

Combined Effect of Aerobic Exercise and Crocin Supplementation on the Prevention of Myocardial Tissue Cell Death in Male Wistar Rats

Sepideh Poursadeghi¹ , Majid Kashef¹ , Fereshteh Shahidi¹ , Elham Vosadi^{2*} 

¹ Dept of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, Shahid Rajaei Teacher Training University, Tehran, Iran
² Dept of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, Shahrood University of Technology, Semnan, Iran

Article Info

Article type:
Research article

Article History:
Received: 04 December 2021
Revised: 22 April 2022
Accepted: 14 May 2022
Published Online: 23 November 2022

*** Correspondence to:**
Elham Vosadi
Dept of Exercise Physiology,
Faculty of Physical Education and
Sports Sciences, Shahrood Uni-
versity of Technology, Semnan,
Iran.
Email: e.vosadi@yahoo.com

ABSTRACT

Introduction: Oxidative stress-induced cell death is activated by free radicals. Exercise and nutrition appear to have the potential to modulate cell proliferation and death. This study aimed to evaluate the combined effect of aerobic exercise and crocin consumption on the prevention of myocardial tissue cell death in male Wistar rats.

Material & Methods: In this experimental study, 36 male Wistar rats with a mean weight of 180-200g were randomly divided into six groups (oxygenated water, oxygenated water+crocin, oxygenated water+exercise, oxygenated water+crocin+exercise, sham, and control). After two weeks of familiarity with the environment and learning the exercises, the training groups were given aerobic exercises for six weeks. All groups, except for the sham and control, were given 1 mM H₂O₂ and subcutaneously injected with 12.5 mg crocin. 48 hours after the last training session, the rats were anesthetized with CO₂ after 10-12 hours of fasting, and their myocardial tissue was isolated. To measure the pro-apoptotic genes, Real-Time PCR was used; moreover, one-way analysis of variance and Scheffe post-Hoc test were employed for data analysis. A P-value of ≥ 0.05 was considered statistically significant. (Ethical code: IR.SSRI.REC.1397.254)

Findings: The findings showed that six weeks of aerobic training in water, consumption of crocin supplementation, as well as the combination of aerobic exercise and crocin supplementation, reduced the expression of the genes of the internal apoptotic pathway at a significant level of ≤ 0.05 .

Discussion & Conclusion: According to the results of the present study, it seems that the interaction and combination of aerobic exercise in water and crocin antioxidant supplement should be used to reduce the apoptosis of the myocardial tissue, less cell damage, and ultimately the health of the myocardial tissue.

Keywords: Aerobic exercise, Crocin supplement, Myocardial cell death, Pro-apoptotic genes

➤ How to cite this paper

Poursadeghi S, Kashef M, Shahidi F, Vosadi E. Combined Effect of Aerobic Exercise and Crocin Supplementation on the Prevention of Myocardial Tissue Cell Death in Male Wistar Rats. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2022;30(5): 101-111.



اثر ترکیبی تمرین هوازی و مصرف کروسین بر پیشگیری از مرگ سلولی بافت عضله قلب در رت های نر نژاد ویستار

سپیده پورصادقی^۱ ID، مجید کاشف^۱ ID، فرشته شهیدی^۱ ID، الهام وسدی^{۲*} ID

^۱ گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی، تهران، ایران

^۲ گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه صنعتی شاهرود، سمنان، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۱۳

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۱/۰۲/۰۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۲۴

تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۰۹/۰۲

نویسنده مسئول:

الهام وسدی

گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده

تربیت بدنی و علوم ورزشی،

دانشگاه صنعتی شاهرود، سمنان،

ایران.

Email: e.vosadi@yahoo.com

مقدمه: مرگ سلولی ناشی از استرس اکسیداتیو توسط رادیکال های آزاد فعال می گردد که به نظر می رسد فعالیت ورزشی و تغذیه توانایی دارند که مرگ سلولی را تعدیل می کنند. هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر ترکیبی تمرین هوازی و مصرف کروسین بر پیشگیری از مرگ سلولی بافت عضله قلب در رت های نر نژاد ویستار بود.

مواد و روش ها: در پژوهش تجربی حاضر، تعداد ۳۶ سر رت نر نژاد ویستار با میانگین وزنی ۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم به طور تصادفی به شش گروه ۶تایی (آب اکسیژنه، آب اکسیژنه+کروسین، آب اکسیژنه+تمرین، آب اکسیژنه+کروسین+تمرین، شم و کنترل) تقسیم شدند. پس از دو هفته آشنا سازی با محیط و یادگیری تمرین، گروه های تمرینی برای شش هفته به تمرین هوازی در آب پرداختند. به همه گروه ها به جز شم و کنترل، به میزان ۱ میلی مول H₂O₂ و به گروه های مکمل ۱۲/۵ میلی گرم کروسین به صورت زیر صفاقی تزریق گردید. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، رت ها پس از ۱۰ تا ۱۲ ساعت ناشتایی، با استفاده از گاز CO₂ بیهوش شدند و بافت قلب آن ها جدا گردید. برای اندازه گیری ژن های پروآپتوتیک از روش Real Time PCR، برای تجزیه و تحلیل داده ها از آزمون تحلیل واریانس یک راهه و آزمون تعقیبی شفه در سطح معنی داری P≤0.05 استفاده شد.

یافته ها: یافته های تحقیق نشان داد که شش هفته تمرین هوازی در آب، مصرف مکمل کروسین و همچنین ترکیب تمرین هوازی و مکمل کروسین باعث کاهش بیان ژن های مسیر داخلی آپوپتوزی در سطح معنی داری P≤0.05 گردید.

بحث و نتیجه گیری: با توجه به نتایج مطالعه حاضر به نظر می رسد، برای کاهش آپوپتوز بافت قلب، آسیب کمتر سلولی و در نهایت سلامت بافت قلب، از تعامل و ترکیب تمرین هوازی در آب و مکمل آنتی اکسیدانی کروسین استفاده شود.

واژه های کلیدی: تمرین هوازی، ژن های پروآپتوتیک، مرگ سلولی عضله قلب، مکمل کروسین

← **استناد:** پورصادقی، سپیده؛ کاشف، مجید؛ شهیدی، فرشته؛ وسدی، الهام. اثر ترکیبی تمرین هوازی و مصرف کروسین بر پیشگیری از مرگ سلولی بافت

عضله قلب در رت های نر نژاد ویستار. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، دی ۱۴۰۱؛ ۳۰(۵): ۱۱۱-۱۰۱.

استرس اکسیداتیو نقش مهمی در توسعه بیماری های قلبی ایفا می کند که با افزایش سطوح گونه های اکسیژن فعال (oxygen species Reactive) همراه است (۱). در وضعیت اکسیداتیو مطلوب، میان دستگاه دفاع آنتی اکسیدانی و ROS تعادل برقرار است؛ اما اگر تعادل اکساینده ها و ضد اکساینده ها از بین برود، با تأثیر بر اکسایش درون سلولی، باعث بیماری ها و مرگ زودرس سلول می شود (۲)، به طوری که سلول های قلب به علت فعالیت اکسیداتیو مداوم و قابلیت تکثیر محدود، بیشتر از بافت های دیگر در معرض آسیب ناشی از تولید رادیکال های آزاد قرار می گیرند (۳).

ROSها نقش اصلی در پاتوفیزیولوژیکی بیماران قلبی دارند و باعث تحریک مسیرهای سیگنالی آپوپتوزی درون سلول های میوکاردی می گردند. در این میان، H₂O₂ (پراکسید هیدروژن) یکی از ROSها است که در بیشتر مطالعات علمی، در تحقیقات آزمایشگاهی از آن استفاده می شود. پراکسید هیدروژن ترکیبی فعال است که در غلظت های بالا به آسیب و مرگ سلولی از طریق سازوکارهایی مانند پراکسیداسیون لیپیدی و تغییر پروتئین های سلولی منجر می گردد (۴).

مرگ سلولی اغلب از طریق دو مسیر داخل و خارج سلولی رخ می دهد. مسیر خارجی به واسطه گیرنده های اختصاصی موجود در سطح سلول به نام گیرنده های مرگ (Death receptor) فعال می گردد (۵)، در حالی که مسیر داخلی به عنوان مهم ترین مسیر ایجاد آپوپتوز، با تغییراتی در نفوذپذیری غشای خارجی میتوکندری و آزادسازی عوامل آپوپتوزی همراه است (۶). در این مسیر، میتوکندری ها نقش مهمی در تنظیم مرگ سلولی به عهده دارند که حاوی تعدادی پروتئین تحت عنوان پروتئین های پیش آپوپتوزی هستند. افزایش بیان و جابه جایی این پروتئین ها به طرف میتوکندری، با کاهش پایداری غشای بیرونی میتوکندری همراه است که می تواند به رهایش مولکول های پیش آپوپتوزی مانند

عامل القاکننده آپوپتوز (Apoptosis inducing factor) و سیتوکروم C از فضای میان دو غشای میتوکندری به داخل سیتوپلاسم آزاد منتج شود. در این میان، سیتوکروم C با Apaf-1، ATP و پروکاسپاز ۹ تعامل می کند و سبب فعال شدن کاسپاز ۹ به عنوان کاسپاز آغازگر آپوپتوز در مسیر میتوکندریایی می گردد. این روند در نهایت موجب فعال سازی کاسپاز ۳ به عنوان کاسپاز اجرایی و فصل مشترک همه مسیرهای آپوپتوزی می شود. کاسپازها پس از فعال شدن، بسیاری از پروتئین های حیاتی و سلولی را هیدرولیز و تجزیه می کنند و باعث ورود سلول به مرحله غیرقابل برگشت مرگ سلولی می گردند (۸، ۷)؛ از این رو، محققان ورزشی درصدد آن هستند که به شیوه های مختلفی از بروز استرس اکسیداتیو و آسیب های مربوط به آن جلوگیری کنند و یا این آسیب ها را به حداقل برسانند (۹). در میان شیوه های مختلف، ورزش منظم به عنوان یک برنامه درمانی عمده در درمان و پیشگیری از بیماری های قلبی-عروقی مطرح است و به کاهش عوارض این بیماری ها منجر می گردد (۱۰). ورزش و تمرین با توجه به نوع و شدت آن می تواند موجب تأثیر مثبت بر فیزیولوژی و مورفولوژی بافت قلب از جمله قدرت انقباض میوکارد، افزایش اندازه حفره بطن چپ، ضخامت دیواره و افزایش توده قلب شود که به عنوان «قلب ورزشکار» شناخته می گردد (۱۱). در مطالعات نشان داده شده است که تمرین ورزشی آپوپتوز را همراه با بهبود ظرفیت آنتی اکسیدانی کاهش می دهد. تمرینات منظم هوازی عملکرد میتوکندریایی را با کاهش سطح گونه های اکسیژن (ROS) و بیوژنز میتوکندریایی تقویت می کند و باعث افزایش ذخیره گلیکوژن و ساخت زنجیره انتقال الکترون می شود (۱۲). همسو با این موضوع، هوانگ و همکاران (۲۰۱۲) عنوان کردند که ۱۲ هفته تمرین هوازی موجب کاهش معنی دار بیان کاسپاز ۹ در موش های تمرین کرده می گردد (۱۳).

در این میان، ورزش شنا به عنوان درمان غیردارویی

برای فشارخون بالا، چاقی و بیماری های قلبی عروقی تجویز شده است؛ زیرا سطح سیتوکین های التهابی را بدون ایجاد استرس اکسیداتیو کاهش می دهد (۱۴)، باعث کاهش تولید ROS و افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی می شود و می تواند آسیب اکسایشی به پروتئین ها و یا DNA در عضله اسکلتی و مغز موش های صحرایی را تضعیف کند (۱۵). علاوه بر این ها، ورزش شنای منظم مزایای بیشتری نسبت به فعالیت های دیگر از جمله دویدن روی تردمیل دارد که از جمله مزایای آن می توان به مقدار کار بیشتر در طول شنا نسبت به فعالیت روی تردمیل با مدت زمان مشابه و بی نیاز به تحمل وزن و فشار کمتر بر مفاصل اشاره کرد (۱۶). از سوی دیگر، محیط آبی درگیری و فعالیت گروه های عضلانی بزرگ تر برای غلبه بر مقاومت و درگیری هر دو اندام فوقانی و تحتانی با دامنه حرکتی را به همراه دارد (۱۷). همسو با این نظر، حبیبی و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که هشت هفته فعالیت ورزشی شنا موجب کاهش آپوپتوز در بافت قلب موش های صحرایی شد (۱۸)؛ همچنین محقق دیگری در مطالعه خود نشان داد، یک سال فعالیت ورزشی منظم شنا باعث بهبود دفاع آنتی اکسیدان در قلب رت های مسن (۲۱) ماهه) گردید (۱۹). نو و همکاران (۲۰۲۰) در مطالعه ای، به بررسی تأثیر ۸ هفته فعالیت ورزشی پرداختند. نتایج نشان داد که فعالیت ورزشی منظم کاهش نشانگرهای سیگنالینگ آپوپتوتیک با کاهش کاسپاز ۳ و آپوپتوز ناشی از میتوکندری را در عضلات قلب رت ها به همراه داشت (۲۰). اولو و همکاران (۲۰۲۱) به بررسی تأثیر ۱۲ هفته فعالیت ورزشی شنا پرداختند که هیچ تغییری در بیان ژن درباره نشانگرهای بازسازی پاتولوژیک، آپوپتوز و فرایند التهاب در حیوانات آزمایشگاهی یافت نشد (۲۱)؛ همچنین شواهد فراوانی نشان می دهد، تحت شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک، آنتی اکسیدان های درون زاد نمی توانند به طور کامل از آسیب اکسایشی جلوگیری کنند؛ به همین سبب، طی سال های اخیر استفاده از مکمل های آنتی اکسیدانی برای افزایش توان دفاع ضد اکسایشی و کاهش

آسیب های اکسایش در فعالیت های بدنی مطالعه شده که به علت عوارض کمتر مکمل های طبیعی نسبت به مکمل های سنتتیک، توجه بیشتری به این مکمل ها شده است (۲۲، ۲۳). مکمل های آنتی اکسیدانی ترکیباتی هستند که موجب غیرفعال شدن رادیکال های آزاد می شوند؛ همچنین می توانند غشاهای سلولی و اندامک های درون غشایی را در مقابل اکسیدان ها محافظت کنند (۲۴). از میان مکمل های طبیعی می توان به زعفران و البته ماده مؤثر آن، کروسین اشاره کرد که خاصیت آنتی اکسیدانی بسیار قوی دارد. کروسین برای اندام های مختلف مانند دستگاه عصبی، دستگاه گوارش، قلب و عروق، تناسلی، غدد درون ریز و دستگاه ایمنی بدن سودمند است؛ همچنین زعفران و کروسین در پیشگیری از آسیب اکسیداتیو ناشی از ایسکمی برقراری مجدد خون در موش های صحرایی مفید است (۲۵). دیانت و رادان (۲۰۲۱) در مطالعه ای، به بررسی عملکرد کروسین بر نارسایی قلب پرداختند. یافته ها تأیید می کند که کروسین یک عامل پیشگیرانه و درمانی قوی برای کاهش التهاب و آسیب اکسیداتیو در شرایط مربوط به مشکلات قلبی ریوی است (۲۶). عبدالکریم و همکاران (۲۰۲۱) در پژوهش خود به بررسی اثر مصرف کروسین بر عملکرد قلب رت ها پرداختند و به این نتیجه رسیدند که مصرف پانزده روز کروسین شاخص های استرس اکسیداتیو را کاهش می دهد (۲۷). مرادی و همکاران (۲۰۱۹) به بررسی تأثیر تمرینات شنا و مصرف کروسین بر مسیر آپوپتوز ذاتی در رت ها پرداختند و نشان دادند، مصرف کروسین همراه با تمرین می تواند بر آپوپتوز تأثیرگذار باشد و از آن جلوگیری کند (۲۸). در مطالعه حسن پور و همکاران (۲۰۱۷)، به بررسی همزمان فعالیت ورزشی و مصرف مکمل کروسین بر ژن های پرو آپوپتوتیک پرداخته شد و نتایج بیانگر افزایش بیان ژن Bcl-2 و کاهش بیان ژن P53 در بافت قلب در اثر تمرین استقامتی همراه با مصرف کروسین بود (۲۹). از آنجا که شواهد نشان می دهد، تحت شرایط

به صورت آموزش و تمرین برگزار گردید. مرحله آموزش شامل هفته اول بود که رت ها به مدت ۱۰ دقیقه در یک مخزن استاندارد (۱۴۰×۶۰×۴۵ سانتی متر) با درجه حرارت آب ۳۳ تا ۳۶ درجه سانتی گراد فعالیت داشتند؛ سپس مرحله تمرین در آب در نهایت به مدت ۶۰ دقیقه در روز و ۵ روز در هفته (در مجموع به مدت ۶ هفته) در پایان دوره رسید (۳۰). در همین زمان، گروه شم و گروه کنترل فعالیت ورزشی را انجام نمی دادند؛ اما تزریق سرم سالین در گروه شم انجام می گرفت. به گروه های فشار اکسیداتیو به میزان ۱ میلی مول بر کیلوگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، H₂O₂ یک روز در میان به شکل زیر صفاقی، به علت جذب سریع تر در سمت راست رت ها، ۳۰ دقیقه پیش از تمرین تزریق شد (۳۱). تزریق کروسین با خلوص ۹۸ درصد، روزانه با سرنگ انسولین در ناحیه صفاق ۱۲/۵ میلی گرم بر کیلوگرم با ۵ سی سی آب مقطر رقیق شده به علت جذب سریع تر، در گروه های کروسین+فشار اکسیداتیو و فشار اکسیداتیو+کروسین+تمرین بلافاصله پس از تزریق H₂O₂ در سمت چپ رت ها انجام گرفت (۳۲) (جدول شماره ۱). به منظور حذف اثر حاد آخرین جلسه فعالیت، دستورالعمل تمرینی ۴۸ ساعت پیش از نمونه برداری رت ها پایان یافت و رت ها با استفاده از گاز CO₂ بیهوش شدند و بافت قلب آن ها جدا گردید. بافت قلب بلافاصله در تانک ازل قرار داده شد و به فریزر -۸۰ درجه منتقل گردید. برای بررسی بیان ژن های Apaf-1، سیتوکروم C و کاسپاز ۹ کاردیومیوسیتی در رت های مسموم شده با پراکسید هیدروژن، از روش کمی Real Time PCR استفاده شد. ابتدا طراحی آغازگرها بر اساس اطلاعات در بانک ژنی NBCI انجام گرفت.

فیزیولوژیک و پاتولوژیک، آنتی اکسیدان های درون زاد نمی تواند به طور کامل از آسیب اکسایشی جلوگیری کند و با توجه به اثر فعالیت ورزشی بر فشار اکسیداتیو و نقش آنتی اکسیدانی کروسین، این پرسش مطرح است که آیا می توان از ترکیب این دو مداخله برای کنترل فشار اکسیداتیو و مهار آپوپتوز در سلول های کاردیومیوسیتی در شرایط القای فشار اکسیداتیو با پراکسید هیدروژن استفاده کرد؛ از این رو، این تحقیق با هدف اثر ترکیبی تمرین هوازی در آب و مکمل کروسین بر بیان ژن های Apaf-1، سیتوکروم C و کاسپاز ۹ کاردیومیوسیتی در رت های نر مسموم شده با پراکسید هیدروژن اجرا گردید.

مواد و روش ها

در مطالعه تجربی حاضر، ۳۶ سر رت نر نژاد ویستار (میانگین وزن ۱۸۰ تا ۲۰۰ گرم)، در شش گروه ۶ تایی (آب اکسیژنه، آب اکسیژنه+کروسین، آب اکسیژنه+تمرین، آب اکسیژنه+کروسین+تمرین، شم و کنترل) به شکل تصادفی تقسیم شدند که دو سر رت در میانه راه از فرایند تمرین خارج گردیدند. رت ها تحت شرایط کنترل شده در دمای ۲۳±۱ درجه سانتی گراد و تحت چرخه خواب و بیداری (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و رطوبت ۴۰ تا ۶۰ درصد، بدون هیچ گونه محدودیت غذایی و آب نگهداری شدند.

پژوهش حاضر کد اخلاق از پژوهشگاه تربیت بدنی به شماره IR.SSRI.REC.1397.254 دارد. در این مطالعه، اصول و کلیه موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی طبق قوانین مصوب کمیته اخلاق در پژوهش های پزشکی رعایت شده است. دستورالعمل فعالیت در آب در دو مرحله،

جدول شماره ۱. تفکیک گروه ها و عملکرد هر گروه

گروه	عنوان	عملکرد
اول	شم	تزریق سرم سالین
دوم	القای فشار اکسیداتیو	تزریق یک میلی مول H ₂ O ₂
سوم	القای فشار اکسیداتیو+کروسین	تزریق یک میلی مول H ₂ O ₂ +کروسین
چهارم	القای فشار اکسیداتیو+تمرین	تزریق یک میلی مول H ₂ O ₂ +تمرین در آب
پنجم	القای فشار اکسیداتیو+کروسین+تمرین	تزریق یک میلی مول H ₂ O ₂ +کروسین+تمرین در آب
ششم	کنترل	تأثیر محیط

Apaf-1، سیتوکروم C و کاسپاز ۹ نسبت به ژن مرجع محاسبه گردید. میزان بیان ژن‌های مرجع نیز با روش (CT $\Delta\Delta$ -۲) اندازه‌گیری شد (جدول شماره ۲).

سپس آزمون شاپیرو ویلک برای تعیین توزیع طبیعی استفاده گردید که در صورت طبیعی بودن داده‌ها، برای بررسی تجانس واریانس متغیرها از آزمون لوین و برای بررسی تغییرات میان گروه‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و برای تعیین تفاوت میان گروه‌ها از آزمون تعقیبی شفه استفاده شد. مقدار معنی‌داری در سطح $P \leq 0.05$ به معنای رد فرض صفر در نظر گرفته شد. برای همه محاسبات آماری از نرم‌افزار SPSS vol.23 و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده گردید.

سپس RNA از بافت‌ها استخراج گردید و به cDNA تبدیل شد؛ سپس cDNA به روش PCR تکثیر گردید و از نظر بیان ژن‌های ذکر شده بررسی شد. ضمن اینکه از Gapdh (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) به عنوان ژن مرجع استفاده گردید. برنامه دمایی استفاده شده در Real Time PCR شامل دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در مرحله گرم شدن صفحه قرارگیری نمونه و سیکل‌های گرمایی شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه (تکرار ۴۰ چرخه) بود. نمودار ذوب برای بررسی درستی داده‌ها و نمودار استاندارد به منظور بهینه‌سازی شرایط آزمایش رسم شد و بیان داده‌ها توسط نسبت بیان ژن‌های

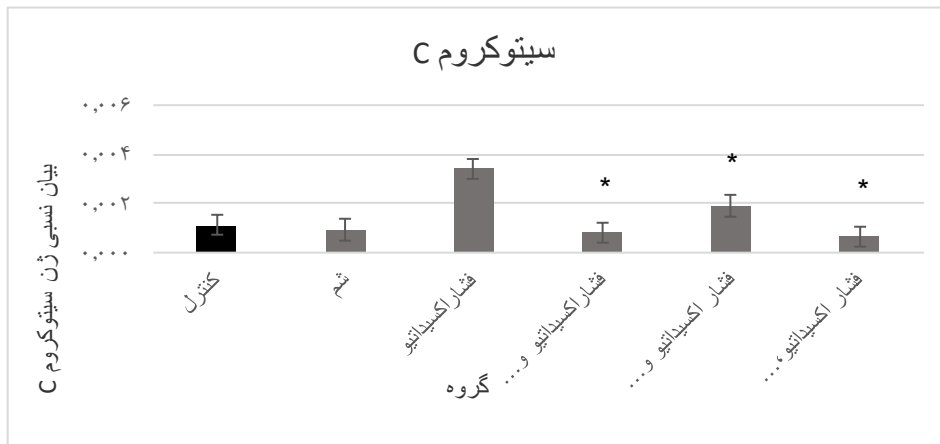
جدول شماره ۲. توالی پرایمرهای بیان ژنی عضله قلبی رت‌های نر بالغ

نام ژن ها	توالی آغازگر (5'-3')	طول محصول (bp)
Cytochrome-c	F: 5' TTTGGGGCAAGGAAAGAGT 3' R: 5' ATACATGGCAGAAGTGGGAGA 3'	۱۴۹
Apaf-1	F: 5' GATGGAATGGTGAAGGTGTGGA R: 5' TGATGAAGAGGGGAAGGGAG 3'	۱۷۶
Caspase 9	F: 5' AGCCAGATGCTGTCCCATAC 3' R: 5' CAGGAGACAAAACCTGGGAA 3'	۱۲۴
Gapdh	F: 5' AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG 3' R: 5' CATACTCAGCACCAGCATCACC 3'	۱۲۱

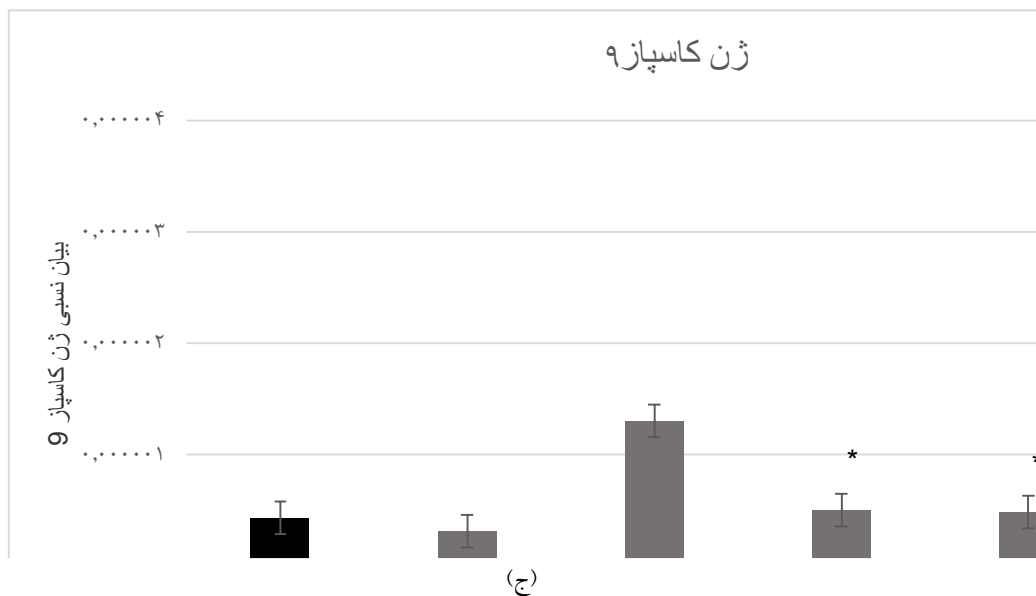
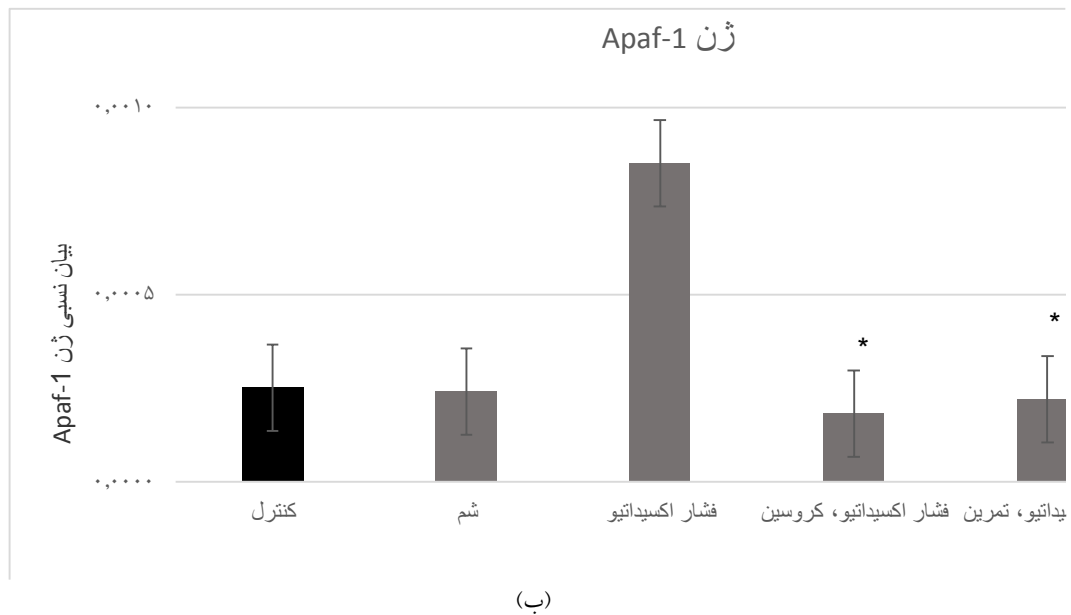
یافته ها

Apaf-1، سیتوکروم C و کاسپاز ۹ کاردیومیوسیتی در رت های نر مسموم شده با پراکسید هیدروژن و درنهایت، کاهش مرگ سلولی شده است ($P \leq 0.001$) (نمودار شماره ۱).

بر اساس نتایج پژوهش حاضر، شش هفته تمرین هوازی در آب، مصرف مکمل کروسین و همچنین اثر ترکیبی تمرین و مصرف مکمل باعث کاهش بیان ژن های درگیر در مسیر میتوکندریایی آپوپتوز مانند



(الف)



شکل شماره ۱. الف. میانگین بیان ژن‌های سیتوکروم C، ب. Apaf-1 و ج. کاسپاز ۹ در بافت قلب گروه‌های پژوهش

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر به بررسی اثر تمرین هوازی در آب و مصرف کروسین بر بیان ژن‌های پیش‌آپوپتوزی Apaf-1، سیتوکروم C و کاسپاز ۹ کاردیومیوسیتی در رت‌های نر مسموم‌شده با پراکسید هیدروژن پرداخته شد که بر اساس نتایج پژوهش، شش هفته تمرین هوازی در آب و مصرف کروسین کاهش بیان ژن‌های درگیر در مسیر میتوکندریایی آپوپتوز را به همراه داشت.

مدارک و شواهد نشان می‌دهد که انواع فعالیت‌های ورزشی آثار متفاوتی بر آپوپتوز کاردیومیوسیتی

می‌گذارد (۳۶). نو و همکاران (۲۰۲۰) در مطالعه‌ای، به بررسی تأثیر هشت هفته فعالیت ورزشی استقامتی در آب بر نشانگرهای سیگنالینگ آپوپتوتیک پرداختند که نتایج کاهش کاسپاز ۳ را در عضله قلب رت‌ها به همراه داشت و با نتایج مطالعه حاضر همسو بود (۲۰). از سوی دیگر، اولاد و همکاران (۲۰۲۱) به بررسی تأثیر دوازده هفته فعالیت ورزشی در آب بر بیان ژن نشانگرهای بازسازی پاتولوژیک، آپوپتوز و فرایند التهاب پرداختند که تفاوت معناداری در بیان ژن‌های مرتبط در حیوانات آزمایشگاهی یافت نشد (۲۱). آبادی و همکاران (۱۳۹۶) گزارش کردند که سه ماه

تمرین هوازی موجب افزایش چشمگیر بیان ژن‌های AIF و کاسپاز ۹ عضله نعلی موش‌های صحرایی نر شد (۳۶).

بر اساس این نتایج متناقض می‌توان به این نتیجه رسید که سطح بیان ژن‌های مسیر آپوپتوز همیشه الگوی یکسانی از پاسخ به ورزش را نشان نمی‌دهد. فعالیت ورزشی توانایی‌ای دارد که تکثیر و مرگ سلولی را از طریق سایتوکین‌ها، هورمون‌ها، عامل‌های رشد و مسیرهای متابولیک تعدیل می‌کند (۳۷). اخیراً شواهدی برای آپوپتوز ناشی از ورزش موجود است که در لنفوسیت و عضله حادث می‌شود؛ برای مثال، گلوکوکورتیکوئیدها، جز واکنشی اکسیژن، افزایش در سطوح Ca^{2+} درون‌سلولی و عامل نکروزدهنده تومور برخی از سیگنال‌هایی اند که می‌توانند سبب آپوپتوزیس گردند. ROS از طریق اکسیداسیون بازهای پورین و پیریمیدین و به‌ویژه گوانین به DNA صدمه می‌زند و باعث مرگ سلول می‌شود و آپوپتوزیس سبب از بین رفتن سلول‌های تارهای عضلانی آتروفی شده می‌گردد (۳۸)؛ بنابراین، انجام یک برنامه تمرینی با حجم بالا و در مدت طولانی می‌تواند موجب تخریب اکسایشی سلول شود و هموستاز آن را مختل کند، به‌طوری که انقباضات عضلانی در حین تمرین ورزشی به تولید مقادیر مختلفی از ROS منجر می‌گردد که به‌شدت و مدت تمرین بستگی دارد (۳۹). سوری و همکاران (۲۰۲۰) به بررسی تأثیر فعالیت ورزشی پرشدت بر نشانگرهای آپوپتوز پرداختند و نشان دادند، تمرینات با شدت بالا سطوح Bcl-2 و Bax را بالا می‌برد (۴۰). چنین به‌نظر می‌رسد که افزایش شدت تمرین با بالا بردن فشار سوخت‌وساز، موجب افزایش فشار اکسیداتیو می‌شود و همین فشار اکسیداتیو که نتیجه آن افزایش رادیکال‌های آزاد است، موجب پیش‌برد و افزایش پیام‌رسانی آپوپتوتیک منجر می‌گردد (۴۱).

کروسین آثار فارماکولوژیک متعدد از جمله آثار محافظتی علیه بیماری‌های قلبی-عروقی دارد (۴۲) که رادیکال‌های آزاد کروسین، به ویژه آنیون‌های

سوپراکسید، ممکن است غشاهای سلولی و اندامک‌های درون غشایی را در مقابل اکسیدان‌ها محافظت کنند (۴۳). زاو و همکاران (۲۰۰۶) در تحقیقی مشاهده کردند که کروسین در غلظت‌های ۱ تا ۱۰ میکرومول از تغییرات ریخت‌شناسی سلولی ایجادشده در اثر آپوپتوز القا شده با H_2O_2 که به‌صورت متراکم شدن هسته، ایجاد جوانه در سطح غشا و تشکیل اجسام آپوپتوتیک است، به‌صورت معنی‌داری جلوگیری نموده است؛ پس به این نتیجه رسیدند که کروسین اثر پیشگیری‌کننده بر آپوپتوز سلولی القا شده با H_2O_2 دارد (۴۴). بوچانگ و همکاران (۲۰۱۵) در تحقیقی با عنوان «تأثیر کروسین در برابر آسیب ناشی از H_2O_2 از طریق مسیر میتوکندری و فعال‌سازی NF-KB» به این نتیجه رسیدند که کروسین باعث محافظت از سلول‌های RGC-5 در برابر آپوپتوز می‌شود و انتشار LDL را کاهش می‌دهد (۴۵). بوسابه و همکاران (۲۰۱۶) در تحقیقی به بررسی تأثیر کروسین در برابر آپوپتوز پرداختند و به این نتیجه رسیدند که با پیش‌درمان کروسین القای آپوپتوز کاهش می‌یابد (۴۶). پژوهش‌های اندکی تأثیر هم‌زمان فعالیت ورزشی و کروسین را بر عوامل آنتی‌اکسیدانی مطالعه کرده‌اند. مرادی و همکاران (۲۰۱۹) به بررسی تأثیر تمرینات شنا و مصرف کروسین بر مسیر آپوپتوز ذاتی در عضله اسکلتی رت‌ها پرداختند و نشان دادند، مصرف کروسین همراه با تمرین می‌تواند بر آپوپتوز تأثیرگذار باشد (۲۸) و از آن جلوگیری کند که تفاوت پژوهش حاضر با این مطالعه، در بافت موردسنجش بوده است؛ اما نتایج این مطالعات باهم همسو است. در مطالعه ای دیگر، حسن پور و همکاران (۲۰۱۷) به بررسی هم‌زمان فعالیت ورزشی بر تردمیل و مصرف مکمل کروسین بر ژن‌های پروآپوپتوتیک پرداختند و نتایج بیانگر افزایش بیان ژن Bcl-2 در بافت قلب در اثر تمرین استقامتی همراه با مصرف کروسین بود (۲۹) که شیوه تمرین در این مطالعه با

این عوامل را همراه با متغیرهای پژوهش حاضر ارزیابی کنند.

تشکر و قدردانی

از اساتید و دانشجویان همکار در گروه پژوهشی دانشگاه دبیری شهید رجایی که به گونه‌ای در بخش اجرای پژوهش در آزمایشگاه یاری نمودند، تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

تعارض منافع

نویسندگان تضاد منافی را اعلام نکردند.

کد اخلاق: IR.SSRI.REC.1397.254

References

- Crist BL, Alekel DL, Ritland LM, Hanson LN, Genschel U, Reddy MB. Association of oxidative stress, iron, and centralized fat mass in healthy postmenopausal women. *J Womens Health* 2009;18:795-801. doi: 10.1089/jwh.2008.0988.
- Young IS, McEneny J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans* 2001;29:358-62. doi: 10.1042/bst0290358.
- Rinaldi B, Corbi G, Boccuti S, Filippelli W, Rengo G, Leosco D, et al. Exercise training affects age-induced changes in SOD and heat shock protein expression in rat heart. *Exp Gerontol* 2006;41:764-70. doi: 10.1016/j.exger.2006.05.008
- Haendeler J, Popp R, Goy C, Tischler V, Zeiher AM, Dimmeler S. Cathepsin D and H2O2 stimulate degradation of thioredoxin-1: implication for endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem* 2005;280:42945-51. doi: 10.1074/jbc.M506985200.
- Khalatbary AR. Apoptosis in neurodegenerative diseases. *J Gorgan Uni Med Sci* 2014;16:1-1. (persian)
- Cerella C, Grandjenette C, Dicato M, Diederich M. Roles of apoptosis and cellular senescence in cancer and aging. *Curr Drug Targets* 2016;17:405-15. doi: 10.2174/1389450116666150202155915
- Phaneuf S, Leeuwenburgh C. Apoptosis and exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2001;33:393-6. doi: 10.1097/00005768-200103000-00010.
- Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, De Guevara RL, Cepero E, Boise LH. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC cell biol* 2013;14:1-9. doi: 10.1186/1471-2121-14-32.
- Bezzlerides V, Rosenzweig A. Saying yes to exercise and NO to cardiac injury. *Circ Res* 2011; 108:1414-16. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.247122.
- Ignarro LJ, Balestrieri ML, Napoli C. Nutrition, physical activity, and cardiovascular disease: an update. *Cardiovasc Res* 2007; 73:326-40. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.06.030.
- Haykowsky MJ. Left ventricular remodeling and the athlete's heart: time to revisit the Morganroth hypothesis. *J Physiol* 2011;589:5915-23. doi: 10.1113/jphysiol.2011.221903.
- Mallikarjuna K, Shanmugam KR, Nishanth K, Wu MC, Hou CW, Kuo CH, et al. Alcohol-induced deterioration in primary antioxidant and glutathione family enzymes reversed by exercise training in the liver of old rats. *Alcohol* 2010;44:523-9. doi: 10.1016/j.alcohol.2010.07.004.
- Huang CY, Yang AL, Lin FNW, Lin JA, Chan YS, Tsai FJ, et al. Anti-apoptotic and pro-survival effects of exercise training on hypertensive hearts. *J Appl Physiol* 2011;112:883-91. doi: 10.1152/jappphysiol.00605.2011.
- Meredith-Jones K, Waters D, Legge M, Jones L. Upright water-based exercise to improve cardiovascular and metabolic health: a qualitative review. *Complement Ther Med* 2011;19:93-103. doi: 10.1016/j.ctim.2011.02.002.
- Nakamoto H, Kaneko T, Tahara S, et al. Regular exercise reduces 8-oxodG in the nuclear and mitochondrial DNA and modulates the DNA repair activity in the liver of old rats. *Exp Gerontol* 2007; 42:287-95. doi: 10.1016/j.exger.2006.11.006.
- Nayanatara A, Nagaraja H, Anupama B. The effect of repeated swimming stress on organ weights and lipid peroxidation in rats. *Thai J Pharm Sci* 2005;18:3-9.
- Powers SK, Quindry JC, Kavazis AN. Exercise-

- induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 2008; 44:193-201. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.006.
18. Habibi P, Alihemmati A, NourAzar A, Yousefi H, Mortazavi S, Ahmadiasl N. Expression of the Mir-133 and Bcl-2 could be affected by swimming training in the heart of ovariectomized rats. *Iran J Basic Med Sci* 2016;19:381-93. (persian) doi: 10.22038/ijbms.2016.6809.
 19. Tanya RL, Christine M. Bone density and physical function in postmenopausal women after a 12-month water exercise intervention. *Corval Oreg State Uni* 2006; 541:9524-737.
 20. No MH, Heo JW, Yoo SZ, Kim CJ, Park DH, Kang JH, et al. Effects of aging and exercise training on mitochondrial function and apoptosis in the rat heart. *Pflugers Arch* 2020;472:179-93. doi: 10.1093/cvr/cvr015.
 21. Olah A, Barta BA, Sayour AA, Ruppert M, Virág-Tulassay E, Novák J, et al. Balanced intense exercise training induces atrial oxidative stress counterbalanced by the antioxidant system and atrial hypertrophy that is not associated with pathological remodeling or arrhythmogenicity. *Antioxidants* 2021;10:452. doi: 10.3390/antiox10030452.
 22. Su QS, Tian Y, Zhang JG, Zhang H. Effects of allicin supplementation on plasma markers of exercise-induced muscle damage, IL-6 and antioxidant capacity. *Eur J Appl Physiol* 2008;103:275-83. doi: 10.1007/s00421-008-0699-5.
 23. Keramati S. Effects of caraway supplementation on oxidative enzymatic stress markers in healthy women following aerobic exercise. 2012; M.A Thesis on Exercise Physiology. (persian)
 24. Bjorklund G, Chirumbolo S. Role of oxidative stress and antioxidants in daily nutrition and human health. *Nutrition* 2017; 33:311-21. doi: 10.1016/j.nut.2016.07.018.
 25. Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR, Ziaee T, Danaee A. Protective effect of aqueous saffron extract (*Crocus sativus* L.) and crocin, its active constituent, on renal ischemia-reperfusion-induced oxidative damage in rats. *J Pharm Pharm Sci*. 2005;8:387-93. (persian)
 26. Dianat M, Radan M. A Review on the Effective Properties of Crocin in the Management of Cardiopulmonary Dysfunction. *Jundishapur J Physiol* 2021; 2; 22-8. (persian)
 27. Abdulkareem Aljumaily SA, Demir M, Elbe H, Yigitturk G, Bicer Y, Altinoz E. Antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic effects of crocin against doxorubicin-induced myocardial toxicity in rats. *Environ Sci Pollu Res* 2021; 28:1-2. (persian) doi: 10.21203/rs.3.rs-418902/v1.
 28. Moradi A, Hosseini SA, Nikbakht M. Effect of swimming training and crocin consumption on intrinsic apoptosis pathway in muscle tissue of high-fat diet-induced obese rats. *Middle East J Rehabil Health Stud* 2019; 31;6. (persian) doi: 10.5812/mejrh.92612.
 29. Hassanpour G, Azarbayjani MA, Shakeri N, Abednazari H. The Effect of Interval and Continued Trainings with Crocin on Apoptotic Markers in the Heart Tissue of High-Fat Diet and Streptozotocin Induced Type 2 Diabetic Rats. *Rep Health Care* 2017; 1;3:58-70. (persian)
 30. Rafiei MM, Gaeini A, Kordi MR, Nuri R. The Effect of Eight Weeks of Aerobic Exercise on Gene Expression of Cytochrome C, Caspase 9 and Tumor Volume in Mice with Breast Cancer. *Rep Health Care* 2018;4:55-60. (persian)
 31. Radák Z, Sasvári M, Nyakas C, Pucso J, Nakamoto H, Goto S. Exercise preconditioning against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in proteins of rat myocardium. *Arch biochem biophys* 2000;376:248-51. (persian) doi: 10.1006/abbi.2000.1719.
 32. Lari P, Abnous K, Imenshahidi M, Rashedinia M, Razavi M, Hosseinzadeh H. Evaluation of diazinon-induced hepatotoxicity and protective effects of crocin. *Toxicol Ind Health* 2015; 31:367-76. doi: 10.1177/0748233713475519.
 33. Favalaro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. *Aging* 2012;4:330. doi: 10.18632/aging.100459.
 34. Gharekhanlo R, Mollahnoori M. *Molecular Exercise Physiology: An Introduction*. 1nd ed. Hatmi Publication 2014; p.115-4.
 35. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:49-63. doi: 10.1038/nrm3722.
 36. Abadi N, Bashiri J. The effect of three-month aerobic training on the expression of AIF and caspase-9 gene in male rat soleus muscle. *J Fasa Univ Med Sci* 2017; 7:257-64. (persian)
 37. Carraro U, Franceschi C. Apoptosis of skeletal and cardiac muscles and physical exercise. *Aging* 1997;9:19-34. doi: 10.1007/BF03340125.
 38. Mooren F, Völker Klaus C. *Molecular and cellular exercise Physiology*. Translated by: Tartibian Bakhtiar and colleagues: University of Urmia unit 2012.
 39. Pietrangelo T, Di Filippo ES, Mancinelli R, Doria C, Rotini A, Fanò-Illic G, et al. Low intensity exercise training improves skeletal muscle regeneration potential. *Front Physiol* 2015;6:399. doi: 10.3389/fphys.2015.00399.
 40. Soori R, Ghram A, Zare Shahneh M, Choobineh S, Costa PB, Voltarelli FA. Effects of high intensity interval training and aging on cardiac muscle apoptosis markers in C57BL/6 Mice. *Sport Sci Health* 2021;17:173-9. doi: 10.1007/s11332-020-00670-2.
 41. 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: 608-22. (persian)
 42. Xiang M, Qian ZY, Zhou CH, Liu J, Li WN. Crocetin inhibits leukocyte adherence to vascular endothelial cells induced by AGEs. *J Ethnopharmacol* 2006;107:25-31. doi: 10.1016/j.jep.2006.01.022.
 43. Bjorklund G, Chirumbolo S. Role of oxidative stress and antioxidants in daily nutrition and human health. *Nutrition* 2017; 33:311-21. doi: 10.1016/j.nut.2016.07.018.
 44. Xu GL, Qian ZY, Yu SQ, Gong ZN, Shen XC. Evidence of crocin against endothelial injury induced by hydrogen peroxide in vitro. *J*

- Asian Nat Produ Res 2006;8:79-85. doi: 10.1080/10286020500044732.
45. Lv B, Chen T, Xu Z, Huo F, Wei Y, Yang X. Crocin protects retinal ganglion cells against H₂O₂-induced damage through the mitochondrial pathway and activation of NF- κ B. *Int J Mol Med* 2016;37:225-32. doi: 10.3892/ijmm.2015.2418.
46. Boussabbeh M, Salem IB, Belguesmi F, Neffati F, Najjar MF, Abid-Essefi S, et al. Crocin protects the liver and kidney from patulin-induced apoptosis in vivo. *Environ Sci Pollut Res Int* 2016;23:9799-808. doi: 10.1002/tox.22185.
47. Nayanatara AK, Nagaraja HS, Anupama BK. The effect of repeated swimming stress on organ weights and lipid peroxidation in rats. *Thai J Pharm Sci* 2005;18:3-9.