©2020 ASP Ins., Afarand Scholarly Publishing Institute, Iran

ISSN: 2322-2166: Journal of Islamic Life Style Centeredon Health, 2020:4(1):304-310

The Effect of High Intensity Interval Training with Caloric Restriction on Rat Myocardial Apoptosis Markers

ARTICLE INFO

Article Type
Research Article

Authors
Mohammad Mazhari[1]
Hasan Matin Homaee [2*]
Hoseyn Fatolahi [3]

How to cite this article
Mohammad Mazhari, Hasan Matin Homaee, Hoseyn Fatolahi, The Effect of High Intensity Interval Training with Caloric Restriction on Rat Myocardial Apoptosis Markers, *Journal of Islamic Life Style Centered on Health*. 2020;4(1):304-310.

1. Department of Sports Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. Department of Sports Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran (Corresponding Author).

3. Department of Physical Education, Pardis Branch, Islamic Azad University, Pardis, Iran.

** Correspondence:*
Address:
Phone:
Email: hasanmatinhomaee@gmail.com

Article History
Received: 2020/03/24
Accepted: 2020/06/10

ABSTRACT

Purpose: The purpose of this study was the effect of high intensity interval training with caloric restriction on rat myocardial apoptosis markers

Materials and Methods: 27 male rats were randomly divided into three groups: control, caloric restriction and caloric restriction with high-intensity interval training. During the study, the control group had free access to water and food, but the amount of food in the two groups was limited to 50% of the control group. The restriction and exercise group was exposed to intense interval training for eight weeks. Relative expression of caspase 3 and 9 Gen was obtained by real-time PCR. Data were analyzed by one-way ANOVA and Tukey's post hoc test.

Finding: The mean weight of rats in both groups of caloric restriction decreased significantly during the study (p=0.001). One-way analysis of variance showed a significant difference between the means of the three groups in the expression of caspase protein 3 and 9 in the heart muscle of male rats (p=0.001). The results of post hoc test showed a significant decrease in caspase 3 and 9 cardiac muscle expression in male rats in both groups of caloric restriction compared to the control group. Also, no significant difference was observed between the two groups of limitations (p = 0.102).

Conclusion: Dietary restriction seems to be associated with a reduction in fat mass as well as muscle mass, so combining intermittent exercise with food restriction may be effective in slowing the process of skeletal muscle protein synthesis.

Keywords: Apoptosis, Gene Expression, Caspase 3 and 9

[Downloaded from islamiclifej.com on 2024-01-26]

اثرتمرین تناوبی شدید با محدودیت کالریک بر بیان ژن نشانگران آپوپتوز میوکارد

محمد مظهری[۱]
گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

حسن متین همایی[۲*]
گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (نویسنده مسئول).

حسین فتح اللهی[۳]
گروه تربیت بدنی، واحد پردیس، دانشگاه آزاد اسلامی، پردیس، ایران.

چکیده

هدف: هدف از پژوهش حاضر بررسی اثرتمرین تناوبی شدید با محدودیت کالریک بر بیان ژن نشانگران آپوپتوز میوکارد موش‌های صحرایی نر بود.

مواد و روش ها: ۲۷ سر موش صحرایی نر به صورت تصادفی به سه گروه کنترل، محدودیت کالریک و محدودیت کالریک با تمرین تناوبی با شدت بالا تقسیم شدند. در طی پژوهش گروه کنترل به صورت ازادانه به آب و غذا دسترسی داشتند اما میزان غذای دو گروه محدودیت غذایی تا ۵۰ درصد گروه کنترل محدود شد. گروه تمرین به مدت هشت هفته تحت تاثیر تمرینات تناوبی شدید قرار گرفتند. بیان نسبی ژن کاسپاز ۳ و ۹ با استفاده از روش Real-time PCRبه دست آمد. داده ها با استفاد از آزمون آماری تحلیل واریانس یکطرفه و آزمون تعقیبی توکی‌آنالیز شدند.

یافته ها: میانگین وزن رتها در هر دو گروه محدودیت کالریک، در طول مراحل پژوهش به طور پیوسته کاهش یافت ($p=۰/۰۰۱$) .تحلیل واریانس یکراهه تفاوت معنی دار بین میانگین سه گروه در بیان ژن کاسپاز ۳ و ۹ عضله قلبی موش‌های نر صحرایی را نشان داد ($p=۰/۰۰۱$) .نتایج آزمون تعقیبی بیانگر کاهش معنی دار بیان ژن کاسپاز ۳ و ۹ عضله قلبی موش‌های نر صحرایی در هر دو گروه محدودیت کالریک به نسبت گروه کنترل بود ($p=۰/۰۰۱$) .همچنین تفاوت معنی داری بین دو گروه محدودیت مشاهده نشد ($p=۰/۱۰۲$) .

نتیجه گیری: به نظر می‌رسد محدودیت غذایی با کاهش توده چربی و همچنین توده عضلانی همراه است، لذا ترکیب تمرین تناوبی همراه با محدودیت مواد غذایی احتمالا در کند شدن روند سنتز پروتئین های عضلات اسکلتی موثر باشد .

واژگان کلیدی: آپوپتوز، بیان ژن، کاسپاز ۳ و ۹.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۰۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۳/۲۱
***نویسنده مسئول**: hasanmatinhomaee@gmail.com

مقدمه

حفظ و برقراری وزن مناسب، عامل تعیین کننده مهم بقا و ادامه حیات بوده و در دهه گذشته موضوع اشتها، دریافت غذا ، تعادل و همئوستاز انرژی[۱] همواره از مباحث اصلی و مورد علاقه پژوهشگران در حوزه علوم مختلف بوده است (۱). رژیم‌های غذایی نامناسب و کاهش میزان فعالیت بدنی به طور اختصاصی با بیماری‌های قلبی- عروقی ارتباط دارند (۲). شواهد نشان از آن دارند که چاقی و رژیم غذایی نامناسب، موجب افزایش گونه‌های فعال اکسیژن[۲] و کاهش فعالیت آنتی اکسیدان‌ها شده و اثرات سوئی بر سلامت انسان دارند (۳). با کاهش فعالیت آنتی اکسیدانها، مکانیسم‌های آپوپتوزی منجر به ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی می‌شوند (۴). آپوپتوز[۳] یا مرگ سلولی برنامه ریزی شده یک فرآیند ژنتیکی است که بخش جدایی‌ناپذیر از رشد و توسعه موجود زنده بوده که برای حذف سلول‌های زائد با روشی هدفمند به کار می‌رود و نقش مهمی در هومئوستاز بافت طبیعی و عوامل پیدایش بیماری-ها بازی می‌کند (۵). این پدیده در شرایط طبیعی سلول‌های پیر، آسیب دیده، اضافی و مضر را حذف میکند و برای تکامل و ترمیم بافت ضروری است ولیکن هرگونه اختلال در روند آپوپتوز به کاهش یا افزایش نامتعارف مرگ سلولی و در نهایت بیماری‌های مختلف منجر می‌شود (۶). پیام‌های آپوپتوزی به طور عمده توسط دو مسیر کنترل میشوند. مسیر داخلی شامل پیام رسانی و متعاقب آن آزادسازی عوامل آپوپتوزی مانند سیتوکروم **C** از میتوکندری میباشد (۷). سیتوکروم **C** به عنوان یکی از مهمترین عوامل آپوپتوزی که در فضای بین غشایی میتوکندری قرار دارد، با افزایش نفوذپذیری غشای خارجی میتوکندری به داخل سیتوزول رها میشود و موجب راه اندازی واکنش های کاسپازی در مسیر داخلی میشود که رهایش عوامل آپوپتوزی از میتوکندری به سیتوزل، موجب فعال سازی پروکاسپاز ۹ و سپس کاسپاز ۹ به عنوان آغازگر آپوپتوز در مسیر میتوکندریایی وارد عمل میشود (۸) و این روند نهایتا موجب فعالسازی کاسپاز ۳ بعنوان کاسپاز اجرایی و فصل مشترک همه مسیرهای آپوپتوزی میگردد. کاسپازها پس از فعال شدن، بسیاری از پروتئینهای حیاتی سلولی را هیدرولیز و تجزیه میکنند و باعث ورود به مرحله غیر قابل برگشت مرگ میشوند (۹). کاسپاز ۳ یکی از مهم‌ترین پروتئازهای اجراکننده در مسیر شناخته‌شده آپوپتوز است و تا زمانی که به وسیله کاسپازهای آغازگر به وسیله پروتئولیز فعال نشود، به صورت خاموش باقی میماند. کاسپاز ۳ فعال‌شده، مهارکننده DNase فعال‌کننده کاسپاز را می‌شکند و به مرگ سلولی منجر میشود (۱۰).

از سوی دیگر فعالیت‌های ورزشی و به ویژه تمریات تناوبی با شدت بالا اثر معنی‌داری بر کاهش وزن، کاهش کالری دریافتی، بهبود ردوکس سلولی و افزایش بیوژنز میتوکندریایی دارند (۱۱). لذا تاثیر فعالیتهای ورزشی بر آپوپتوز مورد علاقه ی محققان حوزه ی ورزش قرار گرفته است (۱۱،۱۲،۱۳) برخی از محققین معتقدند که بروز فشار در حین فعالیت‌های ورزشی نسبتاً سنگین و شدید ممکن است با افزایش عوامل پیش‌آپوپتوزی یا کاهش پروتئین‌های ضدآپوپتوزی، باعث تشدید این فرایند و پیامدهای بعدی آن شود (۱۲). هرچند نتایج برخی از مطالعات به نقش محافظتی تمرینات بدنی اشاره دارد. این تناقضات ممکن است عمدتاً ناشی از شدت، مدت و نوع تمرینات بدنی یا وضعیت سلامت و آمادگی آزمودنی‌های مورد مطالعه باشد (۱۳). تبریزی و همکاران (۱۳۹۸) نشان دادند دوازده 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 (۱۳۹۸) در پژوهش خود به این نتیجه

[1] - Energy homeostasis
[2] - Active oxygen species
[3] - Apoptosis

[Downloaded from islamiclifej.com on 2024-01-26]

رسیدند که دوازده هفته تمرین هوازی باعث کاهش غیرمعنی‌دار پروتئین کاسپاز ۳ در موش‌های صحرایی می‌شود (۱۵). همچنین مک میلان[4] و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که شش هفته تمرین استقامتی موجب کاهش قطعه قطعه شدن DNA، رهایش سیتوکروم c و پروتئین Bax میشود (۱۶). باید به این نکته توجه نمود فعالیت ورزشی سبب ایجاد تغییر در هم ایستایی محیط داخلی بدن میشود که به معنی ایجاد چالش حفظ بقا در شرایط پرتنش برای سلولها است (۱۷). بنابراین استفاده از برنامه های تمرینی کوتاه مدت با شدت بالا، که بتواند سازگاریهای عملکردی مطلوب را در کوتاهترین زمان ممکن به وجود آورد از اهمیت بسیاری برخوردار است. در این راستا، به نظر میرسد استفاده از تمرینات تناوبی شدید در مدت زمان کوتاه تری موجب دستیابی به آثار مفید مشابهی در مقایسه با سایر اشکال تمرینی به ویژه تمرینات هوازی و تداومی شود (۱۸). همچنین، بکارگیری محدودیت کالری بیشتر از ۲۵ درصد به ویژه محدودیت کالری متناوب از دیگر روش‌های کاهش وزن است که رواج بسیاری هم در بین ورزشکاران رشته های وزنی و هم بین افراد عادی دارد. با این حال، این روش دارای معایبی مانند کاهش توده عضلانی، ناراحتی ذهنی ناشی از گرسنگی، عدم بهبود عملکردهای جسمانی و عملکردی است (۱۹). بدین منظور، برخی محققان پیشنهاد کرده اند که افزودن تمرینات ورزشی به برنامه محدودیت کالری باعث افزایش فواید ناشی از هر یک از این دو روش و دستیابی به فواید مشابه همراه با استفاده میزان کمتری از محدودیت کالری میشود (۲۰). با این وجود مطالعات بسیار اندکی در مورد تاثیر محدودیت غذایی با یا بدون تمرینات ورزشی بر مسیرهای آپوپتوزی و به ویژه بر بیان ژن پروتئین های کاسپاز ۳ و ۹ میوکارد موش‌های صحرایی نر وجود دارد و تاثیر واقعی محدودیت غذایی و تمرین تناوبی شدید بر این مسیرمهم پیامرسان سلولی به طور کامل مشخص نیست. در این راستا لی[5] و همکاران در سال ۲۰۱۲ عنوان داشتند که متعاقب محدودیت کالریک ۲۵ درصدی شاهد افزایش بتاکاتنین و ترمیم سطوح پیامرسانی wnt در موشهای پیر بوده اند (۲۱). اما بر خلاف نتایج مطالعات مذکور پتل[6] و همکاران (۲۰۱۴) اشاره داشتند که محدودیت غذایی طولانی مدت می تواند موجب افزایش فعالیت پروتئازی در عضله اسکلتی موشها شود (۲۲). با توجه به محدودیت های غذایی طولانی مدت و غالبا شدیدی که بیشتر افراد با یا بدون تمرین ورزشی برای کاهش وزن یا پیشگیری از چاقی مورد استفاده قرار می دهند و با توجه به نقش حساس و کلیدی میوکارد در سلامتی و عملکردجسمانی، این موضوع یکی از نگرانی ها و چالش های جدی است که می تواند ذهن پژوهشگران و حتی اغلب افراد جامعه را به خود جلب کند. به علاوه هنوز فرایندهای مولکولی پروتئین‌های درگیر در مسیرهای مختلف منجر به هایپرتروفی یا آتروفی عضلانی متعاقب محدودیت‌های غذایی به طور دقیق و کامل مشخص نشده اند. علاوه بر این با توجه به اثر مثبت فعالیت بدنی به نظر میآید درک فرایندهای سلولی و مولکولی متأثر از ورزش بتواند به استفاده از فعالیت بدنی و محدودیت کالریک به عنوان یک درمان هدفمند و بدون عوارض در آینده منجر شود. لذا هدف از تحقیق حاضر بررسی تأثیر تمرین تناوبی شدید با محدودیت کالریک بر بیان ژن پروتئین های کاسپاز ۳ و ۹ میوکارد موش‌های صحرایی نر بود.

مواد و روش ها

مطالعه تجربی حاضر بر روی ۲۷ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار ۸ هفته ای که از مؤسسه پاستور ایران خریداری شده بود انجام شد. جهت جلوگیری از فشار و تغییر شرایط فیزیولوژیک، موشها به مدت دو هفته در حیوانخانه مرکزی آزمایشگاه، تحت شرایط جدید قرار گرفتند. در طی این دوره تمامی آزمودنی ها دسترسی آزادانه ای به غذای استاندار حیوانی داشتند. ترکیب غذا نیز تقریبا شامل ۵۵ درصد کربوهیدرات، ۲۵ درصد پروتئین، ۵ درصد چربی، ۷درصد فیبر ۱۳ درصد رطوبت و خاکستر بود. در پژوهش حاضر کلیه قوانین و نحوه رفتار با حیوانات (آشناسازی، تمرین، بیهوشی و کشتن حیوان بر اساس AAALAC رعایت گردید. در ابتدا ۹ سر از موشها به عنوان گروه پایه از بقیه جدا شده و باقی آن ها در مرحله آشنا سازی به مدت ۲ هفته و ۵ جلسه به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰-۸ متر در دقیقه بر روی نوار گردان به فعالیت پرداختند. در پایان این دوره، موشها پس از مطابقت وزنی به طور تصادفی به دو گروه محدودیت غذایی و محدودیت غذایی+ تمرین تناوبی جایگزین شدند (۲۳).

پروتکل HIIT مورد استفاده، برنامه تمرینی تعدیل‌شده توسط سانگستاد[7] و همکاران (۲۰۱۵) بود که به مدت ۸ هفته و ۵ جلسه در هفته بر روی نوارگردان اجرا شد. پروتکل HIIT شامل اجرای ۱۰ وهله فعالیت ۴ دقیقه ای با شدت ۹۰-۸۵ درصد VO2max و با دوره‌های استراحتی فعال ۲ دقیقه‌ای بود که به صورت پیش رونده تا هفته ششم، سرعت نوارگردان افزایش یافت و دو 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 دو هفته پایانی این سرعت حفظ شد. همچنین، دوره های 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 غیر مستقیم با استفاده از نوارگردان برآورد شد. بر این اساس، بعد از ۱۰ دقیقه گرم کردن ، آزمون دویدن رت ها 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 VO2max بدست آمد به عنوان سرعت ماکزیمم تعریف شد (۲۴). در پروتکل محدودیت غذایی پژوهش نیز آزمودنی های گروه کنترل دسترسی آزادانه ای به غذای استاندارد و آب داشتند. در طول دوره به جهت تعیین میزان غذای مصرفی گروه های محدودیت غذایی و محدودیت غذایی-تمرین، میزان دقیق غذای مصرفی گروه کنترل به صورت روزانه اندازه گیری و ثبت شد که میانگین غذای مصرفی این آزمودنی ها حدود ۲±۲۴ گرم در روز بود. بدین ترتیب دو گروه محدودیت غذایی ۵۰ درصد مقادیر مصرفی گروه کنترل را دریافت میکردند که حدودا ۱±۱۲گرم در روز بود و به صورت دو وعده ای و طی دوره ۱۲ ساعته تاریکی به موش های دارای محدودیت غذایی داده می شد (۲۵).

جراحی حیوانات آزمایشگاهی و استخراج نمونه

در این تحقیق سعی بر آن بود تا حیوانات مورد مطالعه در کمترین زمان ممکن و با حداقل درد و آزار کشته شوند. تمامی موش‌های صحرایی، ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، توسط تزریق درون‌صفاقی کتامین (۹۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) بیهوش، جراحی انجام و موشهای صحرایی تشریح شدند و در ادامه پس از شکافتن و کنار زدن بافت های سطحی، بافت قلب خارج شد. برای این منظور پس از تخلیه خون قلب و وزن‌کشی آن، بلافاصله دهلیزها از بطن جدا شده و بخشی از بافت بطن چپ آزمودنی‌ها در کرایوتویوب در نیتروژن مایع قرار گرفت. استخراج نمونه های بافتی از طریق هموژن کردن در بافر لیز با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بافت در یک میلی لیتر بافر انجام شد. نمونه های هموژن به مدت

[4] - McMilan
[5] - Li
[6] - Pattel
[7] - Sangstad

[Downloaded from islamiclifej.com on 2024-01-26]

۴۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ روی یخ سانتریفوژ شدند. سپس بخش سطحی سانتریفیوژ جمع آوری شد و تا زمان تحلیل در دمای ۸۰ – درجه نگهداری شد. بافت عضله قلبی نمونه برداری شده پس از شستشو در سرم فیزیولوژیک در میکروتیوبهای ۱/۸ حاوی مایع RNAlaterTM با نسبت ۲۰ درصد غوطه ور گردیده و جهت انجام آزمایش‌های ژنتیک به آزمایشگاه انتقال داده شد. اندازه گیری بیان ژن‌های بافت عضله قلبی به وسیله تکنیک Real-time PCR سنجش و پس از کمی سازی مقادیر بیان ژن با استفاده از فرمول $ct\Delta\Delta$ تجزیه و تحلیل شد. واکنش PCR با استفاده از master mix (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 شماره ۱ ارائه شده است. برای سنجش کمی بیان ژن‌های مورد نظر از کیت (SYBR-green Real Time RT-PCR, TAKARA) (ژاپن) استفاده و غلظت‌های ۱/۲۰، ۱/۱۰ و ۱/۵۰ میکرولیتر از cDNA تهیه شد. غلظت ۱/۲۰ به عنوان الگو برای Real-time PCR استفاده شد. cDNA با پرایمرهای مخصوص برای ژن‌های کاسپاز ۳ و کاسپاز ۹ 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 سنتزشده و ۷/۴ میکرولیتر آب مقطر بود. در ادامه دو میکرولیتر از cDNA رقیق سازی 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. سپس میکروتیوپ به مدت ۳۰ ثانیه بر روی دستگاه Shacker کاملا تکان داده و میکروتیوپ به مدت ۳۰ ثانیه میکروفیوژ گردید و داخل دستگاه RT-PCR قرار گرفت. الگوی دمایی PCR برای ژن‌های مربوطه به صورت ۹۵ درجه به مدت ۱۰ دقیقه برای سیکل اول بود که با ۴۵ سیکل به صورت دو مرحله‌ای ۹۵ درجه به مدت ۲۰ ثانیه و ۶۰ درجه به مدت ۶۰ ثانیه ادامه یافت. با استفاده از رنگ SYBR Green، میزان آمپلی فیکاسیون (Amplification) در هر چرخه دنبال شد. در چرخه‌ای که واکنش تکثیر، وارد مرحله لگاریتمی می‌شود و تحت عنوان CT (Threshold cycle) گفته می‌شود، میزان افزایش محصولات اندازه‌گیری می‌شود. 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 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 β-actin به عنوان رفرنس محاسبه شد (۱۲). داده های جمع آوری شده با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون های آماری شاپیرو ویلک و آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند.

جدول۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر

نام ژن	پرایمرها	توالی	طول
Caspase3	Forward	CCAAGGCACCCAGCATGCGA	92bp
	Reverse	GGGCAGGTTTGTCGACCTCA	92bp
Caspase9	Forward	ATCCAAGACCAGGGCACAGC	94bp
	Reverse	CACAGTCCAAGGCAGTGGGA	92bp

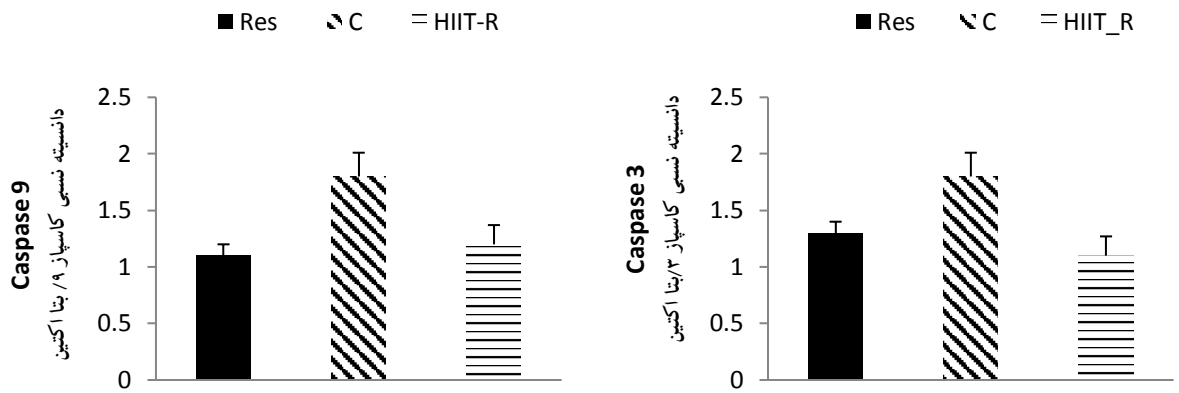
یافته ها

توزیع داده‌ها در همه متغیرها طبیعی بود. تفاوتی بین رتها در ابتدای پژوهش وجود نداشت و برخی ویژگی‌های آنها در جدول شماره ۲ ارائه شده است. میانگین وزن رتها در هر دو گروه محدودیت کالریک، در طول مراحل پژوهش به طور پیوسته کاهش یافت. تفاوت معنی داری بین گروه کنترل و دو گروه محدودیت در مورد وزن نهایی و وزن عضله قلبی مشاهده شد (p=۰/۰۰۱). تحلیل واریانس یکراهه برای مقایسه بیان پروتئین کاسپاز ۳ و ۹ عضله قلبی موش‌های نر صحرایی در سه گروه تمرین تناوبی، تمرین-محدودیت و کنترل تفاوت معنی دار بین سه میانگین گروه را نشان داد (p=۰/۰۰۱). نتایج آزمون تعقیبی بیانگر کاهش معنی دار بیان ژن کاسپاز ۳ و ۹ عضله قلبی موش‌های نر صحرایی در گروه های محدودیت به نسبت گروه کنترل بود (p=۰/۰۰۱). همچنین تفاوت معنی داری بین دو گروه محدودیت مشاهده نشد (p=۰/۱۰۲).

جدول۲. ویژگیهای موش‌های نر صحرایی در گروه های پژوهش

	کنترل	محدودیت غذایی	تمرین-محدودیت
وزن ابتدایی پژوهش	۳۱۳/۲۵±۲۰/۳	۳۱۷/۷۸±۲۲/۳	۳۲۱/۶۵±۲۳/۶
وزن انتهایی پژوهش	۳۷۸/۱۳±۲۳/۵	۲۴۱/۲۵±۱۸/۷	۲۲۹/۶۸±۱۷/۵
وزن عضله قلبی (گرم)	۰/۹۹±۰/۰۶	۰/۷۱±۰/۰۵	۰/۷۵±۰/۰۸
دریافت غذا (گرم/روز)	۲۴/۲۲	۱۲/۱	۱۲/۱

[Downloaded from islamiclifej.com on 2024-01-26]



شکل ۱. میانگین کاسپاز ۳ و ۹ در گروه های پژوهش.

پس از ۸ هفته تمرین تناوبی و محدودیت کالریک کاسپاز ۳ و ۹ در گروه محدودیت (Res) و گروه محدودیت-تمرین تناوبی (HIIT-R) به نسبت گروه کنترل کاهش معنی داری داشت. اما بین دو گروه محدودیت تفاوت معنی داری مشاهده نشد.

نتیجه گیری

پژوهش حاضر نشان داد که دو ماه محدودیت غذایی با و بدون فعالیت ورزشی موجب کاهش معنی دار وزن بدن موشهای صحرایی شده است. در این راستا وزن بدن موشهای گروه های محدودیت و محدودیت-تمرین به ترتیب ۳۵ و ۳۳ درصد کمتر از گروه کنترل بود که با توجه به محدودیت دریافت مواد غذایی در هر دو گروه قابل پیش بینی بود چنانکه در تمام مطالعات قبلی هم مشاهده شده بود. کربنه[8] و همکاران (۲۰۱۷) اعلام کردند که همراه با محدودیت کالریک و تعادل منفی انرژی، پروتئولیز کل بدن و اکسیداسیون اسیدهای آمینه افزایش پیدا میکند که می تواند موجب کاهش سنتز تارهای عضلانی گردد (۲۶). در همین زمینه وینهیمر[9] و همکاران (۲۰۱۸) اعلام نمودند که ترکیب تمرین ورزشی و محدودیت کالریک سبب کاهش آتروفی عضلات اسکلتی میگردد (۲۷) هر چند که بدون بررسی ترکیب بدن و تغییرات بافت چربی و بدون چربی، بحث در مورد کاهش توده عضلانی در موشهای صحرایی دشوار و جزء محدودیتهای تحقیق حاضر به شمار می رود.

همچنین بر اساس یافته های مطالعه حاضر، دو ماه محدودیت کالریک با و بدون فعالیت ورزشی موجب کاهش معنی دار بیان ژن کاسپاز- ۳ و کاسپاز- ۹ شده است. در تأیید نتایج پژوهش حاضر، سانگ[10] و همکاران (۲۰۱۶) 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 می‌شود (۲۸). این پژوهشگران عنوان داشتند که کاهش قابل توجه 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 پروتئینc و Apaf-1[11] در عضله اسکلتی همراه شده و موجب کاهش معنی‌دار بیان کاسپاز-۳ شده است (۲۸). همچنین، هو[12] و همکاران (۲۰۱۷) اشاره داشتند که بیان پروتئین سیتوکرومc و پروتئین کاسپاز-۳ در گروه 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 می تواند بر بیان و بروز متغیرهای درگیر موثر باشد، به طوری که در مطالعه حاضر، بافت عضله قلبی ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین استخراج شد، ولی هو و همکاران (۲۰۱۷) 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 (۱۹). 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 (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).

برخی از مطالعات نیز اشاره دارند که محدودیت غذایی و تمرینات ورزشی می‌تواند موجب تحریک و افزایش بیان پروتئین‌های درگیر در بیوژنز میتوکندریایی گردد. در این راستا کیو[13] و همکاران (۲۰۱۳) افزایش SOD2و SIRT3 را با اعمال ۳۰ درصد محدودیت دریافت کالری مشاهده نمودند (۳۰). اگرچه مکانیسم‌های دقیق آپوپتوزیس ناشی از فعالیت ورزشی و محدودیت کالریک 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 افزایش می‌یابد و با کاهش توده چربی در پاسخ به محدود سازی دریافت غذا، منجر به تولید ROS می‌شود. کمیت زیادROS می‌تواند آسیب اکسیداتیو تولید کرده و بدین گونه منجر به آپوپتوزیس از طریق مسیر

[8] - Carbone
[9] - Weinheimer
[10] Song
[11] Apoptotic protease activating factor-1
[12] Ho
[13] - Qiu

[Downloaded from islamiclifej.com on 2024-01-26]

داخلی شود (۲۱). گزارش شده است که کاهش قابل توجه بیان پروتئین کاسپاز سه متعاقب تمرین تناوبی با کاهش عوامل پیش‌آپوپتوزی مانند بیان پروتئین Bax و نسبت Bax به Bcl2 و نیز افزایش معنی‌دار پروتئین ضدآپوپتوزی Bcl2 همراه بود. 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 سه شده است (۲۲).

با توجه به نتایج مطالعه مذکور، به نظر می‌رسد که محدودیت غذایی به مدت هشت هفته با وجود فوائد مثبت در کاهش توده چربی، احتمالا موجب آنروفی عضلانی از طریق کاهش بتا-کانتین و افزایش گلیکوژن سنتاز کیناز ۳ بتا نیز می شود که نهایتا منجر به توقف سنتز پروتئین و هایپرتروفی عضلانی می شود لذا ترکیب تمرین تناوبی همراه با محدودیت ملایم تر مواد غذایی احتمالا در کند شدن روند سنتز پروتئین های عضلات اسکلتی موثر باشد. لذا به نظر می‌رسد که در گذر از نوع و شکل تمرین، دو ماه تمرین تناوبی و محدودت دریافت مواد غذایی تاثیر مناسبی بر سازوکارهای کاسپازی در عضله اسکلتی موش‌های صحرایی جوان داشته باشد. با این حال اظهار نظر قطعی در مورد تأثیر تمرین ورزشی و محدودیت دریافت مواد غذایی بر شاخص‌های مربوط به آپوپتوز، منوط به انجام مطالعات بیشتری است. به علاوه، در این تحقیق سهم کاسپاز هشت و شش و 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.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از اساتید دانشگاه آزاد واحد تهران مرکز که در انجام این مطالعه کمال همکاری را داشته اند 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. Arisi MF, Chirico EN, Sebeny R, Muthukumaran G, Mu A, De Jonghe BC, et al. Myocardial apoptosis and mesenchymal stem cells with acute exercise. Physiol Rep. 2017; 5(11): 13297.

4. Hannan A L, Hing W, Simas V, Climstein M, Coombes J S, Jayasinghe R, Furness J. 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. Gene, Cell Tissue. 2015; 2(4): 1–6.

6. Huang C-Y, Lin Y-Y, Hsu C-C, Cheng S-M, Shyu W-C, Ting H, et al. Antiapoptotic effect of exercise training on ovariectomized rat hearts. J Appl Physiol. 2016; 121(2): 457–65.

7. Santana ET, Serra AJ, Silva Junior JA, Bocalini DS, Barauna VG, Krieger JE, et al. Aerobic exercise training induces an anti-apoptotic milieu in myocardial tissue. Mot Rev educ Fis. 2014; 20(2): 233–238.

8. 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.

9. Phaneuf S, Leeuwenburgh C. Apoptosis and exercise. Med Sci Sports Exerc. 2014; 33(3):393-6.

10. 5.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. J Appl Physiol. 2014; 105(6):1934-43.

11. Zhong N, Chen H, Zhao Q, Wang H, Yu X, Eaves AM, et al. Effects of griseofulvin on apoptosis through caspase-3- and caspase-9-dependent pathways in K562 leukemia cells: An in vitro study. Curr Ther Res Clin Exp. 2010; 71(16):384-97.

12. Rodríguez-Berriguete G, Galvis L, Fraile B, de Bethencourt FR, Martínez-Onsurbe P, Olmedilla G, et al. Immunoreactivity to caspase-3, caspase-7, caspase-8, and caspase-9 forms is frequently lost in human prostate tumors. Hum Pathol. 2012; 43(2):229-37.

13. Harada H, Hiraoka M, Kizaka S. Antitumor effect of TAT-oxygendependent degradation-caspase-3 fusion protein specifically stabilized and activated in hypoxic tumor cells. Cancer Res. 2002; 62(7):2013-2018

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 (Persian)]. Qom Univ Med Sci J. 2017; 11(6):1-9.

[Downloaded from islamiclifej.com on 2024-01-26]

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 (Persian)]. Med J Tabriz Univ Med Sci Health Serv. 2018; 39(6):35-43
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 (1985). 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.[DOI:10.1038/nrm2308] [PMID]
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. 2013; 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. ScientificWorldJournal. 2014; 10:340-9
23. Viña J, Gomez-Cabrera MC, Borras C, Froio T, Sanchis-Gomar F, Martinez-Bello VE et al. Mitochondrial biogenesis in exercise and in ageing. Adv Drug Deliv Rev. 2009; 61(14):1369-14.
24. Sangstad AD, Kaspersen K-HF, , Basnet P, Ytrehus K, Acharya G.Hafstad AD. Effects of high intensity interval training on pregnant rats, and the placenta, heart and liver of their fetuses. PloS one. 2015;10(11):e0143095.
25. Rasheva VI, Domingos PM. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. Apoptosis. 2019; 14(8):996-1007.
26. Carbone JW McClung JP, Pasiakos SM. Skeletal muscle response to negative energy balance: effect of dietary protein. Adv Nutr; 2012.3(2):119-26.
27. Weinheimer EM,Sands LP, Campbell WW.Asystematic review of the seprste and combined effects of energy restriction and exercise on fat-free mass in middle-aged and older adults: implications for sarcopenic obesity. Nutr Rev; 2010.68(7):375-88.
28. Song W, Kwak HB, Lawler JM. Exercise training attenuates age-induced changes in apoptotic signaling in rat skeletal muscle. Antioxid Redox Signal. 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. Qiu X, Brown K, Hirschey MD, Verdin E, Chen D. Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation. Cell Metab. 2013; 12(6):662-7.

[Downloaded from islamiclifej.com on 2024-01-26]