Medical Journal
of
Tabriz University of Medical Sciences and Health Services

Original Article

Effect of 12-week aerobic training on cardiac p53 and AIF gene expression in male rats

Mahdiyeh Ghorbanalizadeh[1], Jabbar Bashiri[1*], Farhad Gholami[2]

[1]Department of Sport Sciences, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz Branch, Tabriz, Iran
[2]Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran
*Corresponding author; E-mail: bashiri.jabbar@gmail.com

Received: 26 June 2018 Accepted: 31 July 2018 First Published online: 18 July 2020
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2020 August - September; 42(3):310-318

Abstract

Background: Apoptosis plays an important role in the development of cardiovascular disease, particularly heart failure. Current evidence suggests that exercise training may alter apoptosis-related signaling in sensitive somatic tissues such as myocardium. The purpose of this study was to investigate the effect of twelve weeks aerobic training on cardiac p53 and AIF gene expression in male rats.

Methods: In this experimental study, 16 three-month-old male rats were randomly assigned into two groups of exercise (n=8; weight: 202.3±18.6) and control (n=8; weight: 251.7±22.6). Exercise group were subjected to an aerobic exercise program at the intensity of 75-80% VO_{2Max} over 12 weeks. 48 hours after the last exercise session, cardiac muscles were extracted to be analyzed for p53 and AIF mRNA expression by Real Time-PCR method. Independent t-test was applied for statistical analysis of the data and significance level was set at $P<0.05$.

Results: The p53 gene expression in the exercise group was significantly higher than the control group (70%, $P<0.05$). Furthermore, AIF gene expression was significantly higher in the exercise group than the control (17.54%, $P<0.05$).

Conclusion: It seems that 12 weeks endurance training was effective in increasing cardiac mitochondrial apoptotic protein. However, more researches are needed to identify effects of exercise trainings on indices of myocardial apoptosis.

Keyword: Endurance training**,** Apoptosis**,** Myocardial, Apoptosis Inducing Factor (AIF), p53

How to cite this article: Ghorbanalizadeh M, Bashiri J, Gholami F. [Effect of 12-week aerobic training on cardiac p53 and AIF gene expression in male rats]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2020 August-September; 42(3):310-318. Persian.

© 2020 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 بیان ژن‌های p53 و AIF عضله قلبی در موش‌های صحرایی نر

مهدیه قربانعلی‌زاده[۱]، جبار بشیری[۱*]، فرهاد غلامی[۲]

[۱]گروه علوم ورزشی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
[۲]گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران
[*]نویسنده مسوول؛ ایمیل: bashiri.jabbar@gmail.com

دریافت: ۱۳۹۷/۴/۵ پذیرش: ۱۳۹۷/۵/۹ انتشار برخط: ۱۳۹۹/۴/۲۸
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تبریز. مرداد و شهریور ۱۳۹۹؛ ۴۲(۳): ۳۱۰-۳۱۸

چکیده

زمینه: آپوپتوز نقش مهمی در ایجاد بیماری‌های قلبی عروقی به ویژه ناتوانی قلبی بازی می‌کند. شواهد اخیر حاکی است که تمرینات ورزشی ممکن است فرآیندهای پیام‌رسانی مربوط به آپوپتوز را در بافت‌های سوماتیک حساس مانند میوکارد تغییر دهد. مطالعه حاضر جهت بررسی تأثیر دوازده هفته تمرین استقامتی بر بیان ژن‌های p53 و (Apoptosis Inducing Factor, AIF) عضله قلبی موش‌های صحرایی نر انجام شد.

روش‌کار: در این مطالعه تجربی، ۱۶ سر موش صحرایی نر سه ماهه به طور تصادفی در دو گروه تمرین (۸ سر، وزن: ۱۸/۶±۲۰۲/۳) و کنترل (۸ سر، وزن: ۲۲/۶±۲۵۱/۷) جایگزین شدند. گروه تجربی یک برنامه تمرین هوازی با شدت ۸۰-۷۵٪ اکسیژن مصرفی بیشینه را به مدت ۱۲ هفته انجام دادند. ۴۸ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، عضله قلبی گروه مورد بررسی، استخراج و بیان ژن‌های p53 و AIF با استفاده از روش Real time PCR بررسی گردید. آزمون آماری تی مستقل برای آنالیز داده‌ها در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد بیان ژن p53 عضله قلبی در گروه تجربی به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود (۷۰٪، P<۰/۰۵). همچنین، بیان ژن AIF در عضله قلبی گروه تجربی به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود (۱۷/۵۴٪، P<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که دوازده هفته تمرین استقامتی در افزایش پروتئین‌های کلیدی مسیر میتوکندریایی آپوپتوز قلبی تأثیر قابل توجهی دارد. با این حال، اظهار نظر قطعی در مورد نحوه تأثیرپذیری شاخص‌های مربوط به آپوپتوز میوکارد از تمرینات ورزشی، منوط به انجام تحقیقات و مطالعات بیشتر در این زمینه می‌باشد.

کلید واژه‌ها: تمرین استقامتی، آپوپتوز، عضله قلبی، ژن عامل القاء کننده آپوپتوز(AIF)، ژن مهارکننده تومور (P53).

نحوه استناد به این مقاله: قربانعلی‌زاده م، بشیری ج، غلامی ف. تأثیر دوازده هفته تمرین هوازی بر بیان ژن‌های p53 و AIF عضله قلبی در موش‌های صحرایی نر. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تبریز. ۱۳۹۹؛ ۴۲(۳): ۳۱۰-۳۱۸

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

بیماری‌های قلبی–عروقی به‌عنوان مهم‌ترین عامل مرگ و میر در جهان امروزی مطرح است. شواهد اخیر حاکی است که از دست دادن سلول‌های قلبی در ناتوانی قلبی نقش دارد و آپوپتوز در بیماری‌های قلبی–عروقی نقش کلیدی ایفا می‌کند. آپوپتوز سلول‌های قلبی در بیماری‌های متعددی از جمله آترواسکلروزیس، ایسکمی قلبی، کاردیومیوپاتی دیابتی و ناتوانی قلبی مزمن مشاهده شده است (۱). آپوپتوز در عضله قلبی توسط عوامل متعددی از جمله تولید سایتوکاین‌ها، افزایش فشار اکسایشی و آسیب DNA فعال می‌شود. آپوپتوز، مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی است و مهار این فرآیند در شرایط متعددی اثر محافظتی بر سلول‌های قلبی دارد (۱). مهارکننده‌ها یا سرکوب‌گرهای تومور از مهمترین پروتئین‌های سلولی برای کنترل هوموستاز و نیز تعداد و رفتار سلول‌ها در اغلب بافت‌های موجود زنده به شمار می‌روند. این سرکوب‌گرها معمولاً از طریق تنظیم یک یا چند فرآیند کنترل کننده‌ی زایش و تکثیر نابه‌جای سلولی، عمل می‌کنند. در این بین، ژن مهارکننده تومور یا p53 یکی از مهم‌ترین سرکوب‌گرهای تومور به شمار می‌رود که در پاسخ به عوامل مختلفی از استرس سلولی مانند آسیب DNA، هایپوکسی شدید، پیری سلولی و فشارهای اکسایشی بالا افزایش یافته و فعال می‌شود (۲). در این راستا برخی از شواهد حاکی است که پروتئین p53 از طریق فعال‌سازی فرآیند مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده یا آپوپتوز باعث ممانعت از تکثیر سلولی نابجا و مرگ سلول می‌شود. برخی از مطالعات نشان داده‌اند که افزایش بیان و فعالیت ژن p53 با افزایش بیان پروتئین‌های پیش‌آپوپتوزی مانند پروتئین Bax و کاهش بیان پروتئین‌های ضدآپوپتوزی مانند پروتئین Bcl-2 همراه است (۴–۲). در این بین، پروتئین Bax با کاهش پایداری غشای بیرونی میتوکندری می‌تواند منتج به رهایش مولکول‌های پروآپوپتوتیک مانند عامل القاء کننده آپوپتوز (AIF, Apoptosis Inducing Factor) و سیتوکروم c از فضای بین دو غشای میتوکندری به داخل سیتوپلاسم شود. عامل القاء کننده آپوپتوز یا AIF در حالت طبیعی نقش ضداکسایشی در داخل میتوکندری به عهده دارد (۵). با این حال، این نکته اشاره شده است که AIF آزاد شده از میتوکندری در طی روند آپوپتوز، سبب آسیب به DNA هسته‌ای در مسیری مستقل از کاسپاز می‌شود (۶، ۷). جستجوی راهکارهای مناسب برای حمایت از قلب در مقابل مرگ سلولی شدید و نا به جا و آسیب‌های احتمالی مرتبط با آن موضوع بسیاری از تحقیقات اخیر بوده است. در سال‌های اخیر، تأثیر پروتکل‌های تمرینی مختلف بر فرآیند در تحقیقات متعددی بررسی شده است (۶، ۸، ۹). تحقیقات انسانی و حیوانی نشان داده‌اند که وهله‌های تکراری تمرین استقامتی تأثیر محافظتی بر قلب دارد. بااین‌حال، مکانیسم‌های سلولی آن کاملا مشخص نیست و نتایج متناقضی در این زمینه ارائه شده است (۱۰). در این زمینه، Kavazis و همکاران بیان کردند که تمرین ورزشی استقامتی به صورت دویدن بر روی نوارگردان باعث افزایش معنی‌دار بیان سیتوکروم c قلبی و تغییر غیرمعنی‌دار بیان AIF شد (۱۰). همچنین، Vainshtein و همکاران اشاره داشتند که ۱۰ هفته تمرین روی چرخ گردان موجب کاهش بیان پروتئین سیتوکروم c، پروتئین AIF و قطعه قطعه شدن DNA در عضله قلبی موش‌های صحرایی نر تمرین کرده در مقایسه با گروه کنترل شد (۱۱). در مقابل، برخی از پژوهش‌ها اشاره به افزایش بیان پروتئین‌های p53 و AIF متعاقب تمرینات ورزشی دارند به طوری که Kim و همکاران گزارش کردند که شش ماه تمرین هوازی موجب افزایش قابل توجه پروتئین p53 میتوکندریایی و پیوند بین پروتئین p53 و DNA میتوکندری شد (۱۲). لذا، بررسی پیشینه تحقیق نشانگر برخی از تناقضات در زمینه تاثیر فعالیت ورزشی منظم بر فرایند آپوپتوز و فاکتورهای موثر بر آن می‌باشد. با توجه به اهمیت ورزش در سلامتی قلبی، تحقیقات متعددی به بررسی اثر برنامه‌های ورزشی مختلف بر عوامل فیزیولوژیک و نیز عوامل سلولی–مولکولی تاثیرگذار بر بافت قلب پرداخته‌اند اما در بیشتر تحقیقات انجام شده برنامه‌های تمرین استقامتی با شدت سبک و متوسط اعمال شده است. امروزه تمرینات ورزشی با شدت بالا مورد توجه محققان ورزشی قرار گرفته است و نتایج مثبتی از تحقیقات در این زمینه گزارش شده است. علاوه بر این، این نوع برنامه‌های ورزشی با توجه به کاهش زمان مورد نیاز برای تمرین، مورد رغبت عمومی نیز قرار گرفته است. با این‌حال، تاثیرات سلولی مولکولی این نوع پروتکل‌های ورزشی هنوز به طور کامل بررسی نشده است. لذا، در تحقیق حاضر اثر دوازده هفته تمرین هوازی با شدت بالا بر بیان برخی از ژن‌های مهم تأثیرگذار در فرایند آپوپتوز شامل p53 و AIF عضله قلبی در موش‌های صحرایی نر بررسی شد.

روش کار

تحقیق حاضر از نوع مطالعات تجربی بود. در این مطالعه ۱۶ موش صحرایی نر دو ماهه از نژاد ویستار ۱۴۸۴۸ از مرکز انستیتو پاستور ایران خریداری گردید. جهت آشناسازی با محیط آزمایشگاه، نمونه‌ها به مدت دو هفته تحت شرایط جدید نگهداری شدند. دمای محل نگهداری حیوانات در دامنه ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت محیط ۵±۵۰ درصد حفظ شده و چرخه‌ی روشنایی–تاریکی ۱۲:۱۲ ساعته کنترل شد. غذای مخصوص حیوانات از کارخانه خوراک دام به‌پرور تهیه شد و

نمونه‌ها به صورت آزادانه از غذای استاندارد و آب در طول دوره پژوهش استفاده کردند. لازم به ذکر است که نگهداری حیوانات آزمایشگاهی مطابق با راهنمای انستیتوی ملی سلامت انجام شد و تمامی اعمال انجام شده روی حیوانات، مطابق دستورالعمل کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی مستخرج از دستورالعمل هلسینکی بود. در طی دوره دو هفته‌ای آشناسازی، نمونه‌ها طی برنامه‌ای با نحوه‌ی فعالیت روی نوارگردان نیز آشنا شدند. 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 تجربی (۸ سر، وزن: ۱۸/۶±۲۰۲/۳) و کنترل (۸ سر، وزن: ۲۲/۶±۲۵۱/۷) تقسیم شدند. برنامه تمرینی شامل دویدن بر روی نوارگردان الکترونیکی هوشمند حیوانی با تکرار ۵ روز در هفته (یکشنبه، دوشنبه، سه‌شنبه، پنج‌شنبه و جمعه) و به مدت ۱۲ هفته بود. شدت نسبی کار در سرتاسر برنامه تمرین در دامنه ۸۰-۷۵ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه (۳۳-۲۴ متر/دقیقه با شیب ۱۵٪) حفظ شد. مدت زمان تمرین از ۱۰ دقیقه در روز در هفته اول شروع و به ۶۰ دقیقه در روز در هفته پنجم رسیده و تا انتهای دوره حفظ شد (جدول ۱) (۱۳).

پس از اتمام دوره و ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، موش‌های صحرایی گروه‌های تجربی و کنترل تحت جراحی قرار گرفتند. موش‌ها ابتدا توسط تزریق درون صفاقی کتامین و زایلازین بی‌هوش شدند (۱۴). سپس توسط متخصصین کارآزموده جراحی، تشریح انجام شده و بافت قلبی آن‌ها استخراج و در مایع فیزیولوژیک قرار داده شد. پس از تخلیه خون قلب و وزن‌کشی آن، بلافاصله دهلیزها از بطن جدا شده و بخشی از بافت بطن چپ در کرایوتیوب در نیتروژن مایع قرار داده شده و برای بررسی‌های بعدی در دمای ۷۰- درجه نگهداری شد. برای استخراج RNA از نمونه‌ها، طبق روش پیشنهادی کیت (Thermo,K0731, USA) حدود ۵۰ میلی‌گرم از بافت عضله قلبی با استفاده از یک میلی‌لیتر بافر لیزکننده، هموژنه شده و در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه انکوبه گردید. پس از اضافه کردن ۰/۲ میلی‌لیتر کلروفروم به هر میکروتیوب و تکان دادن آن با دست به مدت ۱۵ ثانیه، میکروتیوب ۵ دقیقه در دمای 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، قسمت بالایی که حاوی RNA بود، جدا شده و به میکروتیوب دیگری انتقال داده شد. به محلول جدا شده حجم مساوی از ایزوپروپانول سرد اضافه گردید و برای ۱۰دقیقه در دمای ۲۰- درجه انکوبه شد. سپس، میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه و ۱۳۷۰۰g سانتریفیوژ شده، مایع رویی بیرون ریخته شد و یک میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد به میکروتیوب اضافه گردید. بلافاصله میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه در شرایط ۴ درجه و ۱۳۷۰۰g سانتریفیوژ شده، مایع رویی آن بیرون ریخته شد و به دقت اتانول خالی شد و حدود ۲۰ دقیقه اجازه داده شد تا الکل تبخیر گردد و پس از آن 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) تعیین گردید. همچنین، RNA تام به وسیله الکتروفورز روی ژل آگاروز حاوی اتیدیوم بروماید قرار گرفت و دو باند مشخص ۱۸s و ۲۸s مربوط به RNA ریبوزومی مشاهده و کنترل شد. RNA استخراج شده جهت استفاده در مراحل بعدی در دمای ۸۰- درجه نگهداری شد. جهت ساخت cDNA، طبق دستورالعمل کیت (Fermentas, Canada) Revert AID^{TM} Firs Standard cDNA synthesis یک میکرولیتر RNA و یک میکرولیتر از DNase I reaction buffer 10X در یک تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شده وتوسط DEPC-traeted water به حجم ۹ میکرولیتر رسید. برای از بین بردن آلودگی احتمالی با DNA، یک میکرولیتر DNase به تیوب اضافه شد و پس از افزودن یک میلی‌لیتر از اتانول مطلق، تیوب مربوطه به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر ۷۰- درجه قرار گرفت. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط ۴ درجه و ۱۴۰۰۰g سانتریفیوژ شد و پس از آن، در زیر هود به دقت اتانول آن خالی شده و حدود ۱۰ دقیقه اجازه داده شد تا الکل تبخیر گردد. به تیوب یک میکرولیتر DEPC-treated water و یک میکرولیتر پرایمر (oligi dt) یا پرایمر Random hexamer افزوده شد و ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه بر روی Dry block انکوبه گردید. چهار 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 سانتریفیوژ مختصر، به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه گردید. یک میکرولیتر آنزیم RverertAid^{TM} H Minus M-MuLV Reverse به تیوب قبل افزوده شد. در ادامه در صورت استفاده از پرایمر (oligo dt)، ۶ دقیقه در ۴۲ درجه و در صورت استفاده از پرایمر Random hexamer، ابتدا ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه و به دنبال آن ۹۰ دقیقه در دمای 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. Real-time PCR اندازه‌گیری میزان بیان ژنی پروتئین‌های p53 و AIF با استفاده از دستگاه Corbett-Rotor gene-6000(Corbett Research Australia) انجام گردید. جفت پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از نرم‌افزار Primer 3

طراحی و توسط بایونیر (Bioneer-Germany) سنتز شد و با غلظت نهایی ۸۰nm مورد استفاده قرار گرفت. 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. در جدول ۲ توالی پرایمرهای بیان ژنی برای موش‌های صحرایی مشخص شده است. به عنوان بلانک (کنترل منفی) از تیوبی که حاوی همه مواد موجود در واکنش به جز cDNA بود، استفاده شد و به جای cDNA، به تیوب مربوطه DEPC water اضافه گردید. پس از اتمام واکنش تکثیر، برای هر واکنشPCR یک نمودار رسم و سپس بر این اساس C_T 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 مورد نظر و فقدان پرایمر دایمر تایید شود. برای آنالیز داده‌ها ابتدا، ΔCt ژن در هر نمونه از افتراق Ct ژن مربوطه و Ct ژن GAPDH به عنوان رفرنس محاسبه شد. فرمول‌ها برای محاسبه به ترتیب زیر می‌باشد:

$\Delta C_T = C_T \text{ target} - C_T \text{ reference}$

$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ test sample} - \Delta C_T \text{ control sample}$

داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ تحلیل شدند. نحوه توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو–ویلک بررسی شد. با توجه به نرمال بودن توزیع داده‌ها، از آزمون پارامتریک تی مستقل جهت مقایسه گروه‌ها استفاده شد. تمامی محاسبات آماری در سطح معنی‌داری $P<۰/۰۵$ انجام شد.

یافته‌ها

میانگین و انحراف استاندارد شاخص‌های وزن بدن، وزن قلب و نسبت آن‌ها در جدول ۳ ارائه شده است. همچنین تفاوت بیان p53 و AIF در دو گروه در شکل ۱ مشاهده می‌شود. در رابطه با تأثیر تمرین روی نوارگردان بر ویژگی‌های بدنی تفاوت معنی‌داری بین توده بدنی گروه کنترل (۲۲/۶±۲۵۱/۷۵) و گروه تجربی (۱۸/۳±۲۰۲/۳۳) مشاهده شد (P=۰/۰۳)، به طوری‌که توده بدن گروه تجربی ۱۹٪ کمتر از گروه کنترل بود که بیانگر کاهش معنی‌دار وزن بدن به دنبال برنامه تمرین استقامتی است. همچنین، تفاوت معنی‌داری در نسبت وزن قلب به توده بدن گروه کنترل و تمرین مشاهده گردید (P=۰/۰۱۳) به طوری که نسبت وزن قلب به توده بدن گروه تجربی ۳۳٪ از گروه کنترل بیشتر بود. با این حال، تفاوت معنی‌داری در وزن قلب گروه‌های تجربی و کنترل مشاهده نگردید (P<۰/۰۵) (جدول ۳). در خصوص شاخص‌های مربوط به آپوپتوز عضله قلبی، نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل و تجربی در بیان ژن‌های p53 و AIF وجود دارد (P=۰/۰۱). در این راستا، میزان بیان هر دو ژن p53 و AIF در گروه تجربی به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود (ژن p53: ۷۰٪ و ژن AIF: ۱۷/۵۴٪). به عبارتی دوازده هفته تمرین استقامتی با شدت بالا روی نوارگردان موجب افزایش قابل توجه هر دوی ژن‌های مربوط به آپوپتوز میتوکندریایی عضله قلبی موش‌های صحرایی شد (شکل ۱).

جدول ۱: برنامه ۱۲ هفته تمرین استقامتی

مدت تمرین و شرایط نوارگردان	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

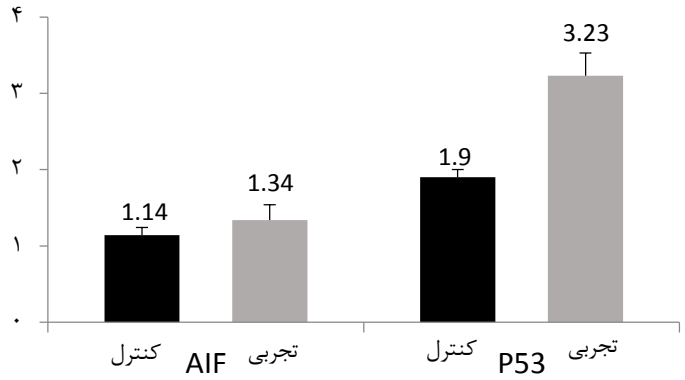
جدول ۲: توالی پرایمرهای بیان ژنی عضله نعلی موش‌های صحرایی

genes	Primer sequence Product	length (bp)
p53	F: 5' TTTTCACCCCACCCTTCCCC 3' R: 5' CCTCAGACACACAGGTGGCA 3'	101
AIF	F:5' TCCTCTACCCTCTATGCCAGGA 3' R: 5' AGCTGGGAACCATCATGTGC 3'	162
GAPDH	F: 5' GGAAAGCCTGCCGGTGACTA 3' R:5' CACCCGGAGGAGAAATCGGG 3'	110

جدول ۳: مشخصات موش‌های صحرایی در دو گروه کنترل و تجربی

مشخصات موش‌های صحرایی	کنترل	تجربی
وزن بدن (گرم)*	۲۲/۶±۲۵۱/۷۵	۱۸/۳±۲۰۲/۳۳
وزن قلب (گرم)	۰/۰۹±۰/۷۵	۰/۰۸±۰/۸۱
وزن قلب/وزن بدن(گرم/کیلوگرم)*	۰/۴۵±۳/۱	۰/۳۴±۴

*P<۰/۰۵



شکل ۱: میزان بیان ژن p53 و AIF در دو گروه کنترل و تجربی

بحث

در پژوهش حاضر تاثیر ۱۲ هفته تمرین استقامتی با شدت بالا بر بیان ژن‌های p53 و AIF عضله قلبی و نیز وزن بدن و قلب در موش‌های صحرایی نر بررسی شد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد تمرین هوازی با شدت بالا موجب کاهش ۱۹/۶ درصدی وزن بدن موش‌های صحرایی شد. تمرین استقامتی با وجود کاهش معنی‌دار وزن بدن، موجب افزایش غیرمعنی‌دار وزن قلب و افزایش معنی‌دار نسبت وزن قلب به وزن بدن شد. به عبارتی، اگرچه ۱۲ هفته تمرین استقامتی روی نوارگردان موجب کاهش وزن بدن شد، اما این برنامه تمرین موجب افزایش ناچیز وزن قلب و افزایش قابل توجه نسبت وزن قلب به وزن بدن در موش‌های صحرایی گردید. موضوع کاهش وزن، با توجه به افزایش هزینه انرژی در گروه تجربی نسبت به گروه کنترل، آن هم برای مدت ۱۲ هفته چندان دور از انتظار نبود چنانکه در اغلب مطالعات قبلی نیز به کاهش وزن ناشی از تمرینات استقامتی طولانی مدت اشاره شده است (۱۵، ۱۶). همچنین، افزایش ناچیز وزن قلب و افزایش معنی‌دار نسبت وزن قلب به وزن بدن نیز می تواند نشانه‌ای بر اثر گذاری تمرینات استقامتی بر ساختار و حتی عملکرد دستگاه قلبی باشد. اغلب شواهد و مدارک اشاره دارند که تمرینات استقامتی و پویا شامل انجام فعالیت‌های مکرر موجب افزایش قطر و حجم عضلات بطن می‌شود. افزایش اندازه و ابعاد بطن چپ پس از گذشت کمتر از یک هفته تمرین استقامتی نیز گزارش شده است؛ در حالی که توده عضله قلب واکنش کندتری نشان می‌دهد. سرعت افزایش اندازه‌های قلب در ابتدا به دلیل افزایش سریع پلاسما و خون است. ورزشکاران رشته‌های استقامتی که اغلب در تمرینات طولانی مدت همراه با حرکات دینامیکی و ایزوتونیکی شرکت می‌کنند، بر اثر پیش‌بار حجمی ناشی از برونده بالا، افزایش اندازه حفره بطن چپ را تجربه می‌کنند (۱۹-۱۷). از لحاظ نظری، تغییرات همودینامیکی و بارهای اعمال شده بر بطن در طی تمرین، در درازمدت می‌تواند منجر به افزایش اندازه و ابعاد بطن و هایپرتروفی بطن شود. بازگشت وریدی بیشتر در رشته‌های استقامتی منجر به افزایش اندازه حفرات بطنی و افزایش ناچیز در ضخامت دیواره قلب می‌شود. این محرک‌های تمرینی باعث افزایش بارز حجم پایان دیاستولی می‌شوند که در اثر آن حجم ضربه‌ای نیز تا حد زیادی افزایش می‌یابد. البته افزایشی که در حجم پایان دیاستولی با تمرینات استقامتی مشاهده می‌شود، با افزایش حجم پلاسما در این افراد ورزیده رابطه دارد (۱۹). بنابراین، تغییرات ساختاری قلبی با برنامه تمرینی حاضر دور از انتظار نبود. از مهم‌ترین یافته‌های تحقیق حاضر تغییر در بیان ژن پروتئین‌های p53 و AIF متعاقب تمرین استقامتی با شدت بالا بود. نتایج حاکی از آن بود که میزان بیان ژن p53 در انتهای دوره در گروه تجربی به طور معنی‌داری و حدود ۷۰٪ بیشتر از گروه کنترل بود. همچنین، میزان بیان ژن AIF در گروه تجربی به طور معنی‌داری و حدود ۱۷/۵۴٪ بیشتر از گروه کنترل بود. به عبارتی، ۱۲ هفته تمرین استقامتی روی نوارگردان با شدت نسبی ۸۰-۷۵ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه موجب افزایش قابل توجه بیان هر دو ژن درگیر در آپوپتوز میتوکندریایی عضله قلبی موش‌های صحرایی شد. این یافته با نتایج پژوهش Kim و همکاران و Kavazis و همکاران همسو است. Kim و همکاران گزارش کردند شش ماه تمرین هوازی موجب افزایش قابل توجه پروتئین p53 میتوکندریایی و پیوند بین پروتئین p53 و DNA میتوکندری در زنان میانسال غیرفعال شد (۱۲). همچنین، Kavazis و همکاران در تحقیقی تأثیر تمرین استقامتی روی تریدمیل را بر بیان برخی پروتئین‌های آپوپتوزی قلبی در موش‌ها بررسی کرده و گزارش کردند که بیان AIF میتوکندریایی تحت سارکولما افزایش یافت اما این تغییر از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (۱۰). ژن مهارکننده تومور یا p53 در پاسخ به عوامل مختلفی از استرس سلولی مانند

هایپوکسی شدید، پیری سلولی و فشارهای اکسایشی بالا افزایش یافته و فعال می‌شود (۲). در این خصوص، Vainshtein و همکاران اشاره داشتند که آپوپتوز میتوکندریایی اغلب با افزایش گونه‌های فعال اکسیژن همراه است (۱۱). این احتمال وجود دارد که در پاسخ به فشار اکسایشی و آسیب DNA، p53 برای مجموعه‌ای از پروتئین‌های پیش آپوپتوزی از خانواده Bcl-2 (مانند پروتئین Bcl2-associated X protein, BAX) به عنوان عامل رونویسی عمل کند که موجب افزایش بیان این پروتئین‌ها و در نهایت القای نفوذپذیری میتوکندریایی و آزاد شدن سیتوکروم‌C و عامل AIF می‌شود (۴-۲). ممکن است قرارداد تمرینی استفاده شده در این تحقیق، که نسبت به تحقیقات دیگر از شدت بالایی برخوردار بود، با ایجاد وضعیت کاهش دسترسی به اکسیژن و افزایش فشار اکسایشی موجبات افزایش بیان p53 و متعاقباً AIF را فراهم کرده باشد. لذا، بر اساس اظهار نظر Kavazis و همکاران ممکن است این تغییرات به دنبال تمرین استقامتی با شدت بالا بخشی از ملزومات زمینه‌ساز برای تغییرات و سازگاری‌های ساختاری در میتوکندری عضلات قلبی باشد. بااین‌حال، با توجه به اینکه در اکثر تحقیقات انجام شده در این زمینه نتایج مغایر با تحقیق حاضر گزارش شده است، اظهار نظر قطعی در این زمینه منوط به انجام مطالعات آتی است. از سوی دیگر، بر خلاف نتایج مطالعه حاضر، Werner و همکاران بیان کردند که ۲۱ روز دویدن اختیاری باعث کاهش بیان P53 در عضله قلبی موش‌ها شد (۲۰). Qi و همکاران نیز گزارش کردند که تمرین دویدن باعث کاهش بیان P53 در عضله قلبی موش‌ها شد (۲۱). همچنین، Vainshtein و همکاران اشاره داشتند که ۱۰ هفته تمرین روی چرخ گردان موجب کاهش بیان پروتئین AIF و قطعه قطعه شدن DNA در عضله قلبی موش‌های صحرایی نر تمرین کرده در مقایسه با موش‌های صحرایی تمرین نکرده شد که مغایر با نتایج این تحقیق است (۱۱). به نظر می‌رسد یکی از دلایل تناقض مطالعه حاضر با تحقیقات پیشین تفاوت در پروتکل‌های تمرینی باشد. در مطالعه Qi و همکاران شدت نسبی تمرین ۶۵ درصد حداکثر ظرفیت موش‌ها بود. علاوه‌براین، در مطالعه Vainshtein و همکاران آزمودنی‌ها تمرین روی چرخ گردان را به شکل داوطلبانه و با شدت تمرینی پائین انجام داده بودند. در مقابل، در تحقیق حاضر شدت در محدوده ۸۰-۷۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی بود. این احتمال وجود دارد که تمرینات استقامتی شدیدتر و طولانی‌تر، پیام‌رسانی آپوپتوزی عضله قلبی را افزایش دهد. همانطور که Kavazis و همکاران بیان کردند، القاء استرس اکسایشی فرایند آپوپتوز را فعال و تسریع می‌کند (۱۰). شدت تمرین یک متغیر مهم و تاثیرگذار در فعال‌سازی فرایند آپوپتوز است که هر چه شدت تمرین بیشتر باشید در نتیجه تولید گونه‌های واکنشی و فشار اکسایشی افزایش می‌یابد. این محققین بیان کردند که به دنبال تمرینات ورزشی تغییرات فنوتیپی در میتوکندری قلبی رخ می‌دهد. این تغییرات فنوتیپی در اثر تغییر در محتوی و بیان فاکتورهای آپوپتوز به دنبال ورزش، محرکی است که میتوکندری‌ها را در برابر آپوپتوز مقاوم‌تر می‌کند (۱۰). لذا به نظر می‌رسد که تمرینات استقامتی با بهبود ظرفیت آنتی اکسیدانی و کاهش استرس اکسایشی تغییراتی در بیان و سنتز فاکتورهای آپوپتوزی فراهم کند. با این‌حال، تغییرات فاکتورهای آپوپتوزی بررسی شده در این تحقیق خلاف انتظار بود. با توجه به شدت بالای تمرینات اعمال شده در تحقیق حاضر، این امکان وجود دارد که فاصله زمانی بین تشریح و آخرین جلسه تمرین برای حذف اثر حاد فعالیت ورزشی نیز در کسب این نتایج دخیل باشد؛ چراکه تحقیقات نشان می‌دهند فعالیت ورزشی حاد باعث بروز فشار اکسایشی و تضعیف سیستم ضداکایشی می‌شود و می‌تواند باعث تنظیم مثبت فاکتورهای موثر در فرایند آپوپتوز گردد (۲۳). همان‌طور که پیش‌تر ذکر شد، یکی از عوامل مهم در فعال‌سازی و تنظیم مثبت بیان P53، بروز فشار اکسایشی است. با این حال، با توجه به محدودیت‌های پژوهش حاضر مانند عدم اندازه‌گیری محتوی پروتئین‌های موردنظر توسط روش وسترن بلات و اکتفا به بررسی بیان ژن شاخص‌های مورد نظر، عدم اندازه‌گیری تغییرات مورفولوژیکی، عدم ارزیابی بیان سایر پروتئین‌های درگیر در مسیر میتوکندریایی آپوپتوز و عدم بررسی بیان پروتئین‌های درگیر در مسیر خارجی آپوپتوز اظهار نظر قطعی در مورد نحوه تأثیرپذیری شاخص‌های مربوط به آپوپتوز عضله قلبی از تمرینات ورزشی مختلف، منوط به انجام تحقیقات و مطالعات بیشتر در این زمینه است.

نتیجه‌گیری

به طورکلی، براساس نتایج مطالعه حاضر می‌توان عنوان کرد که تمرینات استقامتی طولانی مدت و با شدت بالای متوسط، با وجود تأثیرات عملکردی مثبت همچون کاهش وزن بدن و افزایش نسبت وزن قلب به بدن، احتمالاً می‌تواند موجب افزایش بیان برخی ژن‌های درگیر در مسیر میتوکندریایی آپوپتوز مانند p53 و AIF و نهایتاً تنظیم مثبت فاکتورهای موثر در آپوپتوز گردد. افزایش این شاخص‌ها به دنبال پروتکل ورزشی مذکور ممکن است محرکی برای ایجاد تغییرات فنوتیپ در میتوکندری بافت قلبی باشد. با این حال، با توجه به اینکه در تحقیقات پیشین تأثیر تمرینات با شدت بالاتر از متوسط کمتر مورد بررسی قرار گرفته است و بیشتر تحقیقات با شدت‌های سبک و متوسط صورت گرفته و نتایج

مغایری گزارش شده است، اظهار نظر قطعی در این زمینه منوط به انجام تحقیقات و مطالعات بیشتر می‌باشد.

قدردانی

مقاله حاضر مستخرج از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد فیزیولوژی ورزشی می‌باشد. لذا از مساعدت و همکاری صمیمانه مسئولین و تمام افرادی که موجب تسهیل اجرای پایان‌نامه شدند، تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

ملاحظات اخلاقی

این پژوهش برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد در گرایش فیزیولوژی ورزشی با کد ۱۰۲۲۱۴۳۵۹۴۱۰۰۵ است.

منابع مالی

منابع مالی ندارد.

منافع متقابل

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

مشارکت مولفان

م،ق؛ ج،ب؛ ف،غ؛ طراحی، اجرا و تحلیل نتایج مطالعه را بر عهده داشته‌اند و همچنین مقاله توسط ج،ب و ف،غ؛ تالیف شده و سایر افراد نیز نسخه نهایی را خوانده و پس از اصلاح ایرادات احتمالی، تایید کرده اند.

References

1. Lee Y, Gustafsson A B. Role of apoptosis in cardiovascular disease. *Apoptosis* 2009; **14**(4): 536-548. doi: 10.1007/s10495-008-0302-x
2. Speidel D. Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death. *Trends Cell Biol* 2010; **20**(1): 14-24. doi: 10.1016/j.tcb.2009.10.002
3. Moll U M, Zaika A. Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of p53. *FEBS Lett* 2001; **493**: 65-69. doi: 10.1016/s0014-5793(01)02284-0
4. Fridman J S, Lowe S W. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 2003; **22**(56): 9030-9040. doi: 10.1038 /sj.onc.1207116
5. Chipuk J E, Green D R. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol* 2008; **18**(4): 157-164. doi: 10.1016/j.tcb.2008.01.007
6. Kwak H B. Effects of aging and exercise training on apoptosis in the heart. *J of Exer Rehabi* 2013; **9**(2): 212-219. doi: 10.12965/jer.130002
7. Cerella C, Grandjenette C, Dicato M, Diederich M. Roles of Apoptosis and Cellular Senescence in Cancer and Aging. *Curr Drug Targets* 2016; **17**(4): 405-415. doi: 10.2174/1389450116666150202155915
8. Santana E T, Serra A J, Silva Junior J A. Aerobic exercise training induces an anti-apoptotic milieu in myocardial tissue. *Motriz* 2014; 20(2): 233-238. doi: 10.1590/s1980-65742014000200015
9. Ko I G, Kim S E, Kim C J, Jee Y S. Treadmill Exercise Alleviates Aging-induced Apoptosis in Rat Cardiac Myocytes. *Inter J of Geron* 2013; **7**(3): 152-157. doi: 10.1016/j.ijge.2013.01.001
10. Kavazis A N, McClung J M, Hood D A, Powers S K. Exercise induces a cardiac mitochondrial phenotype that resists apoptotic stimuli. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; **294**(2): H928-935. doi: 10.1152/ ajpheart.01231.2007
11. Vainshtein A, Kazak L, Hood D A. Effects of endurance training on apoptotic susceptibility in striated muscle. *J Appl Physio* 2011; **110**(6): 1638-1645. doi: 10.1152/japplphysiol.00020.2011
12. Kim B, Hart P, Kang M, Roth S, Brown M. Functional Study of Tumor Suppressor p53 Gene Variation: Effect on Cardiovascular Adaptation to Exercise Training. *FASEB* 2012; **26**(1): 1138-1135. doi: 10.1096/fasebj.26.1_supplement.1138.5
13. Natio H, Powers S K, Demirel H A, Aoki J. Exercise training increases heat shock protein in skeletal muscles of old rats. *Med Sci Sports Exerc* 2001; **33**(5): 729-734. doi: 10.1097/00005768-200105000-00008
14. Adhihetty P J, Taivassalo T, Haller R G, Walkinshaw D R, Hood D A. The effect of training on the expression of mitochondrial biogenesis-and apoptosis-related proteins in skeletal muscle of patients with mtDNA defects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; **293**(3): E672-E680. doi: 10.1152/ajpendo.00043. 2007
15. Lee S D, Shyu W C, Cheng I S, Kuo C H, Chan Y S, Lin Y M, et al. Effects of exercise training on cardiac apoptosis in obese rats. *Nutr Metab Cardiovasc Dise* 2013; **23**(6): 566-573. doi: 10.1249/01.mss.0000 321859.17304.2f
16. Peterson J M, Bryner R W, Sindler A, Frisbee J C, Alway S E. Mitochondrial apoptotic signaling is elevated in cardiac but not skeletal muscle in the obese Zucker rat and is reduced with aerobic exercise. *J Appl Physiol* 2008; **105**(6): 1934-1943. doi: 10.1152/japplphysiol.00037.2008
17. George K P, Gates P E, Birch K M, Campbell I G. Left ventricular morphology and function in endurance-trained female athletes. *J Sports Sci* 1999; **17**(8): 633-642. doi: 10.1080/026404199365669
18. Fagard R, Aubert A, Staessen J, Eynde E V, Amery A. Cardiac structure and function in cyclists and runners:

Comparative echocardiographic study. *Br Heart J* 1984; **52**(2): 124-129. doi: 10.1136/hrt.52.2.124

19. D'Andea A, Caso P, Scarasfile R, Salerno G, De Corato G, Mita C, et al. Biventricular myocardial adaptation to different training protocols in competitive master athletes. *Int J Cardiol* 2007; **115**(3): 342-349. doi: 10.1016/j.ijcard.2006.03.041
20. Werner C, Hanhoun M, Widmann T, Kazakov A, Semenov A, Pöss J, et al. Effects of physical exercise on myocardial telomere-regulating proteins, survival pathways, and apoptosis. *J Am Coll Cardiol* 2008; **52**(6): 470-482. doi: 10.1016/j.jacc.2008.04.034
21. 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
22. Qi Z, He J, Zhang Y, Shao Y, Ding S. Exercise training attenuates oxidative stress and decreases p53 protein content in skeletal muscle of type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Free Radical Biology & Medicine* 2011; **50**(7): 794-800. doi: 10.1016/j.freeradbiomed. 2010.12.022
23. Fisher-Wellman K, Bloomer R J. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dyn Med* 2009; **8**: 1. doi: 10.1186/1476-5918-8-1