

## تأثیر تمرین تداومی بر میزان پروتئین های BAX و BCL-2 قلبی در رت های مسموم شده با آب اکسیژنه

صمد صفرزاده گرگری<sup>۱\*</sup>، حسن متین همایی<sup>۲</sup>، محمد علی آذربایجانی<sup>۳</sup>

### مقاله پژوهشی

**مقدمه:** گونه‌های اکسیژن فعال باعث تحریک آپوپتوز سلول های قلبی شده و عملکرد میوکاردی را مختل می‌کند، ولی مکانیسم آن به درستی معلوم نیست. شواهد نشان داده تمرینات ورزشی ممکن است فرآیندهای پیام رسانی آپوپتوز را تغییر دهد. هدف از این پژوهش بررسی تأثیر تمرین تداومی بر پروتئین های BAX و BCL-2 همراه با تزریق آب اکسیژنه با دو دوز مختلف در رت‌های نر سالم می‌باشد.

**روش بررسی:** تحقیق حاضر به روش تجربی با پنجاه راس موش نر سالم به ۵ گروه ۱۰ راسی شامل: گروه اول (کنترل)، گروه دوم و سوم به ترتیب تزریق یک و دو میلی مول آب اکسیژنه، گروه چهارم و پنجم به ترتیب تزریق یک و دو میلی مول آب اکسیژنه همراه با انجام تمرینات تداومی، تقسیم شده بودند انجام گردید. گروه های تمرینی به مدت هشت هفته و چهار روز در هفته روی تردمیل با شدت متوسط دویدند. ۲۴ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی و در حالت بی هوشی سینه آن ها شکافته شد. میزان پروتئین های بکس (BAX) و بی سی ال دو (BCL-2) توسط دستگاه الایزا استخراج شد. برای سنجش توتال پروتئین از روش brad ford استفاده گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با آزمون آنووا در سطح معنی داری  $P \leq 0/05$  توسط نرم افزار spss16 مورد بررسی قرار گرفت.

**نتایج:** نتایج نشان داد که میزان سطوح BAX و BCL2 و نسبت BAX/BCL2 در گروه های تمرین و آب اکسیژنه پس از دو ماه تمرین تداومی در مقایسه با گروه کنترل معنی دار نبود ( $P > 0/05$ ).

**نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج به دست آمده اگر هشت هفته تمرین تداومی همراه با تزریق آب اکسیژنه با دوزهای یک و دو میلی لیتر صورت گیرد احتمالاً نمی‌تواند باعث افزایش پروتئین پیش آپوپتوزی سلول های قلبی در رت ها گردد ممکن است به سازگاری ایجاد شده بین تجزیه و سنتز سلول های قلبی در اثر انجام تمرینات تداومی مربوط باشد.

**واژه‌های کلیدی:** آپوپتوز سلول های قلبی، تمرینات تداومی، پروتئین Bax، پروتئین Bcl2، آب اکسیژنه، رت

**ارجاع:** صفرزاده گرگری صمد، همایی حسن متین، آذربایجانی محمد علی. تأثیر تمرین تداومی بر میزان پروتئین های BAX و BCL-2 قلبی در رت های مسموم شده با آب اکسیژنه. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۷؛ ۲۶ (۴): ۳۶۳-۷۹.

۱- دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی گروه فیزیولوژی ورزشی دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاداسلامی واحد تهران مرکزی، شهر تهران، ایران  
 ۲- استاد گروه فیزیولوژی ورزشی دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاداسلامی واحد تهران مرکزی، شهر تهران، ایران  
 ۳- استاد گروه فیزیولوژی ورزشی دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاداسلامی واحد تهران مرکزی، شهر تهران، ایران  
 \*(نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۴۹۹۱۳۱۲۶، پست الکترونیکی: safarzadeh.gargari@yahoo.com، کد پستی: ۳۳۱۹۱۱۸۶۵۱

## مقدمه

آپوپتوز، مرگ فیزیولوژیک سلولی است که در شرایط طبیعی سبب حذف سلول‌های پیر، آسیب دیده، اضافی و مضر می‌شود و برای تکامل و هموستاز بافتی ضروری است. آپوپتوز در ترمیم و نوسازی بافتی و نیز حذف سلول‌های خود واکنش‌گر نقش دارد (۱) در سال‌های اخیر مطالعات متعددی نشان دادند که اجزای مکانیزم مرگ سلولی در طول تجزیه ارگانل‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۲)، طبق این نظریه، تجزیه ارگانل‌ها شکلی از مرگ سلولی تقلیل یافته می‌باشد. در حمایت از این نظریه مشاهده شد که بیان ژن بی‌سی‌ال دو (*BCL-2*)، که یک ملکول ضد آپوپتوزی است، باعث کاهش یا به تاخیر انداختن تجزیه ارگانل‌ها در مسیرهای تمایزی می‌شود. نفوذپذیری غشاء میتوکندری به سیتوکروم C توسط نسبت نسبی واسطه‌های پروآپوپتوتیک و آنتی‌آپوپتوتیک از قبیل بکس (*Bax*) یا بک (*Bak*) سبب افزایش نفوذپذیری غشاء میتوکندری شده و متعاقب آن آپوپتوز سلولی را تحریک می‌کند (۳). جلوگیری از آسیب سلول‌های میوکاردی قلبی ناشی از آپوپتوز بسیار با اهمیت است و در چند سال اخیر تأثیر تمرینات مختلف بر روی آپوپتوز مورد توجه بسیاری از پژوهش‌گران علوم ورزشی بوده و نشان دادند که آپوپتوز و مرگ سلولی می‌تواند با تمرینات ورزشی رخ دهد.

در طول چند دهه گذشته محققین گزارش کرده‌اند که تمرینات منظم و با شدت متوسط می‌تواند آپوپتوز را در کروموزوم‌های افراد بزرگ سال کاهش دهد (۴،۵). در این باره پترسون و همکاران نشان دادند که ۹ هفته تمرین با شدت متوسط می‌تواند باعث کاهش سطوح پروتئین *BAX*، فعالیت کاسپاز و قطعه‌قطعه شدن DNA در بافت قلبی موش‌های چاق شود (۶). این یافته‌ها با نتایج کواندری و همکاران (۲۰۱۲) حمایت می‌شود آنها نشان دادند تمرین روی تردمیل باعث افزایش متغیرهای آنتی‌آپوپتوزیسی بافت قلبی بعد از آسیب ایسکمی - رپرفیوژن (IR) موش‌ها شده بود (۷). در مقابل نتایج تحقیقات اسینبرگر و همکاران (۲۰۰۹) نشان داده است که تمرینات استقامتی طولانی مدت می‌تواند بیان ژن

پروتئین‌های *BAX* و *BCL-2* قلبی را تغییر دهد و آپوپتوز قلبی را به وسیله استرس اکسیداتیو تحریک کند (۸). سمیت فلزات سنگین و تجمع آن‌ها در زنجیره‌های غذایی و نقش آن‌ها در آلودگی هوا یکی از اصلی‌ترین معضلات زیست محیطی و بهداشتی جوامع مدرن است، این آلاینده‌ها از طریق ریه‌ها وارد جریان خون شده و باعث تولید رادیکال‌های آزاد متنوعی می‌شوند که می‌توانند به بافت‌های بدن آسیب جدی به رسانند. چندین مطالعه نشان داده‌اند ایسکمی و رپرفیوژن باعث تولید رادیکال‌های آزاد (۹) شده و به تدریج باعث ترومبوز، مرگ سلولی و آسیب به عروق کرونری قلب در موش‌های نر شده است (۱۰،۱۱) رودی‌گر و همکاران نشان داده‌اند که ROSها نقش اصلی در پاتوفیزیولوژیکی بیماران قلبی دارند هم‌چنین آن‌ها پیشنهاد می‌کنند که ROSهای مختلف باعث تحریک مسیرهای سیگنالی آپوپتوزی درون سلول‌های میوکاردی می‌شود، (۱۱) در این میان  $H_2O_2$  (پراکسید هیدروژن) یکی از قوی‌ترین ROSها است که اکثر مطالعات علمی در تحقیقات آزمایشگاهی خود از آن استفاده می‌کنند.

مطالعات بیشتری نشان دادند که سطوح بالای  $H_2O_2$  (معمولاً بیشتر از ۵۰ میکرومول) باعث شروع سایتوتوکسیک در سلول‌های حیوانات، گیاهان و باکتری‌های کشت داده شده در محیط آزمایشگاه شده بود. میزان اکسیژن مصرفی توسط بدن ( $VO_2$ ) در طی تمرینات ۲۰-۱۵ برابر افزایش می‌یابد که به همان نسبت مصرف اکسیژن در میتوکندری عضلات فعال تا ۱۰۰ برابر افزایش یافته و تولید رادیکال آزاد به صورت قابل توجهی افزایش می‌یابد (۱۲) جانرو و همکاران (۱۹۹۱) نشان دادند.  $H_2O_2$  باعث آسیب جدی به سارکولمای سلول‌های قلبی می‌گردد ولی به خاطر این که کاردیومیوست‌ها توسط کاتالاز محافظت می‌شدند هیچ‌گونه آسیبی ندیدند (۱۳). قرار گرفتن مختصر سلول‌های قلبی در معرض  $H_2O_2$  می‌تواند مکانیسم‌های پاتولوژیکی را که منجر به آسیب سلولی شود، تحریک کند هم‌چنین باعث انتشار سیتوکروم c به درون سیتوزل سلول‌های قلبی نیز می‌گردد، که از این طریق

دریافت دوز یک میلی مول  $H_2O_2(H)$ ؛ گروه سوم دریافت دوز دو میلی مول  $(2H)2H_2O_2(1V)$ . گروه چهارم  $H_2O_2$  و فعالیت تمرینی منظم (HE)؛ گروه پنجم  $2H_2O_2 E$  و (2HE) به مدت هشت هفته با تردمیل در سرعت و شیب های مشخص مورد آزمون قرار گرفتند. جهت القا استرس اکسیداتیو، گروه های HE،H، توسط تزریق درون صفاقی  $H_2O_2$  با دوز  $1 \text{ mmol/kg}$  و گروه های 2H، 2HE، و تزریق درون صفاقی  $H_2O_2$  با دوز  $2 \text{ mmol/kg}$  به صورت سه بار در هفته یک روز در میان انجام شد.

#### پروتکل تمرینی

رت ها در هفته اول با سرعت  $8 \text{ m/min}$  و شیب  $10^\circ$  درجه به مدت  $30$  دقیقه بر روی تردمیل تمرین کردند، در هفته دوم با سرعت  $12 \text{ m/min}$  با شیب و زمان مشابه، در هفته سوم با سرعت  $16 \text{ m/min}$  با شیب مشابه به مدت  $45$  دقیقه و در چهارمین هفته با سرعت  $20 \text{ m/min}$  با شیب مشابه به مدت  $45$  دقیقه تمرین داده شدند. طی هفته های پنجم تا هشتم رت ها در سرعت  $20 \text{ m/min}$  با زاویه ده درجه به مدت  $60$  دقیقه هر روز تحت تمرین قرار گرفتند (17).

#### حجم نمونه و روش اندازه گیری

$24$  ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و پس از ناشتایی شبانه، نمونه برداری ها انجام شد، کلیه نمونه های بافت قلبی استخراج شده از رت ها خیلی سریع با سرم فیزیولوژیکی سرد شستشو داده و بلافاصله در داخل تانک ازت یا یخچال  $-80^\circ$  درجه سانتی گراد برای استفاده های طولانی مدت نگهداری شدند برای هموژنیزه کردن بافت مورد نظر را وزن کرده تا متناسب با آن بافر را اضافه کردیم، بافر مورد نظر برای این بافت (PBS phosphate bafer salin) می باشد، سپس مخلوط بافر و بافت را همراه با یخ توسط دستگاه هموژنایزه و طی چندین سکیل خرد شد. این مخلوط را در داخل سانتریفیوژ با دمای  $4^\circ$  درجه، دور  $12$  هزار و به مدت  $10$  دقیقه قرار داد شد. بعد از خارج کردن تیوب ها از سانتریفیوژ، محلول بالای تیوب ها (سوپرناتان) را برداشته و برای سنجش پروتئین کل آن داخل لوله های آزمایش دیگری قرار می دهیم، برای

می تواند آپوپتوز سلولی را تحریک کند (14). مطالعات نشان داده است که تزریق  $H_2O_2$  به اندازه یک میلی مول باعث غیر فعال شدن آنزیم گلیسرول آلدئید 3- فسفات دهیدروژناز شده و متعاقب آن آپوپتوز سلولی اتفاق افتاده بود. (15). هم چنین نتایج دیتینگ کواین و همکاران نشان داده است که تزریق آب اکسیژنه با دوزهای متفاوت (کمتر از یک میلی مول) باعث ایجاد آپوپتوز بلاستوسیت ها و تخریب DNA شده بود (16) با توجه به نتایج مطالعات صورت گرفته  $H_2O_2$  تولید شده در داخل سلول به تنهایی باعث بروز آپوپتوز و آسیب سلولی می گردد، بنابراین با تزریق اضافی  $H_2O_2$  بدن استرس متابولیکی بیشتری را متحمل شده لذا انتظار می رود پروتئین های پیش آپوپتوزی قلبی افزایش یابد و این که اکثر تحقیقات صورت گرفته اثرات  $H_2O_2$  تولیدی در داخل بدن را بر بافت ها بررسی کرده اند و هیچ تحقیقی در مورد تاثیر تزریق  $H_2O_2$  با دوزهای یک و دو میلی لیتر که همراه با انجام تمرین تداومی است بر روی آپوپتوز عضله قلبی صورت نگرفته است لذا این مطالعه بر آن شد تا تاثیر تمرین تداومی بر میزان پروتئینهای BAX و BCL-2 قلبی در رت های مسموم شده با آب اکسیژنه را مورد بررسی قرار دهد.

#### روش بررسی

در یک کارآزمایی تجربی با طرح پس آزمون  $50$  سر رت نر بالغ از نژاد ویستار با وزن  $20 \pm 220$  گرم و  $10-8$  هفته ای از مرکز حیوانات دانشگاه شیراز به عنوان آزمودنی تهیه و انتخاب شده و به دانشگاه علوم پزشکی کرمان انتقال یافتند. رت ها در قفس های پلی پروپیلن،  $42 \times 30 \times 16 \text{ cm}^3$  تحت شرایط استاندارد و کنترل دمایی ( $22 \pm 2^\circ \text{C}$ ) و چرخه متناوب روشنایی/ تاریکی  $12$  ساعته با دسترسی آزادانه به آب و غذا (شرکت غذای دام پارس، تهران، ایران) نگهداری شدند.

همه آزمایش های مربوط به حیوانات با توجه به دستورالعمل اخلاقی قوانین هلسینکی و مجوز معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان انجام شد. رت ها به طور تصادفی به  $5$  گروه  $n=10$  مطابق با مداخلات استرس و فعالیت تمرینی منظم به شرح زیر تقسیم شدند: گروه اول (گروه کنترل)، گروه دوم

استفاده قرار گرفت. کلیه محاسبات توسط نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد.

### ملاحظات اخلاقی

همه آزمایش‌های مربوط به حیوانات با توجه به دستورالعمل اخلاقی قوانین هلسینکی و مجوز معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان انجام شد.

### نتایج

با وجود این که میزان غلظت BAX در گروه‌های با دوز بیشتر (2H و 2HE) نسبت به گروه‌های دریافت کننده کمتر آب اکسیژنه (H و HE) کاهش یافت ولی این کاهش از لحاظ آماری معنی دار نبود ( $P=0/116$ ) (نمودار ۱) و (جدول ۱). هم چنین در میزان پروتئین BCL-2 در مقایسه بین گروهی هیچ تفاوت معنی داری مشاهده نشد ( $P=0/466$ ) (نمودار ۲) و (جدول ۱). در نسبت BAX/BCL2 نیز تفاوت معنی داری بین گروه‌ها مشاهده نشد ( $P=0/837$ ) (نمودار ۳) و (جدول ۱).

سنجش توتال پروتئین از روش استاندارد brad ford (روش رنگ سنجی) استفاده شد (۱۸). برای اندازه‌گیری میزان پروتئین‌های BAX و BCL-2 با استفاده از کیت‌های تجاری الایزا ساخت شرکت CRYSTAL DAY BIOTECH کشور چین با مشخصات E0034Ra برای پروتئین BAX و E0037 برای پروتئین BCL-2 با استفاده از طول موج ۴۵۰ نانومتر استفاده گردید.

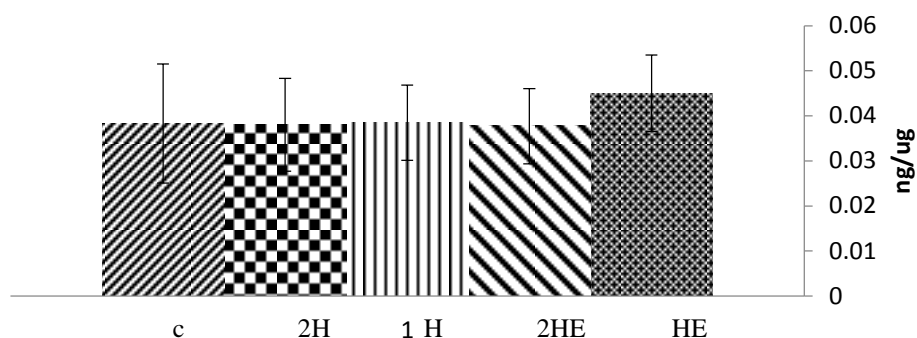
### تجزیه تحلیل آماری

از روش آمار توصیفی و استنباطی در این تحقیق استفاده شد. در بخش آمار توصیفی با استفاده از میانگین و انحراف معیار داده‌های پژوهش توصیف شدند. در بخش آمار استنباطی نیز به وسیله روش آماری تحلیل واریانس یک راهه در سطح معنی داری  $P \leq 0/05$  مورد بررسی قرار گرفت در صورت مشاهده تفاوت معنی دار، جهت تعیین محل تفاوت از آزمون تعقیبی شفه برای مقایسه تک تک گروه‌ها استفاده گردید. آزمون لوین برای یکسان سازی داده‌ها مورد

جدول ۱: نتایج آزمون آنوای یک راهه برای متغیرها در مقایسه بین گروه‌های تمرین، مسموم شده با آب اکسیژنه و گروه کنترل

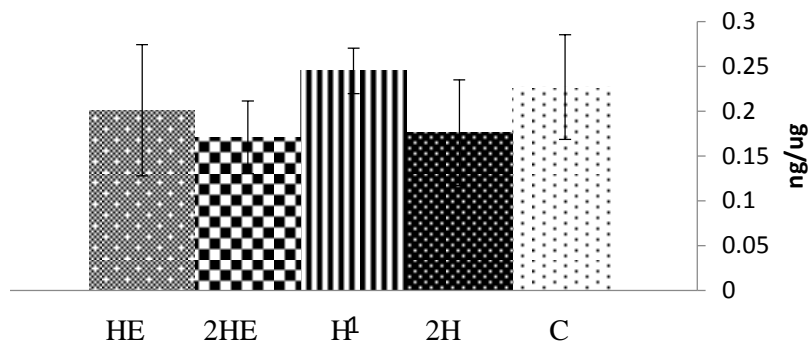
معنی داری	F	درجه آزادی	متغیر
Bax (نانوگرم بر میکروگرم)	۱/۶۵۱	۹	۰/۱۱۶
Bcl2 (نانوگرم بر میکروگرم)	۰/۹۷۷	۹	۰/۴۶۶
Bax/Bcl2	۰/۵۴۵	۹	۰/۸۳۷

### BCL2



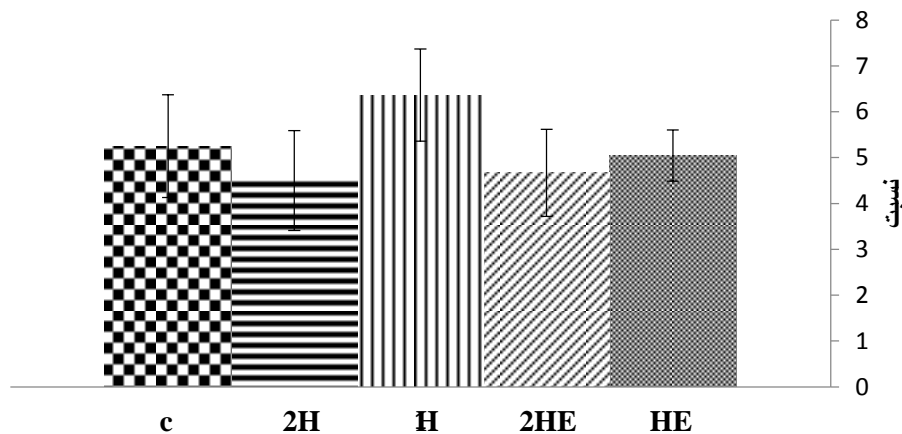
نمودار ۱: تغییرات پروتئین BAX در مقایسه بین گروه‌های تمرین و مسموم شده با آب اکسیژنه در دوزهای متفاوت

## BAX



نمودار ۲: تغییرات پروتئین BCL2 در مقایسه بین گروه های تمرین و مسموم شده با آب اکسیژنه در دوزهای متفاوت

## BAX/BCL2



نسبت BAX بر BCL2 در گروهها

نمودار ۳: تغییرات در نسبت پروتئینهای BAX/BCL2 در مقایسه بین گروه های تمرین و مسموم شده با آب اکسیژنه در دوزهای متفاوت

دو میلی لیتر آب اکسیژنه در مقایسه با تزریق یک میلی لیتر باعث کاهش بیشتری در میزان پروتئین های آپوپتوزی شده بود ولی از لحاظ آماری معنی دار نبودند. و هم چنین غلظت پروتئین BCL-2 و نسبت BAX/BCL2 نیز در همه گروه ها تقریباً مشابه بود. یکی از دلایل می تواند به اثر تمرینات استقامتی بر بیان ژن های ایجاد کننده هایپرتروفی قلبی جستجو باشد، تمرینات استقامتی باعث تغییر بیان ژن هایی از جمله سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، ATP حساس به کانال های پتاسیم، مونو آمینواکسیداز، SIRT3 میتوکندریایی

## بحث

تمرینات منظم جسمانی یکی از عوامل مهم در کاهش بیماری های قلبی عروقی به شمار می رود و باعث سازگاری عضلات قلبی نسبت به تمرین می گردد. به علاوه گزارش شده افزایش هایپرتروفی در اثر سازگاری با تمرینات استقامتی طولانی مدت رخ می دهد (۱۹). محققان یکی از دلایل آن را افزایش مقاومت سلول های میوکاردی در برابر آسیب سلولی ناشی از ایسکمی-ریپرفیوژن و تولید گونه های اکسیژن فعال ذکر کرده اند. در تحقیق حاضر تمرینات تداومی همراه با تزریق

متحمل شود و متعاقب آن میزان مرگ سلولی افزایش یابد ولی با این حال نتایج در این تحقیق از عدم تغییر معنی دار متغیرهای آپوپتوزی حکایت دارد، از دلایل تغییرات غیر معنی دار در میزان پروتئین‌های BAX و BCL-2 در گروه‌ها می‌تواند افزایش miR-499 بافت قلبی باشد به طوری که جی وانگ (۲۰۱۴) تاثیر قرار گرفتن بافت قلبی در معرض H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> با دوز ۱۰۰ میکرو مول به مدت ۶ ساعت را بر بیان ژن‌های ایجاد کننده آپوپتوزی مورد بررسی قرار دادند آن‌ها نشان دادند که H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> باعث تحریک سریع آپوپتوز میتوکندریایی از طریق افزایش بیان چهار ژن MAPKs (*JNK*، *ERK* (mitogen activated protein kinas) و *P38*) می‌گردد. بنابراین این عوامل باعث فسفوریلاسیون c-Jun شده و آن نیز باعث افزایش بیش تنظیمی ژن *miR-499* می‌شود، *miR-499* از افزایش ژن‌های آپوپتوزی *PCD4* و *Pacs2* که فعال کننده ژن *BAX* هستند جلوگیری می‌کند (۳۰) با توجه به تحقیق حاضر و هم چنین به خاطر این که غلظت‌های بیشتر H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> باعث افزایش بیشتر *miR-499* می‌گردد تا حدودی انتظار می‌رود کاهش بیشتر گروه‌های دریافت کننده دو میلی لیتر آب اکسیژنه آپوپتوز قلبی کمتری را تجربه کنند. نینگ لیوی و همکاران (۲۰۱۷) تاثیر قرار گرفتن بافت قلبی خارج شده از موش در معرض قرار گرفتن در آب اکسیژنه را مورد بررسی قرار دادند نتایج نشان داد که *miR-135a* باعث افزایش آپوپتوز سلول‌های قلبی شده و با سرکوب این ژن بیان پروتئین BCL-2 افزایش یافته در نتیجه از بروز آپوپتوز میوکاردی جلوگیری می‌شود (۳۱)، این نتایج با یافته‌های تحقیق حاضر در تضاد است دلیل احتمالی آن می‌تواند مربوط به قرارگیری مستقیم بافت قلبی در معرض آب اکسیژنه و غلظت آن باشد. تحقیق مشابه توسط کالوسی و همکاران (۲۰۰۰) انجام گردید که نشان داد H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> و رادیکال آزاد اکسیژن باعث ظهور سیتوکروم c در سیتوزول میتوکندری شده بود و آن نیز باعث افزایش فعالیت CPP32 می‌گردد در نتیجه باعث تحریک آپوپتوز قلبی خواهد شد (۳۲). پروتئین‌های BCL-2 که به عنوان پروتئین‌های ضد آپوپتوزی عمل می‌کنند یک پارچگی

می‌شود که متعاقب آن باعث کاهش تحریک آپوپتوز و بسیاری از صدمات میتوکندری می‌گردد، شواهد تجربی نشان می‌دهد افزایش بیان ژن SOD2 میتوکندری نقش مهمی در جلوگیری از آسیب‌های قلبی در ورزش دارد (۲۰). در هر مرحله از مرگ سلولی، سلول با توجه به ماهیت تحریکات و خصوصیات و محتویات سلولی و محیط پیرامون خود تصمیم می‌گیرد که کدام مسیر را به کار گیرد ولی بسیاری از این مسیرها در تعامل با هم بوده و از تنظیم کننده‌های مولکولی و مکانیسم‌های بیوشیمیایی مشترکی استفاده می‌کنند. (۲۱) به عنوان مثال انجام تمرینات استقامتی به تنهایی باعث افزایش رادیکال‌های آزاد شده و احتمالاً در کوتاه مدت باعث افزایش آپوپتوز گردد ولی اگر به صورت منظم و تداومی انجام گیرد باعث افزایش فعالیت مسیر AKT/MTOR شده فرایند سنتز پروتئین را تحریک کند (۲۲،۲۳). به علاوه فعالیت بدنی منظم به عنوان یک عامل جبران کننده آپوپتوز میوسیت‌ها تلقی می‌شود (۲۴،۲۵) در این زمینه سانگ و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند که یک برنامه تمرین دویدن ۱۲ هفته‌ای روی تردمیل باعث کاهش بیان BAX در عضله دوقلوی رت‌های پیر می‌شود (۲۶). سطوح BCL-2 در جوندگان تمرین کرده افزایش یافت که به کاهش نسبت BAX به BCL-2 منجر می‌شود. به علاوه شکسته شدن کاسپاز-۳ در رت‌های پیر بعد از تمرین ورزشی کاهش یافت. در نتیجه مقدار قطعه قطعه شدن DNA آپوپتوزی تا حد چشم‌گیری توسط ورزش جبران شد و سطوح آن به مقادیر مشابه با سطوح آپوپتوزی حیوانات جوان رسید این تغییرات با افزایش سطح مقطع تار عضلانی و کاهش فضای برون سلولی در بین میوسیت‌ها همراه بود (۲۷). تزریق H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> باعث تحریک آپوپتوز از طریق افزایش بیان ژن‌های CASPASE و P53 می‌شود که فعالیت این مسیر می‌تواند به وسیله BCL-2 کاهش یابد (۲۸)، به خاطر اینکه سیستم انرژی بافت میوکاردی به صورت کاملاً هوازی تامین می‌شود بنابراین در زنجیره انتقال الکترونی الکترون‌های بیشتری تولید شده (۲۹) و با تزریق آب اکسیژنه اضافی رادیکال‌های آزاد افزایش یافته انتظار می‌رفت که بافت میوکاردی آسیب بیشتری را

ترکیبات غشای سلولی شده بود (۳۵) در تحقیق حاضر به گروه های (H,HE) آب اکسیژنه یک ساعت قبل از تمرین تزریق شده بود. لذا به خاطر اینکه انجام تمرینات استقامتی خود باعث تشکیل رادیکال های آزاد از جمله H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> می‌گردد با تزریق H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> اضافی به موش ها قلب استرس متابولیکی بیشتری را متحمل می‌گردد در نتیجه بافت قلبی به شدت آسیب می‌بیند ولی در اثر انجام تمرینات طولانی مدت، سازگاری با این شرایط اتفاق می‌افتد تا هموستاز رادیکال های آزاد تولید شده دریافت میوکاردیوم را برقرار نماید و این کار را از طریق تعادل بین میزان بیان پروتئینهای آپوپتوزی (BAX) و ضد آپوپتوزی (BCL-2) جبران می‌نماید (۳۶).

### نتیجه گیری

با توجه به تحقیقات صورت گرفته به نظر می‌رسد اگر تمرینات استقامتی همراه با تزریق دوزهای یک و دو میلی لیتر آب اکسیژنه همراه باشد تاثیری بر میزان پروتئین های BCL-2 و BAX ندارد و در اثر سازگاری با تمرین و تزریق H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> به مدت طولانی احتمالاً بافت قلبی تحت تاثیر آپوپتوز قلبی قرار نگیرد.

### سپاسگزاری

این مطالعه بخشی از رساله دکتری در رشته فیزیولوژی ورزشی بوده که در گروه فیزیولوژی ورزشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی مورد تصویب قرار گرفته است. نویسندگان از پرسنل محترم دانشگاه علوم پزشکی کرمان، خانم نعیمه محسنی زاده و آقای مهدی پیروز که با همکاری ایشان مطالعه حاضر به پایان رسید ضمناً این مطالعه حامی مالی ندارد، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

**تعارض در منافع:** تعارض منافع وجود ندارد

غشای میتوکندری را حفظ می‌کنند و آزاد شدن سیتوکروم c به درون سیتوزول و در نتیجه فعال شدن 3 CASPASE را تنظیم می‌کنند. کای لو و همکاران (۲۰۱۵) ثابت کردند که انجام تمرینات استقامتی به مدت ۸ هفته باعث کاهش آپوپتوز قلبی موشها از طریق افزایش غلظت آنزیم های سوپراکسید دیس‌موتاز و گلوکاتایون پراکسیداز (GPx) و کاهش غلظت مالونیل دی‌آلدئید می‌گردد هم چنین نشان دادند که انجام تمرینات استقامتی و HIIT باعث افزایش بیان ژن های *PI3k*, *Akt*, *P38mapk*, *AMPK* که هر کدام در سنتز بافت قلبی و ایجاد کننده هایپرتروفی درگیر هستند، می‌گردد (۳۳). به خاطر این که در این تحقیق انجام تمرینات به مدت طولانی انجام گردید یک سازگاری در قلب ایجاد شده بنابراین با توجه به مطالعات صورت گرفته تعادلی بین تجزیه و سنتز بافتی برقرار خواهد شد تا از به روز آسیب قلبی جلوگیری شود که این دلایل تا حدی می‌تواند عدم تغییر معنی دار در مقدار پروتئین های BCL2, BAX را نسبت به گروه کنترل توجیه کند هم چنین نشان داده شده تزریق رادیکال های آزاد به مدت طولانی باعث سازگاری در بافت گردد.

به طوری که زی سولک راداک و همکاران (۲۰۰۰) نشان دادند که تزریق H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> با دوز پایین به صورت مزمن باعث فعال شدن آنزیم های پپتیداز، کمپلکس پروتئوزوم و DT-diaphorase شده و متعاقب آن باعث تجمع پروتئین های کربونیل نسبت به حالت استدی استیت در میوکاردیوم قلبی گردد (۳۴). در این باره جانرو و همکاران (۱۹۹۱) نشان دادند که H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> باعث آسیب جدی به سارکولمای سلول های قلبی می‌گردد ولی به خاطر این که کاردیومیوست ها توسط کاتالاز محافظت می‌شوند هیچ گونه آسیبی ندیده بودند و هیچ گونه تاثیر معنی داری بر محتوای پروتئین ها و فسفو لیپید های غشای کاردیومیوسیت ها نداشت اما باعث تغییر معنی داری در



## References:

- 1-Von Harsdorf R, Li P-F, Dietz R. *Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis*. Circulation 1999; 99(22): 2934-41.
- 2-Xie J, Zhou X, Hu X, Jiang H. *H2O2 evokes injury of cardiomyocytes through upregulating HMGB1*. Hellenic J Cardiol 2014; 54: 101-6.
- 3-nabiyuni T, parivar R, divsalar F. *effects of honey bee poison on leukemia lymphoblastic cancer cells*. kashan J faze med sci. 2012; 16(2): 7-121. [persian]
- 4-Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. *Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition*. Cell 2000; 102(1): 33-42.
- 5-Ghavami S, Hashemi M, Kadkhoda K, Alavian SM, Bay GH, Los MJ. *Apoptosis in liver diseases- detection and therapeutic applications*. Med Sci Monitor 2005; 11(11): RA337-RA45.
- 6-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 Physio 1985; 105(6): 1934-43.
- 7-Quindry JC, Miller L, McGinnis G, Kliszczewicz B, Irwin JM, Landram M, et al. *Ischemia reperfusion injury, KATP channels, and exercise-induced cardioprotection against apoptosis*. J Applied Physiology 2012; 113(3): 498-506.
- 8-Eisenberg A, Bialik S, Simon HU, Kimchi A. *Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them*. journal of Cell Death & Differentiation. 2009; 16(7): 966-75.
- 9-Smith T, Rana RS, Missiaen P, Rose KD, Sahni A, Singh H, et al. *High bat (Chiroptera) diversity in the Early Eocene of India*. Naturwissenschaften 2007; 94(12): 1003-9.
- 10- KaraM, ozchaghli E, Jannuzzi AT, Alpertunga B. *Oxidative stress mediated cardiac apoptosis*. Istanbul J Pharmacy. 2015; 45(2): 217-32.
- 11- Powers SK, Smuder AJ, Kavazis AN, Quindry JC. *Mechanisms of exercise-induced cardioprotection*. Physio 2014; 29(1): 27-38.
- 12- Amri F, Ghouili I, Amri M, Carrier A, Masmoudi-Kouki O. *Neuroglobin protects astroglial cells from hydrogen peroxide induced oxidative stress and apoptotic cell death*. J neurochemistry 2017; 140(1): 151-69.
- 13- Janero DR, Hreniuk D, Sharif HM. *Hydrogen peroxide induced oxidative stress to the mammalian heart muscle cell (cardiomyocyte): Lethal peroxidative membrane injury*. J cellular physio 1991; 149(3): 347-64.
- 14- Kim R, Emi M, Tanabe K. *Role of mitochondria as the gardens of cell death*. Cancer chemotherapy and pharmacology 2006; 57(5): 545-53.
- 15- Qian D, Li Z, Zhang Y, Huang Y, Wu Q, Ru G, et al. *Response of mouse zygotes treated with mild hydrogen peroxide as a model to reveal novel mechanisms of oxidative stress-induced injury in early embryos*. Oxid Med Cell Longev 2016; 2016.



- 16- Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen Ø. *Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training*. Eur J Cardiovas Prev Rehabil 2007; 14(6): 753-60.
- 17- valipour NR, ahmadzadeh M. *determination of protein concentraion using brad ford microplate protein quantification assay*. inter electronic j med 2015; 4(1).
- 18- seene T, Kaasik P. *Skeletal Muscle Adaptation to Endurance Exercise: Fibre Type Peculiarities*. Austin Sports Med. 2017; 2(2): 1020.
- 19- 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 Cardiovas Dis 2013; 23(6): 566-73.
- 20- Montazeri F, Rahgozar S, Gaemi K. *apoptosis and cytoplasmic organelles*. Genetics In The 3rd Millennium 2011; 9(1): 2300-12. [persian]
- 21- Wang J, Jia Z, Zhang C, Sun M, Wang W, Chen P, et al. *miR-499 protects cardiomyocytes from H2O2-induced apoptosis via its effects on Pdc4 and Pacs2*. RNA Biology 2014; 11(4): 339-50.
- 22- Zuzanna Kazior, Sarah J, Willis, Marcus Moberg, William Apro, Jose AL. Calbet, Hans-Christer Holmberg, and Eva Blomstrand *Endurance Exercise Enhances the Effect of Strength Training on Muscle Fiber Size and Protein Expression of Akt and mTOR* J pone 2016; 11(2).
- 23- Marzetti E, calvin R. Bernabei R, Leeuwenburgh C. *Apoptosis in skeletal myocytes: a potential target for interventions against sarcopenia and physical frailty-a mini reviw*e. Gerontology 2012; 58(2): 99-106.
- 24- Leonardo Maximo Cardoso a, Debora Simoes de Almeida Colombari b, Jose Vanderlei Menani b, Deoclecio Alves Chianca Jrc, Eduardo Colombari. *Cardiovascular responses produced by central injection of hydrogen peroxide in conscious rats*. Brain Res Bulletin 2006; 71: 37-44.
- 25- Ghavami S, Hashemi M, Kadkhoda K, Alavian SM, Bay GH, Los MJ. *Apoptosis in liver diseases-detection and therapeutic applications*. Med Sci Monitor 2005; 11(11): RA337-RA45.
- 26- Marzetti E, privitera G, Simili V, Wohlegemuth SE, et al. *multiple pathways to the same end:mechanisms of myonuclear apoptosis in sarcopenia of aginig*. scientific world J 2010; 10: 340-9.
- 27- Zsolt Radak, Sasvari M, Nyakas C, Pucsok J, Nakamot H, Goto S. *Exercise Preconditioning against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Damage in Proteins of Rat Myocardium*. Biochemistry and Biophysics 2000; 376(2): 248-251.
- 28- Anderson EJ, Lustig ME ,Boyle KE, Woodlief TL, Kane DA, Lin CT, et al. *Mitochondrial H2O2 emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans*. J clin Inves 2009; 119(3): 573-81
- 29- Lu K, Wang L, Wang C, Yang Y, Hu D, Ding R. *Effects of high-intensity interval versus continuous moderate intensity aerobic exercise on apoptosis, oxidative stress and metabolism of the*

- infarcted myocardium in a rat model*. Mol Med Rep 2015; 12(2): 2374-82.
- 30- Liu N, Shi YF, Diao HY, Li YX, Cui Y, Song XJ, et al. *MicroRNA-135a Regulates Apoptosis Induced by Hydrogen Peroxide in Rat Cardiomyoblast Cells*. Int J bio sci 2017; 13(1): 13-21.
- 31- Colussi C, Albertini M, Coppola S, Rovidati S, Galli F, Ghibelli L. *H2O2-induced block of glycolysis as an active ADP-ribosylation reaction protecting cells from apoptosis*. The FASEB J 2000; 14(14): 2266-76.
- 32- Lu K, Wang L, Wang C, Yang Y, Hu D, Ding R. *Effects of high-intensity interval versus continuous moderate intensity aerobic exercise on apoptosis, oxidative stress and metabolism of the infarcted myocardium in a rat model*. Mol Med Rep 2015; 12(2): 2374-82.
- 33- Lu K, Wang L, Wang C, Yang Y, Hu D, Ding R. *Effects of high-intensity interval versus continuous moderate intensity aerobic exercise on apoptosis, oxidative stress and metabolism of the infarcted myocardium in a rat model*. Mol Med Rep 2015; 12(2): 2374-82.
- 34- Zsolt Radak, Sasvari M, Nyakas C, Pucsok J, Nakamot H, Goto S. *Exercise Preconditioning against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Damage in Proteins of Rat Myocardium*. Biochemistry and Biophysics 2000; 376(2): 248-251.
- 35- janero DR, Hreniuk D, Sharif HM. *Hydrogen peroxide induced oxidative stress to the mammalian heart muscle cell (cardiomyocyte): Lethal peroxidative membrane injury*. J cellular physio 1991; 149(3): 347-64.
- 36- Salakou S1, Kardamakis D, Tsamandas AC, Zolota V, Apostolakis E, Tzelepi V. *Increased Bax/Bcl-2 ratio up-regulates caspase-3 and increases apoptosis in the thymus of patients with myasthenia gravis*. In Vivo 2007; 21(1): 123-32

## Effects of continues exercise on BAX and BCL-2 heart proteins following by different dos of H2O2 consumption in rat male

Samad Safarzadeh Gargari<sup>\*1</sup>, Hassan Matin Homai<sup>2</sup>, Mohammad Ali Azarbayjani<sup>3</sup>

### Original Article

**Introduction:** The research has been indicated that reactive oxygen species induced the apoptosis of cardiomyocytes. However, this mechanism has been unclear. The aim of this study was to investigate the effects of concurrent training on some of the heart apoptosis variables (BAX,BCL-2) following by the injection of different H2O2 dose in Wistar rat males.

**Methods:** 50 male rats were randomly assigned to 5 groups with 10 rats in which group. Groups included: group (1): control group (C), group (2, 3): injection of 1 and 2ml H2O2, group (4,5): exercise and injection of 1 and 2 ml H2O2. Exercise groups have been run on treadmill for four days during 8 weeks at moderate intensity. 24 hr after the last exercise and in anesthetic state all rats have been knocked out to determine bax and bcl2 proteins ratio. For measuring the BAX and BCL-2 proteins were used by ELISA technic and total protein were determined by brad ford technic. Data were analyzed by SPSS 17, one ways ANOVA was used to analysis of data at the level of  $p \leq 0/05$ .

**Results:** The results have been indicated that after two month continues training no significant difference in BAX, BCL-2 proteins and BAX/BCL2 ratio in exercise and H2O2 groups in compared by control groups.

**Conclusion:** based on the result of this study if the 8-week continues training has been followed by H2O2 injection with both of one and two ml H2O2 concentration, it may not have induced apoptosis cardio myocyte in rats. And it may adjusted the synthesis and degradation myocardial

**Keywords:** Cardiac cell apoptosis , BAX protein, BCL-2 protein, H2O2, Continues exercise, Rat.

**Citation:** Safarzadeh Gargari S Homai M, Mousavi Z. **Effects of continues exercise on BAX and BCL-2 heart proteins following by different dos of H2O2 consumption in rat male.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2018; 26(4): 363-73.

<sup>1</sup>Department. of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Science, Islamic Azad University Central Tehran Branch, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Department. of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Science Islamic Azad University Central Tehran Branch, Tehran, Iran

<sup>3</sup>Department. of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Science Islamic Azad University Central Tehran Branch, Tehran, Iran

\*Corresponding author: Tel: 09149913126, email:safarzadeh.gargari@yahoo.com