

اثر تمرین استقامتی با شدت بالا بر بیان ژن‌های p53 و سیتوکروم C عضله نعلی موش‌های صحرایی نر

فاطمه سیدقمی^۱، جبار بشیری^{۱*}، فرهاد غلامی^۲

^۱گروه تربیت بدنی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران، ^۲دانشکده تربیت بدنی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۵/۸/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۲۸

چکیده

زمینه و هدف: شواهد اخیر حاکی است که تمرین‌های ورزشی می‌تواند فرایند مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی را تحت تأثیر قرار دهد. با این حال، تأثیر تمرین استقامتی با شدت بالا بر عوامل آپوپتوزی نامشخص است. بنابراین، در مطالعه حاضر اثر تمرین استقامتی با شدت بالا بر بیان ژن‌های p53 و سیتوکروم C عضله نعلی موش‌های صحرایی نر بررسی شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ۱۶ سر موش صحرایی نر سه ماهه به شکل تصادفی در دو گروه تمرین (۸سر) و کنترل (۸سر) جایگزین شدند. برنامه تمرینی شامل سه ماه تمرین استقامتی با شدت VO_{2max} ۷۵-۸۰ درصد و با تکرار ۵ روز در هفته بود. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، عضله نعلی حیوانات استخراج و بیان ژن‌های p53 و سیتوکروم C با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی در زمان واقعی (RT-PCR) بررسی شد. داده‌های آماری با استفاده از آزمون تی مستقل تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: تفاوت معنی‌داری بین گروه تجربی و کنترل در رابطه با بیان ژن p53 عضله نعلی مشاهده نشد ($p=0/67$). با این حال، بیان ژن سیتوکروم C عضله نعلی گروه تمرین به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود ($p=0/001$).

نتیجه‌گیری: تمرین استقامتی با شدت بالا توانست بیان ژن سیتوکروم C را کاهش دهد که ممکن است ناشی از بهبود پایداری غشای میتوکندریایی و کاهش نفوذپذیری آن باشد. این تغییر ممکن است بر آپوپتوز عضله نعلی تأثیر قابل توجهی داشته باشد. با این حال، نیاز به بررسی و تأیید آن در تحقیقات آتی وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: تمرین استقامتی شدید، ژن p53، ژن سیتوکروم C، عضله نعلی.

*نویسنده مسئول: جبار بشیری، تبریز، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه علوم ورزشی

Email: bashiri.jabbar@gmail.com

مقدمه

بافت عضله اسکلتی تقریباً نیمی از توده بدن انسان را تشکیل می‌دهد و علاوه بر نقش تولید نیرو، عامل حیاتی برای حفظ همئوستاز بدن انسان می‌باشد. به علاوه، انقباض‌های عضله اسکلتی حرکات بدن انسان را شکل می‌دهد و برای حفظ پایداری و ثبات ضروری است. با توجه به نقش عضله اسکلتی در حرکت و اعمال متابولیکی، هرگونه تغییر در شرایط انقباضی، فیزیکی و سوخت و سازی آن اثرات مهم و زیادی بر سلامتی انسان می‌گذارد (۴). در این بین یکی از مهم‌ترین عوامل در سطح سلولی که با کاهش توده و قدرت عضلانی ارتباط تنگاتنگی داشته و در سال‌های اخیر توجه بسیاری از متخصصان حوزه سلامت و ورزش را به خود جلب کرده است، تشدید آپوپتوز یا مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در این بافت پیکری مهم است (۱۹ و ۵). عضله اسکلتی در طول پیری و چندین حالت بیماری تغییر پیدا می‌کند. بیماری‌های مزمن زیادی از قبیل دیابت، چاقی، کمبود ویتامین D، کمبود هورمون رشد ممکن است با اختلال در تنظیم آپوپتوز باعث تسریع کاهش توده و قدرت عضلانی و در نتیجه افزایش خطر ناتوانی جسمانی و بیماری‌های عضلانی از جمله سارکوپنیا^(۱)، دیستروفی‌های^(۲) عضلانی و تخریب عضله شود (۱۹ و ۵، ۲). در این راستا برخی از شواهد و مدارک حاکی است که پروتئین p53 یا سرکوب‌گر تومور^(۳) از طریق فعال‌سازی فرآیند آپوپتوز باعث ممانعت از تکثیر و ترمیم سلول‌های عضلانی و تسریع

مرگ سلولی می‌شود (۲۲ و ۶). این امر اغلب به واسطه مسیر داخلی یا میتوکندریایی آپوپتوز و افزایش نفوذپذیری غشای خارجی میتوکندری و در نتیجه رهائش عوامل آپوپتوزی به داخل سیتوپلاسم انجام می‌شود. در این بین، 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 شده و موجب راه اندازی واکنش‌های کاسپازی در مسیر داخلی می‌شود. سیتوکروم C با اتصال به فاکتور فعال کننده آپوپتوز-۱^(۴) (Apaf-1) موجب فعال‌سازی پروکاسپاز ۹ و سپس کاسپاز ۹ به عنوان کاسپاز آغازگر آپوپتوز در مسیر میتوکندریایی می‌شود. این روند نهایتاً موجب فعال‌سازی کاسپاز ۳ به عنوان 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 سلول به مرحله غیرقابل برگشت مرگ سلولی می‌شوند (۲۴، ۱۸ و ۱). لذا پژوهشگران همواره به دنبال به کارگیری روش‌های مناسب برای مقابله با آپوپتوز شدید و کند کردن روند پیری سلول‌های عضلانی هستند.

در سال‌های اخیر، تأثیر تمرین‌های ورزشی با شدت‌ها و حجم‌های مختلف بر فرآیند آپوپتوز توجه

1- Sarcopenia

2-Dystrophy

3-Tumor suppressor protein

4-Apoptotic peptidase activating factor-1

بسیاری از محققان را به خود جلب کرده است. با این حال نتایج برخی از مطالعه‌ها در این حوزه متناقض هستند. در این راستا، مسافری ضیاالدینی و همکاران گزارش کردند که شش هفته تمرین استقامتی با ۶۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه موجب کاهش بیان پروتئین p53 در عضله اسکلتی موش‌های صحرایی تمرین کرده شد (۲۶). همچنین، کی و همکاران اشاره داشتند که هشت هفته تمرین هوازی منظم به مدت ۶۰-۳۰ دقیقه در روز و با سرعت ۲۰ متر بر دقیقه موجب کاهش میزان پروتئین p53 و افزایش بیان آنزیم‌های ضد اکسایشی عضله اسکلتی در موش‌های تمرین کرده در مقایسه با موش‌های تمرین نکرده شد (۲۱). با این حال و بر خلاف نتایج مطالعه‌های مذکور، برخی از پژوهش‌ها اشاره به افزایش بیان پروتئین‌های p53 و سیتوکروم C متعاقب تمرین‌های ورزشی دارند به طوری که وینشتین و همکاران اشاره داشتند که ۱۰ هفته تمرین روی چرخ گردان موجب افزایش بیان پروتئین سیتوکروم C در عضله نعلی موش‌های صحرایی نر تمرین کرده در مقایسه با موش‌های صحرایی کنترل شد (۲۳). به علاوه، کیم و همکاران اشاره داشتند که شش ماه تمرین هوازی موجب افزایش قابل توجه پروتئین p53 میتوکندریایی و پیوند بین پروتئین p53 و DNA میتوکندری شد (۹). تفاوت در متغیرهای تمرین‌های استقامتی مورد استفاده در مطالعه‌های مختلف باعث به دست آمدن نتایج متناقضی شده است.

بنابراین، یافته‌ها حاکی از آن است که پروتکل‌های ورزشی مختلف تأثیرات متفاوتی بر عوامل پیش و ضد آپوپتوزی دارد. شدت تمرین می‌تواند از عوامل تأثیرگذار مهم در این زمینه باشد. گراناتا و همکاران در مقایسه اثر پروتکل‌های ورزشی مختلف که به مدت ۴ هفته بر روی مردان سالم انجام شد گزارش کردند که تمرین اینتروال سرعتی باعث افزایش محتوای پروتئین p53 در عضله پهن جانبی شد، اما محتوای این پروتئین پس از تمرین استقامتی تداومی و تمرین اینتروال با شدت بالا (۹۰ درصد W_{max}) تغییری نکرد. با این حال، تأثیر تمرین استقامتی با شدت بالاتر از متوسط بر عوامل مؤثر در فرایند آپوپتوز عضله اسکلتی مشخص نشده است، لذا هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر ۱۲ هفته تمرین استقامتی با شدت معادل ۸۰-۷۵ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه بر بیان ژن‌های p53 و سیتوکروم C عضله نعلی موش‌های صحرایی نر بود.

روش بررسی

در مطالعه تجربی حاضر، ۱۶ موش صحرایی نر دو ماهه ویستار ۱۴۸۴۸ خریداری شد. جهت جلوگیری از استرس و تغییر شرایط فیزیولوژیکی، نمونه‌ها به مدت دو هفته تحت شرایط جدید نگهداری شدند. لازم به ذکر است که دما (22 ± 2 سانتی‌گراد)، رطوبت محیط (50 ± 5 درصد) و چرخه‌ی روشنایی - تاریکی ۱۲:۱۲ ساعته کنترل شد. حیوانات به صورت آزاد از غذای استاندارد و آب در طول

دوره پژوهش استفاده کردند. لازم به ذکر است که نگهداری حیوان‌های آزمایشگاهی مطابق با راهنمای انستیتوی ملی سلامت در آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز انجام شد. همچنین تمامی اعمال انجام شده روی حیوان‌ها، مطابق دستورالعمل کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی مستخرج از دستورالعمل هلسینکی بود.

در ابتدا نمونه‌ها به مدت ۱۴ روز تحت برنامه آشنایی با نحوه فعالیت روی نوارگردان قرار گرفتند. در طی این دوره، شیب نوارگردان صفر درصد، سرعت ۱۰-۱۵ متر بر دقیقه و مدت تمرین ۱۰-۵ دقیقه در روز بود. در پایان این دوره، وزن موش‌ها با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم (GF-300, AND, Japan) اندازه‌گیری شد و حیوان‌ها پس از مطابقت وزنی به طور تصادفی در دو گروه کنترل و تمرین جایگزین شدند. گروه تمرین ۵ روز در هفته (یکشنبه، دوشنبه، سه‌شنبه، پنج‌شنبه و جمعه) و به مدت ۱۲ هفته در برنامه تمرین استقامتی روی نوارگردان الکترونیکی هوشمند حیوانی شرکت کرد. شدت نسبی کار در طول برنامه‌ی تمرین معادل ۷۵-۸۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه (۳۳-۲۴ متر در دقیقه با شیب ۱۵ درصد) حفظ شد. مدت زمان تمرین از ۱۰ دقیقه در روز در هفته‌ی اول شروع و به ۶۰ دقیقه در روز در هفته‌ی پنجم رسیده و تا انتهای دوره حفظ شد (۱۶).

۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، موش‌های صحرایی گروه‌های تمرین استقامتی و

کنترل تحت جراحی قرار گرفتند. موش‌ها ابتدا به وسیله استنشاق اتر بی‌هوش شدند. سپس به وسیله متخصصین کارآزموده جراحی انجام و عضله نعلی آنها استخراج و وزن کشی شد. سپس، نمونه 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 نعلی با استفاده از یک میلی‌لیتر بافر لیزکننده، هم‌زده شده و در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه انکوبه گردید. پس از اضافه کردن ۰/۲ میلی‌لیتر کلروفرم 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 ۱۳۷۰۰ g 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 ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه انکوبه شد. سپس، میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴- درجه و ۱۳۷۰۰ g سانتریفیوژ شده، مایع روئی بیرون ریخته شد و یک میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد به میکروتیوب اضافه گردید. بلافاصله میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه در شرایط ۴- درجه و ۱۳۷۰۰ g 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.

سپس در آب تیمار شده با دی اتیل پیروکربنات (DEPC) حل شد. پس از استخراج RNA، مقدار و خلوص آن به وسیله 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™ First Standard cDNA synthesis یک میکرولیتر RNA و یک میکرولیتر از DNase I reaction buffer 10X در یک تیوب ۱/۵ میلی لیتری ریخته شده و به وسیله DEPC-treated water به حجم ۹ میکرولیتر رسید. برای از بین بردن آلودگی احتمالی با DNA، یک میکرولیتر DNase به تیوب اضافه و پس از افزودن یک میلی لیتر 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 ۱۴۰۰۰ g 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 oligo (dt) یا پرایمر Random hexamer افزوده شد و ۵ دقیقه در دمای ۷۰- درجه بر روی Dry block انکوبه گردید. چهار میکرولیتر 5X reaction buffer 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 ۳۷ درجه انکوبه گردید. یک میکرولیتر آنزیم RverertAid™ 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 ۲۵ درجه و به دنبال آن ۹۰ دقیقه در ۴۲ درجه انکوباسیون صورت گرفت. واکنش با قرار دادن تیوب به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰- درجه پایان پذیرفت و نمونه در فریزر ۷۰- درجه نگهداری شد.

اندازه گیری میزان بیان ژنی پروتئین های p53 و سیتوکروم c با استفاده از دستگاه (Corbett Research Australia) Corbett-Rotor gene-6000 انجام گردید. جفت پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از نرم افزار Primer 3 طراحی و به وسیله بایونیر (Bioneer- South Korea) سنتز شد و با غلظت نهایی ۸۰ نانومتر مورد استفاده قرار گرفت.

واکنش ها بر مبنای استفاده از رنگ Syber green انجام شد. رنگ Syber green طی واکنش Real-time PCR به DNA دو رشته ای متصل شده و نور فلورسنت ساطع می کند. در جدول ۲ توالی پرایمرهای بیان ژنی برای موش های صحرایی مشخص شده است. به عنوان بلانک از تیوبی که حاوی همه مواد موجود در واکنش به جز cDNA بود، استفاده شد و به جای cDNA، به تیوب مربوطه DEPC water اضافه گردید. پس از اتمام واکنش تکثیر، برای هر واکنش PCR یک نمودار رسم و سپس بر این اساس

تعیین شد. در پایان قبل از آنالیز داده‌ها، منحنی ذوب (Melting curve) به دست آمده از هر واکنش Real-time PCR بررسی شد تا پیک مربوط به ژن مورد نظر و فقدان پرایمر تأیید 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 جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و Excel 2010، و آزمون‌های آماری شاپیرو-ویلک، پارامتریک و تی مستقل تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

در رابطه با تأثیر سه ماه تمرین استقامتی روی نوارگردان بر ویژگی‌های بدنی، با استفاده از آزمون تی تست تفاوت معنی‌داری بین توده بدنی آزمودنی‌های گروه کنترل و گروه تمرین مشاهده شد ($p=0/03$)، به طوری که توده بدن گروه تمرین ۱۹

درصد کمتر از گروه کنترل بود. با این حال، تفاوت معنی‌داری در وزن عضله نعلی و نسبت وزن عضله نعلی به توده بدن گروه کنترل و تمرین مشاهده نگردید ($p<0/05$). این در حالی بود که میانگین وزن عضله نعلی گروه تمرین حدود ۱۱ درصد کمتر از گروه کنترل بود (جدول ۱).

در رابطه با شاخص‌های مربوط به آپوپتوز عضله نعلی، نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل و تمرین استقامتی در بیان ژن p53 وجود ندارد ($t=0/43$; $p=0/67$). با این حال، میزان بیان ژن سیتوکروم C در گروه تمرین استقامتی به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود ($t=4/16$; $p=0/001$). به عبارتی سه ماه تمرین استقامتی روی نوارگردان موجب کاهش قابل توجه ژن کلیدی سیتوکروم C مربوط به آپوپتوز میتوکندریایی عضله نعلی موش‌های صحرایی شده است (نمودار ۱ و ۲).

جدول ۱: برنامه ۱۲ هفته تمرین استقامتی روی نوارگردان

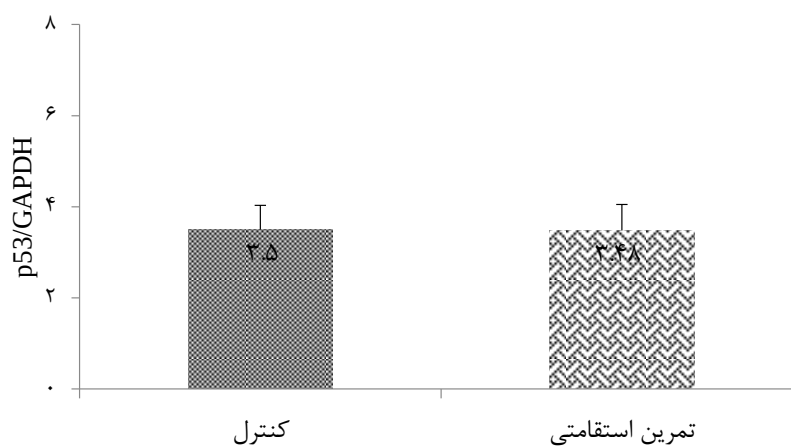
هفته‌های تمرین											
اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم	هفتم	هشتم	نهم	دهم	یازدهم	دوازدهم
۱۰	۲۰	۳۵	۴۵	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰
۲۴	۲۴	۲۵	۲۵	۲۶	۲۷	۲۸	۲۹	۳۰	۳۱	۳۲	۳۳
۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵

جدول ۲: توالی پرایمرهای بیان ژنی عضله نعلی موش‌های صحرایی

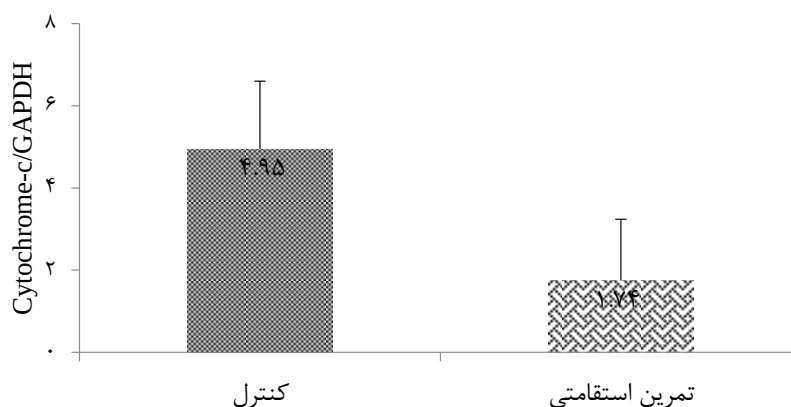
نام ژن	توالی الیگونوکلوئیدی پرایمر	طول قطعه (جفت باز)
P53	F: 5' TTTTCACCCCACCCTTCCCC 3' R: 5' CCTCAGACACACAGGTGGCA 3'	۱۰۱
Cytochrome-c	F: 5' GGAGTGTTCTGTTGTCCAGC3' R: 5' CTGACCTGTCTTCCGCCCAA3	۱۶۹
GAPDH	F: 5' GGAAAGCCTGCCGGTGACTA 3' R: 5' CACCCGGAGGAGAAATCGGG 3'	۱۱۰

جدول ۱: شاخص‌های اندازه‌گیری شده در گروه‌های مختلف موش‌های مورد مطالعه

شاخص‌های اندازه‌گیری شده	گروه	تعداد	میانگین	انحراف استاندارد
وزن بدن (گرم)	کنترل	۸	۲۵۱/۷۵	۲۲/۶
	تمرین استقامتی	۸	۲۰۲/۳۳	۱۸/۳
وزن عضله نعلی (گرم)	کنترل	۸	۰/۰۷۲	۰/۰۱
	تمرین استقامتی	۸	۰/۰۶۴	۰/۰۲
نسبت وزن عضله نعلی به وزن بدن (گرم/کیلوگرم)	کنترل	۸	۰/۲۹	۰/۰۵
	تمرین استقامتی	۸	۰/۳۲	۰/۰۳



نمودار ۱: میزان بیان ژن p53 در دو گروه کنترل و تمرین استقامتی



نمودار ۲: میزان بیان ژن سیتوکروم C در دو گروه کنترل و تمرین استقامتی

بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که سه ماه تمرین هوازی موجب کاهش معنی‌دار وزن بدن موش‌های صحرایی شد (۱۹ درصد). با این حال، با وجود کاهش معنی‌دار وزن بدن متعاقب سه ماه تمرین هوازی، تفاوت معنی‌داری در وزن عضله نعلی و نسبت وزن عضله نعلی به توده بدن گروه کنترل و تمرین مشاهده نگردید. اگرچه، میانگین وزن عضله نعلی گروه تمرین حدود ۱۱ درصد کمتر از گروه کنترل بود. به عبارتی، سه ماه تمرین هوازی با شدت نسبی ۷۵-۸۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه، در کنار کاهش قابل توجه وزن بدن، موجب کاهش غیرمعنی‌دار توده عضله نعلی شده است. موضوع کاهش وزن، با توجه به افزایش هزینه انرژی در گروه تمرین هوازی نسبت به گروه کنترل، آن هم برای مدت سه ماه چندان دور از انتظار نبود، چنان‌که در اغلب مطالعات قبلی

نیز به کاهش وزن ناشی از تمرین‌های هوازی طولانی

مدت اشاره شده است (۱۹ و ۱۳).

به علاوه، براساس نتایج پژوهش حاضر، تفاوت معنی‌داری بین گروه تمرین استقامتی و کنترل در رابطه با میزان بیان ژن p53 وجود نداشت، با این حال، میزان بیان ژن سیتوکروم C در گروه تمرین استقامتی به طور معنی‌داری و حدود ۶۴/۸۴ درصد کمتر از گروه کنترل بود. به عبارتی، سه ماه تمرین استقامتی با شدت بالا موجب کاهش قابل توجه ژن سیتوکروم C عضله نعلی موش‌های صحرایی شد و این احتمال وجود دارد که تمرین استقامتی موجب کاهش یا حداقل تعدیل بروز فرآیند آپوپتوز در این بافت سوماتیک حساس از طریق مسیر داخلی شود. در این راستا، برخی از مطالعه‌های قبلی اشاره به کاهش پروتئین‌های درگیر در مسیر میتوکندریایی آپوپتوز متعاقب تمرین‌های ورزشی داشتند. هم‌سو با مطالعه حاضر، مک میلان و همکاران در تحقیقی نشان

دادند که بیان پروتئین سیتوکروم C در عضله نعلی گروه تجربی پس از ۶ هفته دوییدن روی نوارگردان با تکرار ۵ جلسه در هفته به طور معنی داری کمتر از گروه کنترل بود (۱۵). اگرچه سازوکارهای متعددی مانند تغییر مستقیم در بیان ژن های مربوط به آپوپتوز، آزادسازی عوامل آپوپتوتیک میتوکندری، تغییرات تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) و وضعیت ضد اکسایشی مطرح شده است، ولی هنوز ابهامات بسیاری در این زمینه وجود دارد (۱۴). در این خصوص، وینشتین و همکاران اشاره داشتند که آپوپتوز میتوکندریایی اغلب با افزایش ROS در عضله اسکلتی همراه است و تمرین های ورزشی می توانند با کاهش تولید ROS و افزایش دفاع ضد اکسایشی، روند آپوپتوز را کندتر کند (۲۳). به نظر می رسد میتوکندری نقش مهمی در تنظیم آپوپتوز سلول های عضله اسکلتی ایفا می کند. در این راستا، اعضای خانواده Bcl-2^(۱)، شامل پروتئین های Bax^(۲) و Bcl-2 به عنوان پروتئین های اصلی، در شکل گیری کانال های آپوپتوزی، تنظیم نفوذپذیری میتوکندری و پیام های آپوپتوزی میتوکندریایی درگیر می شوند. نسبت Bax به Bcl-2 شاخصی برای نشان دادن پتانسیل آپوپتوز میتوکندریایی می باشد که Bcl-2 به وسیله ممانعت از اگومری شدن Bax-Bax، با فعالیت پیش آپوپتوزی پروتئین Bax مخالفت می کند. هنگامی که Bax به میتوکندری وارد می شود، منافذی را در غشای میتوکندری شکل می دهد که در نتیجه پروتئین هایی از

جمله سیتوکروم C آزاد شده و وارد سیتوزول می شود و باعث شروع پیام رسانی آپوپتوتیک آبشارهای کاسپاز پایین دستی می شود (۱۹). همچنین، پروتئین Bcl-2 با ورود به غشای خارجی میتوکندری، یکپارچگی غشا را با خارج ساختن یون های H⁺ از طریق کانال های یونی حفظ کرده و با اتصال به Apaf-1، فعال سازی کاسپازی را مهار می کند. این احتمال وجود دارد که در پاسخ به فشار اکسایشی، جابه جایی و استقرار پروتئین Bax در غشای بیرونی میتوکندری افزایش می یابد (۱۹ و ۱۷، ۱۱، ۷). این موضوع تا اندازه ای می تواند ناشی از فعال شدن JNK^(۳) سیتوزولی باشد، به طوری که JNK در حضور محرک های استرس سلولی فسفریله شده و موجب مهار پروتئین Bcl-2 می شود؛ لذا پروتئین Bax اجازه جابه جایی به سمت میتوکندری را می یابد. پروتئین JNK در داخل میتوکندری، در باز شدن mtPTP^(۴) دخالت کرده و موجب رهایش عوامل پیش آپوپتوزی مانند سیتوکروم C به داخل سیتوزول می شود. به محض رهایش و ورود به سیتوزول، سیتوکروم C می تواند از طریق آبشار کاسپازی شامل کاسپاز-۹ و در نهایت کاسپاز-۳ باعث تشدید آپوپتوز شود (۲۳). در این تحقیق مشاهده شد که تمرین استقامتی با شدت بالا به مدت ۱۲ هفته بیان ژن سیتوکروم C را به طور معنی داری کاهش داد، لذا ممکن است این پروتکل

1- B-cell lymphoma 2

2- Bcl2-Associated X Protein

3- c-Jun-N-Terminal Kinase

4- Mitochondrial Permeability Transition Pore

ورزشی بدین‌گونه در تغییر فرآیند آپوپتوز در عضله نعلی تأثیرگذار باشد.

از سوی دیگر، بر خلاف نتایج مطالعه حاضر، هو و همکاران اشاره داشتند که بیان پروتئین سیتوکروم c میوکارد گروه تمرین (۱۲ هفته تمرین استقامتی) به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود (۸). همچنین ژین و همکاران نشان دادند که ۶ ماه تمرین استقامتی موجب تسریع فرآیند آپوپتوز در میوکارد موش‌های صحرایی می‌شود (۲۵). این تناقض نیز احتمالاً می‌تواند ناشی از نوع بافت مورد مطالعه باشد، به طوری که هو و همکاران و ژین و همکاران اثر تمرین استقامتی را بر میوکارد موش‌های صحرایی مورد بررسی قرار داده بودند و میزان تغییرات عوامل آپوپتوتیکی نیز می‌تواند در بافت‌های مختلف متفاوت باشد. در این راستا پترسون و همکاران اشاره داشتند که اثر پذیری عضله قلبی نسبت به عضله اسکلتی در مقابل آپوپتوز بیشتر بوده و تمرین اغلب در بافت قلبی می‌تواند موجب تغییر شاخص‌های آپوپتوزی شود، لذا افزایش بیان عوامل آپوپتوزی مانند پروتئین Bax و سیتوکروم c متعاقب تمرین‌های شدید و طولانی مدت هوازی در عضله قلبی محتمل‌تر است. همچنین، به نظر می‌رسد آنچه موجب تناقض نتایج مطالعه حاضر با مطالعه هو و همکاران شده است، تفاوت در زمان برداشت بافت باشد، به طوری که در مطالعه حاضر، بافت عضله نعلی ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین استقامتی استخراج شد، ولی هو و همکاران

بلافاصله بعد از آخرین جلسه تمرین بافت را استخراج کرده بودند، لذا این احتمال دور از انتظار نیست که در مطالعه هو و همکاران، افزایش معنی‌دار بیان پروتئین سیتوکروم c در گروه تمرین ناشی از اثرات حاد آخرین جلسه تمرین هوازی با شدت بالای متوسط (۶۰ دقیقه با سرعت ۳۰ متر در دقیقه و شیب ۳ درصد) باشد، به طوری که اغلب مطالعه‌های قبلی نیز اشاره به افزایش شاخص‌های مختلف آپوپتوزی بلافاصله پس از یک جلسه فعالیت ورزشی متوسط به بالا و شدید داشتند (۲۰ و ۱۱).

همچنین، اگرچه در مطالعه حاضر میزان بیان ژن p53 کاهش قابل توجهی متعاقب تمرین‌های استقامتی نشان نداد و تفاوت معنی‌داری بین گروه تمرین و کنترل مشاهده نشد، اما مغایر با تحقیق حاضر، مسافری ضیاالدینی و همکاران گزارش کردند که شش هفته تمرین استقامتی با ۶۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه موجب کاهش بیان پروتئین p53 در عضله اسکلتی موش‌های صحرایی تمرین کرده شد (۲۶). همچنین، کی و همکاران اشاره داشتند که هشت هفته تمرین هوازی منظم به مدت ۶۰-۳۰ دقیقه در روز و با سرعت ۲۰ متر بر دقیقه موجب کاهش معنی‌دار میزان پروتئین p53 و افزایش بیان آنزیم‌های ضد اکسایشی عضله اسکلتی در گروه تجربی شد (۲۱). دلایل مختلفی می‌تواند توجیه‌کننده تفاوت در یافته‌ها باشد. برای مثال، تفاوت در وضعیت اولیه نمونه‌های تحقیق می‌تواند از علل مغایرت در نظر

گرفته شود. مطالعه کی و همکاران بر روی موش‌های دیابتی انجام شد که نشان داده شده است استرس اکسایشی در این نمونه‌ها افزایش می‌یابد و ظرفیت و عملکرد میتوکندریای در آن‌ها تضعیف می‌شود، در حالی که نمونه‌هایی تحقیق حاضر موش‌های سالم بودند، لذا ممکن است شاخص‌های مطرح در نمونه‌های دیابتی تأثیرپذیری بیشتر از مداخله‌ها نسبت به نمونه‌های سالم داشته باشد. همچنین، به نظر می‌رسد تفاوت در متغیرهای تمرینی از جمله مدت و شدت پروتکل ورزشی نیز در این مغایرت دخیل باشد چرا که برنامه تمرین مطالعه مسافری ضیاالدینی و همکاران در یک دوره کوتاه شش هفته‌ای و با شدت متوسط ۶۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه اجرا شده بود و کی و همکاران نیز از یک دوره تمرین هشت هفته‌ای با شدت حدود ۴۵-۴۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه استفاده کرده بودند در حالی که در مطالعه حاضر از یک دوره طولانی‌تر (۱۲ هفته) و با شدت بیشتر ۸۰-۷۵ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه استفاده شد، لذا این احتمال وجود دارد که پروتکل تمرینی مطالعه حاضر (تمرین استقامتی طولانی مدت و با شدت بالای متوسط) علی‌رغم اثرگذاری بر پایداری غشای میتوکندریایی و کاهش نفوذپذیری آن که منجر به کاهش قابل توجه بیان ژن سیتوکروم C در عضله اسکلتی شد، نتوانسته تأثیری بر پروتئین‌های بالادست مانند p53 داشته باشد. با این حال، با توجه به محدودیت‌های پژوهش حاضر مانند عدم

اندازه‌گیری تغییرات مورفولوژیکی، ارزیابی بیان سایر پروتئین‌های درگیر در مسیر میتوکندریایی آپوپتوز، بررسی بیان پروتئین‌های درگیر در مسیر خارجی آپوپتوز و اندازه‌گیری محتوی پروتئین‌های موردنظر به وسیله روش وسترن بلات، اظهار نظر قطعی در مورد نحوه تأثیرپذیری شاخص‌های مربوط به آپوپتوز عضله نعلی از تمرین‌های ورزشی مختلف، منوط به انجام تحقیق‌ها و مطالعه‌های بیشتر در این زمینه است.

نتیجه‌گیری

به طور کلی، بر اساس پیشینه موجود این فرضیه مطرح می‌شود که شدت تمرین می‌تواند از متغیرهای دخیل در تغییرات عوامل آپوپتوزی باشد. از این رو، در این تحقیق اثر تمرین‌های استقامتی با شدت بالاتر از متوسط (۸۰-۷۵ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه) بر عوامل آپوپتوزی شامل بیان ژن پروتئین p53 و سیتوکروم C بررسی شد که نتایج حاکی از عدم تغییر معنی‌دار بیان ژن p53 و کاهش معنی‌دار سیتوکروم C در عضله نعلی موش‌های صحرایی نر پس از سه ماه تمرین استقامتی بر روی تردمیل بود. این احتمال وجود دارد که پروتکل تمرینی استقامتی با شدت بالاتر از متوسط با تأثیر بر پایداری غشای میتوکندریایی و کاهش نفوذپذیری آن منجر به کاهش قابل توجه بیان ژن سیتوکروم C در عضله اسکلتی گروه تمرین شده باشد. همچنین، این برنامه تمرینی

نتوانست تأثیری بر پروتئین‌های بالادست آپوپتوزی مانند p53 داشته باشد. با این حال، جهت اظهار نظر قطعی در مورد نحوه تأثیری‌گذاری تغییر شدت تمرین به عنوان یکی از متغیرهای تمرینی مهم بر عوامل آپوپتوزی، نیاز به تحقیق‌های بیشتری در این زمینه است.

تقدیر و تشکر

مقاله حاضر مستخرج از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد فیزیولوژی ورزشی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز می‌باشد، لذا از مساعدت و همکاری صمیمانه مسئولین دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز و تمام افرادی که موجب تسهیل اجرای پایان نامه شدند، تقدیر و تشکر می‌گردد. لازم به ذکر است که هزینه‌های اجرای این مطالعه تحت حمایت مالی هیچ سازمانی نبوده است.

REFERENCES

1. Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, Guevara RL, Cepero E, Boise LH. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biol* 2013; 14: 32.
2. Cerella C, Grandjenette C, Dicato M, Diederich M. Roles of Apoptosis and Cellular Senescence in Cancer and Aging. *Curr Drug Targets* 2016; 17(4): 405-15.
3. Fang J, Wu L, Chen L. Postconditioning attenuates cardiocyte ultrastructure injury and apoptosis by blocking mitochondrial permeability transition in rats. *Acta Cardiologica* 2008; 63(3): 377-87.
4. Farrell P, Joyner J, Caiozzo V. *Acm's advanced exercise physiology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
5. Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Ilio C.D, Laurenzi VD. Role of Apoptosis in disease. *Aging* 2012; 4(5): 330-49.
6. Fridman J, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 2003; 22: 9030-40.
7. García-Sáez AJ. The secrets of the Bcl-2 family. *Cell Death Differ* 2012; 19(11): 1733-40.
8. 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* 2012; 112(8): 2943-55.
9. 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; 26:1138-5.
10. Klamt F, Zdanov S, Levine RL, Pariser A, Zhang Y, Zhang B, et al. Oxidant-induced apoptosis is mediated by oxidation of the actin-regulatory protein cofilin. *Nat Cell Biol* 2009; 11: 1241-6.
11. Kwak HB. Effects of aging and exercise training on apoptosis in the heart. *J of Exer Rehabil* 2013; 9(2): 212-9.
12. Lai CH, Ho TJ, Kuo WW, Day CH, Pai PY, Chung LC, et al. Exercise training enhanced SIRT1 longevity signaling replaces the IGF1 survival pathway to attenuate aging-induced rat heart apoptosis. *Age* 2014; 36(5): 9706.
13. Lee SD, Shyu WC, Cheng IS, Kuo CH, Chan YS, Lin YM, Tasi CY, Ho TJ, Huang CY. Effects of exercise training on cardiac apoptosis in obese rats. *Nut Meta Cardio Dise* 2013; 23: 566-73.
14. Liu WY, He W, Li H. Exhaustive training increases uncoupling protein 2 expression and decreases bcl-2/bax ratio in rat skeletal muscle. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 2013: 780719.
15. McMillan EM, Graham DA, Rush JWE, Quadriatero J. Decreased DNA fragmentation and apoptotic signaling in soleus muscle of hypertensive rats following 6 weeks of treadmill training. *J Appl Physiol* 2012; 113: 1048-1057.
16. Natio H, Powers SK, Demirel HA, Aoki J. Exercise training increases heat shock protein in skeletal muscles of old rats. *Med Sci Sports Exerc* 2001; 33(5): 729-34.
17. Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem* 2011; 351(1-2):41-58.
18. Parrish AB, Freel CD, Kornbluth S. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5(6): a008672.
19. 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* 2008; 105: 1934-19.
20. Phaneuf S, Leeuwenburgh C. Apoptosis and exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2001; 33(3): 393-6.
21. 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: 794-800.
22. Speidel D. Transcription-independent p53 apoptosis: an alternative route to death. *Trends Cell Biol* 2010; 20(1):14-24.

- 23.Vainshtein A, Kazak L, Hood DA. Effects of endurance training on apoptotic susceptibility in striated muscle. J of Appl Physio 2011; 110(6):1638-45.
- 24.Würstle ML, Laussmann MA, Rehm M. The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome. Exp Cell Res 2012; 318(11): 1213-20.
- 25.Xin L, Jian LU, Wei WU. Effect of long-term endurance exercise on cardiac apoptosis. J of Mian Nor Univ 2009; 7: 2009-11.
- 26.Ziaaldini MM, Koltai E, Csende Z, Goto S, Boldogh I, Taylor AW, et al. Exercise training increases anabolic and attenuates catabolic and apoptotic processes in aged skeletal muscle of male rats. Experimental Gerontology 2015; 67: 9-14.

Effect of High Intensity Endurance Training on p53 and Cytochrome-c Gene Expression in Male Rat Soleus Muscle

Seyedgomi F¹, Bashiri J^{1*}, Gholami F²

¹Department of Physical Education, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran,

²Department of Physical Education and Sports Sciences, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran.

Received: 8 Nov 2016

Accepted: 19 Sep 2017

Abstract

Background and aim: Recent research has suggested that exercise training is potential to influence the process of programmed cell death. However, little is known about the effect of high intensity endurance exercise on apoptotic factors. Therefore, in the present study the effect of high intensity endurance training on p53 and *cytochrome-c* gene expression in male rats' Soleus muscle was investigated.

Methods: In this experimental study sixteen 3-month-old male rats were randomly divided into two groups of endurance training (n=8) and control (n=8). Exercise program included three months endurance training at the intensity of 75-80% of VO_{2max} with the frequency of 5 days per week. Forty-eight hours following the last training session, the soleus muscle of the animals were extracted and p53 and cytochrome-c gene expression were assessed using Real Time-PCR method. Data were analyzed by independent t-test at the significance level of $P < 0.05$.

Results: No significant difference was seen between the experimental and control groups regarding p53 gene expression ($P=0.67$). However, *cytochrome-c* gene expression was significantly lower in the experimental group than the control group ($P=0.001$).

Conclusion: High intensity endurance training decreased *cytochrome-c* gene expression which is likely mediated by improved mitochondrial membrane stability and decreased permeability. It may influence the process of apoptosis in soleus muscle. However, it needs to be examined and validated in future studies.

Keywords: High intensity endurance training, p53 gene, *Cytochrome-c* gene, Soleus muscle

*Corresponding author: Bashiri J, 1Department of Physical Education, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

Email: shimamoamadi1365@gmail.com

Please cite this article as follows:

Seyedgomi F, Bashiri J, Gholami F. Effect of High Intensity Endurance Training on p53 and Cytochrome-c Gene Expression in Male Rat Soleus Muscle. Armaghane-danesh 2017; 22 (5): 608-622.