارهای احتمالی هستند که در افزایش آپوپتوز بافت‌های پیر مشارکت می‌کنند [۸]. به عبارتی، افزایش سن و پیری با افزایش قابل توجه آپوپتوز همراه است که در این صورت احتمال تأثیر تمرینات ورزشی بر شاخص‌های آپوپتوزی مانند بیان ژن یا پروتئین کاسپاز ۳ و ۹ و قطعه قطعه شدن DNA بیشتر و بارزتر می‌شود [۱۸]. همچنین، تفاوت در نوع بافت مورد مطالعه و زمان برداشت بافت نیز می‌تواند بر بیان و بروز متغیرهای درگیر موثر باشد، به طوری که در مطالعه حاضر، بافت عضله نعلی ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین هوازی استخراج شد، ولی Ho و همکاران بلافاصله بعد از آخرین جلسه تمرین بافت قلبی را استخراج کرده بودند. به علاوه، اگرچه در مطالعه حاضر به دلیل برخی محدودیت‌ها امکان ارزیابی شاخص‌های التهابی مانند TNF-α و IL-6 نبود، این احتمال نیز دور از انتظار نیست که افزایش TNF-α و IL-6 پلاسما با فعال کردن مستقیم کاسپاز ۳ از طریق مسیر خارجی میانجی‌گری کرده باشد [۳۰]. چرا که افزایش سطوح TNF-α گردش خون، منجر به افزایش لیگاند متصل شونده به گیرنده TNF-α در سارکولما 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. در کل، کنترل کاسپاز ۳ فرآیند پیچیده‌ای است و چندین مسیر پیام‌رسانی آپوپتوز را درگیر می‌کند و شاید کاهش احتمالی این سایتوکین‌ها متعاقب ۸ هفته تمرین تناوبی و مصرف کورکومین در کاهش مقادیر کاسپاز ۳ و ۹ موثر باشد [۲۰]. علاوه بر این در شرایط استرس، عواملی مثل گلوکوکورتیکوئیدها و سایتوکین‌ها با ایجاد استرس در میتوکندری، موجب تغییراتی در نفوذپذیری آن می‌شوند و سیتوکروم c که در غشای داخلی میتوکندری قرار دارد، به داخل سیتوزول آزاد و به فاکتور ۱ پروتئاز فعال‌کننده آپوپتوزیس (Apaf-1) متصل و ترکیبی به نام dATP تشکیل می‌دهد. سپس این ترکیب، از طریق فعال‌سازی پروکاسپاز ۹، کاسپاز ۹ و کاسپاز ۳ موجب آپوپتوزیس می‌شود [۱۸]. اگرچه مکانیسم‌های دقیق آپوپتوزیس ناشی از فعالیت ورزشی و محدودیت کالری به طور دقیقی مشخص نیست، اما فرضیه‌های احتمالی زیادی وجود دارند که به بررسی‌های بیشتری نیاز دارند. یکی از فرضیه‌های مهم در این زمینه این است که در حین فعالیت ورزشی، متابولیسم عضلانی منجر به تولید ROS می‌شود. کمیت زیاد ROS می‌تواند آسیب اکسیداتیو تولید کرده و بدین گونه منجر به آپوپتوزیس از طریق مسیر داخلی شود [۲۱]. گزارش شده که کاهش معنی‌دار بیان پروتئین کاسپاز ۳ متعاقب تمرین تناوبی با کاهش عوامل پیش‌آپوپتوزی مانند بیان پروتئین Bax و نسبت Bax به Bcl2 و نیز افزایش معنی‌دار پروتئین ضدآپوپتوزی Bcl2 همراه باشد. این کاهش پتانسیل آپوپتوز میتوکندریایی متعاقب تمرین تناوبی در موش‌های سالخورده احتمالاً با کاهش رهایش عوامل آپوپتوتیک مانند سیتوکروم c و Apaf1 در عضله اسکلتی همراه شده و موجب کاهش معنی‌دار بیان کاسپاز ۳ شده است [۲۲]. با توجه به نتایج مطالعه مذکور، به نظر می‌رسد که تمرین تناوبی شدید و مصرف کورکومین موجب کاهش معنی‌دار در مقادیر بیان ژنی پروتئین‌های درگیر در اپوپتوز قلبی در موش‌های نر مدل سکته قلبی شده باشد، اما مهمترین یافته تحقیق حاضر این بود که اگرچه ما پس از ۸ هفته تمرین تناوبی شدید نیز شاهد این کاهش بودیم، با این وجود، میزان تغییرات در گروه تمرین+مکمل نسبت به گروه تمرین، بهبودی بیشتری داشت اما معنی‌دار نبود. این یافته‌ها نشان‌دهنده تاثیر تمرین تناوبی شدید و مصرف کورکومین در محافظت از بروز نقص میتوکندریایی طی سکته قلبی است، اگرچه دلیل اصلی آن هنوز کامل مشخص نیست. به نظر می‌رسد صرف نظر از نوع و شکل تمرین، ۲ ماه تمرین تناوبی و مصرف مکمل کورکومین تاثیر مناسبی بر

سازوکارهای کاسپازی در عضله اسکلتی موش‌های صحرایی جوان داشته باشد. با این حال اظهارنظر قطعی در مورد تأثیر تمرین ورزشی و کورکومین بر شاخص‌های مربوط به آپوپتوز، منوط به انجام مطالعات بیشتری است. به علاوه، در این تحقیق سهم کاسپاز ۸ و ۶ به عنوان مسیرهای ایجاد برهم‌کنش احتمالی بررسی نشده است؛ بنابراین کاهش مقادیر کاسپاز ۳ و ۹ ممکن است که از مسیر بیرونی نیز منشأ گرفته باشد که از محدودیت‌های تحقیق حاضر است.

تشکر و قدردانی

از اساتید دانشگاه آزاد واحد تهران مرکز و جهاد دانشگاهی دانشگاه تبریز که در انجام این مطالعه همکاری داشتند سپاسگزاری می‌گردد.

References:

[1] Alansare A, Alford K, Lee S, Church T, Jung H C. The Effects of High-Intensity Interval Training vs. Moderate-Intensity Continuous Training on Heart Rate Variability in Physically Inactive Adults. ***Int J Environ Res Public Health*** 2018; 15(7): 1508. 2.

[2] Nystoriak M A, Bhatnagar A. Cardiovascular Effects and Benefits of Exercise. ***Front Cardiovasc Med*** 2018; 5: 135.

[3] He Y, Shi M, Wu J, Sun Z, Guo J, Liu Y, et al. Effects of a high-fat diet on intracellular calcium (Ca2+) handling and cardiac remodeling in Wistar rats without hyperlipidemia. ***Ultrastruct Pathol*** 2020; 44(1): 42-51.

[4] Hannan A L, Hing W, Simas V, Climstein M, Coombes J S, Jayasinghe R, et al. Highintensity interval training versus moderate-intensity continuous training within cardiac rehabilitation: a systematic review and meta-analysis. ***J Sports Med*** 2018; 9: 1–17.

[5] Jafari A, Pourrazi H, Nikookheslat S, Baradaran B. Effect of Exercise Training on Bcl-2 and Bax Gene Expression in the Rat Heart. ***GCT*** 2015; 2(4): 1–6.

[6] Behaein B, Abednatanzi H, Gholami M, Ghazalian F. Apoptotic changes of cardiac tissue after HIIT and thyme honey in type 2 diabetic rats. ***JAHSSP*** 2022; 9(2): 23-36. [in Persian]

[7] Andreotti DZ, Silva JdN, Matumoto AM, Orellana AM, De Mello PS, Kawamoto EM. Effects of physical exercise on autophagy and apoptosis in aged brain: Human and animal studies. ***Front Nutr*** 2020; 7: 94.

[8] Sbierski-Kind J, Mai K, Kath J, Jurisch A, Streitz M, Kuchenbecker L, et al. Association between subcutaneous adipose tissue inflammation, insulin resistance, and calorie restriction in obese females. ***J Immunol*** 2020; 205(1): 45-55.

[9] Lee Y, Min K, Talbert EE, Kavazis AN, Smuder AJ, Willis WT, et al. Exercise protects cardiac mitochondria against ischemia reperfusion injury. ***MedSci Sports Exerc*** 2018; 44(3): 397-405.

[10] Kuznetsov AV, Margreiter R. Heterogeneity of mitochondria and mitochondrial function within cells as another level of mitochondrial complexity. ***Int J Mol Sci*** 2019; 10(4): 1911-295.

[11] Aoi W, Naito Y, Mizushima K, Takanami Y, Kawai Y, Ichikawa H, et al. The microRNA miR-696 regulates PGC-1α in mouse skeletal muscle in response to physical activity. ***Am J Physiol Endocrinol Metabol*** 2020; 298(4): E799-806.

[12] Martinez P F, Okoshi K, Zornoff L A, Carvalho R F, Oliveira Junior S A, et al. Chronicheart failureinduced skeletal muscle atrophy, necrosis, and changes in myogenic regulatory factors. ***Med Sci Monit***, 2020; 16(12): BR374-383 .

[13] D'arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. ***Cell Biol Int***, 2019; 43(6): 582 92.

[14] 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. [in Persian]

[15] 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 Univ Med Sci Health Serv*** 2018; 39(6): 35-43. [in Persian]

[16] McMillan EM, Graham DA, Rush JW, Quadrilatero J. Decreased DNA fragmentation and apoptotic signaling in soleus muscle of hypertensive rats following 6 weeks of treadmill training. ***J Appl Physiol***, 2017; 113(7): 1048-57.

[17] 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 Radic Biol Med*** 2018; 44(2): 160-8.

[18] Koçtürk S, Kayatekin BM, Resmi H, Açikgöz O, Kaynak C, Ozer E. The apoptotic response to strenuous exercise of the gastrocnemius and solues muscle fibers in rats. ***Eur J Appl Physiol*** 2017; 102(5): 515-24.

[19] Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: Opposing activities that mediate cell death. ***Nat Rev Mol Cell Biol***, 2018; 9(1): 47-59.

[20] Rastogi RP, Rajeshwar R, Sinha RP. Apoptosis: Molecular mechanisms and pathogenicity. ***EXCLI J*** 2016; 8: 155-88.

[21] Lee SD, Shyu WC, Cheng IS, Kuo CH, Chan YS, Lin YM, et al. Effects of exercise training on cardiac apoptosis in obese rats. ***Nutr Metab Cardiovasc Dis*** 2018; 23(6): 566-73.

[22] Pattele E, Privitera G, Simili V, Wohlgemuth SE, Aulisa L, Pahor M, et al. Multiple pathways to the same end: mechanisms of myonuclear apoptosis in sarcopenia of aging. ***Sci World J*** 2014; 10: 340-9
[23] Hassanpour G, Nikbakht H, Azarbayjani MA, Shakeri N, Natanzi HA. Effect of Interval and Continued Exercises with Crocin on Bax/Bcl2 in Diabetic Obese Rats. ***IJDO*** 2019, 11(3): 19699.
[24] Zarali M, Etemad Z, Azizbeigi K, Karimi P. Effect of 8 Weeks of High Intensity Interval Training (HIIT) With and Without Calorie Restriction on Gene Expression of Caspase-3 and Caspase-9 Proteins in Male Rats. ***J Arak Uni Med Sci*** 2020; 23(3): 300-13.
[25] Rasheva VI, Domingos PM. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. ***Apoptosis***, 2019; 14(8): 996-1007.
[26] Biswas J, Roy S, Mukherjee S, Sinha D, Roy M. Indian spice curcumin may be an effective strategy to combat the genotoxicity of arsenic in Swiss albino mice. ***Asian Pac J Cancer Prev*** 2010; 11(1): 239-47.
[27] Heo JW, Yoo SZ, No MH, Park DH, Kang JH, Kim TW, et al. Exercise training attenuates obesity induced skeletal muscle remodeling and mitochondria mediated apoptosis in the skeletal muscle. ***Int J Environ Res Public Health*** 2018; 15(10): 2301.
[28] Song W, Kwak HB, Lawler JM. Exercise training attenuates age-induced changes in apoptotic signaling in rat skeletal muscle. ***ARS*** 2016; 8(3-4): 517-28.
[29] Ho TJ, Huang CC, Huang CY, Lin WT. Fasudil, a Rho-kinase inhibitor, protects against excessive endurance exercise training-induced cardiac hypertrophy, apoptosis and fibrosis in rats. ***Eur J Appl Physiol*** 2017; 112(8): 2943-55.
[30] Yoo SZ, No MH, Heo JW, Chang E, Park DH, Kang JH, et al. Effects of a single bout of exercise on mitochondria mediated apoptotic signaling in rat cardiac and skeletal muscles. ***J Exerc Rehabil*** 2019; 15(4): 512.