Journal of Ilam University of Medical Sciences

P-ISSN: 1563-4728
E-ISSN: 2588-3135

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

**Sepideh Poursadeghi[1], Majid Kashef[1], Fereshteh Shahidi[1], Elham Vosadi[2*]**

[1] Dept of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, Shahid Rajaee 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 University of Technology, Semnan, Iran.
Email: e.vosadi@yahoo.com

**A B S T R A C T**

**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.
(Ethic 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.

© The Author(s)
Publisher: Ilam University of Medical Sciences

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام

P-ISSN: ۱۵۶۳-۴۷۲۸

E-ISSN: ۲۵۸۸-۳۱۳۵



مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام /دی ۱۴۰۱، دوره ۳۰، شماره ۵، ۱۱۱-۱۰۱

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

سپیده پورصادقی[۱]، مجید کاشف[۱]، فرشته شهیدی[۱]، الهام وسدی[۲*]

[۱] گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکدهٔ تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی، تهران، ایران

[۲] گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکدهٔ تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه صنعتی شاهرود، سمنان، ایران

**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، دانشکدهٔ تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه صنعتی شاهرود، سمنان، ایران.

**Email:** e.vosadi@yahoo.com

**چکیده**

**مقدمه:** مرگ سلولی ناشی از استرس اکسیداتیو توسط رادیکال های آزاد فعال می گردد که به‌نظر 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 عضلهٔ 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 به‌طور تصادفی به شش گروه ۶تایی (آب‌اکسیژنه، آب‌اکسیژنه+کروسین، آب‌اکسیژنه+تمرین، آب‌اکسیژنه+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 همهٔ گروه ها به‌جز شم و کنترل، به میزان ۱ میلی‌مول H2O2 و به گروه های مکمل ۱۲/۵ میلی گرم کروسین به‌صورت زیر صفاقی تزریق گردید. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسهٔ 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 پروآپوپتوتیک از روش Real Time PCR، برای تجزیه‌وتحلیل داده ها از آزمون تحلیل واریانس یک‌راهه و آزمون تعقیبی شفه در سطح معنی‌داری $P\leq0.05$ استفاده شد.

**یافته‌ها:** یافته‌های 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 معنی‌داری $P\leq0.05$ گردید.

**بحث و نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج مطالعهٔ حاضر به‌نظر می رسد، برای کاهش آپوپتوز بافت قلب، آسیب کمتر سلولی و درنهایت سلامت بافت قلب، از تعامل و ترکیب تمرین هوازی در آب و مکمل آنتی‌اکسیدانی کروسین استفاده شود.

**واژه‌های کلیدی:** تمرین هوازی، ژن های پروآپوپتوتیک، مرگ سلولی عضلهٔ 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 عضلهٔ قلب در رت های نر نژاد ویستار. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، دی ۱۴۰۱؛۳۰(۵): ۱۱۱-۱۰۱.

CC BY NC

**مقدمه**

استرس اکسیداتیو نقش مهمی در توسعهٔ بیماری های قلبی ایفا می‌کند 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 ضداکساینده ها از بین برود، با تأثیر بر اکسایش درون‌سلولی، باعث بیماری ها و مرگ زودرس سلول می شود (۲)، به‌طوری‌که 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 به‌واسطهٔ گیرنده های اختصاصی موجود در سطح سلول به نام گیرنده های مرگ (Death receptor) فعال می گردد (۵)، درحالی‌که مسیر داخلی به‌عنوان 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 القاکنندهٔ 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 به‌عنوان کاسپاز آغازگر آپوپتوز در مسیر میتوکندریایی می گردد. این روند درنهایت موجب فعال سازی کاسپاز ۳ به‌عنوان کاسپاز اجرایی و فصل مشترک همهٔ 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 مرحلهٔ غیرقابل‌برگشت مرگ سلولی می گردند (۸، ۷)؛ ازاین‌رو، 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 به‌عنوان یک برنامهٔ 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 ازجمله قدرت انقباض میوکارد، افزایش اندازهٔ حفرهٔ بطن چپ، ضخامت دیواره و افزایش تودهٔ قلب شود که به‌عنوان «قلب ورزشکار» شناخته می گردد (۱۱). در مطالعات نشان داده‌شده است که تمرین ورزشی آپوپتوز را همراه با بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانی 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 ذخیرهٔ گلیکوژن و ساخت زنجیرهٔ 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 تمرین‌کرده می گردد (۱۳).

در این میان، ورزش شنا به‌عنوان درمان غیردارویی

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام /دی ۱۴۰۱، دوره ۳۰، شماره ۵، ۱۱۱-۱۰۱

برای فشارخون بالا، چاقی و بیماری های قلبی-عروقی تجویزشده است؛ زیرا سطح سیتوکین های التهابی را بدون ایجاد استرس اکسیداتیو کاهش می دهد (۱۴)، باعث کاهش تولید ROS و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی می شود و می تواند آسیب اکسایشی به پروتئین ها و یا DNA در عضلهٔ اسکلتی و مغز موش های صحرایی را تضعیف کند (۱۵). علاوه بر این ها، ورزش شنای منظم مزایای بیشتری نسبت به فعالیت های دیگر ازجمله دویدن روی تردمیل دارد که ازجمله مزایای آن می توان به مقدار کار بیشتر در طول شنا نسبت به فعالیت روی تردمیل با مدت‌زمان مشابه و بی‌نیاز 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 دامنهٔ 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 مطالعهٔ 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 رت‌ها به همراه داشت (۲۰). اولا و همکاران (۲۰۲۱) به بررسی تأثیر ۱۲ هفته فعالیت ورزشی شنا پرداختند که هیچ تغییری در بیان ژن دربارهٔ نشانگرهای بازسازی پاتولوژیک، آپوپتوز و فرایند التهاب در حیوانات آزمایشگاهی یافت نشد (۲۱)؛ همچنین شواهد فراوانی نشان می دهد، تحت شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک، آنتی‌اکسیدان‌های درون‌زاد نمی توانند به‌طور کامل از آسیب اکسایشی جلوگیری کنند؛ به همین سبب، طی سال های اخیر استفاده از مکمل های آنتی‌اکسیدانی برای افزایش توان دفاع ضداکسایشی و کاهش آسیب‌های اکسایش در فعالیت‌های بدنی مطالعه شده که به علت عوارض کمتر مکمل های طبیعی نسبت به مکمل های سنتیک، توجه بیشتری به این مکمل ها شده است (۲۳، ۲۲). مکمل های آنتی‌اکسیدانی 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 مادهٔ مؤثر آن، کروسین اشاره کرد که خاصیت آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی دارد. کروسین برای اندام های مختلف مانند دستگاه عصبی، دستگاه گوارش، قلب و عروق، تناسلی، غدد درون‌ریز و دستگاه ایمنی بدن سودمند است؛ همچنین زعفران و کروسین در پیشگیری از آسیب اکسیداتیو ناشی از ایسکمی برقراری مجدد خون در موش‌های صحرایی مفید است (۲۵). دیانت و رادان (۲۰۲۱) در مطالعه‌ای، به بررسی عملکرد کروسین بر نارسایی قلب پرداختند. یافته‌ها تأیید می‌کند 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 می‌تواند بر آپوپتوز تأثیرگذار باشد و از آن جلوگیری کند (۲۸). در مطالعهٔ حسن‌پور و همکاران (۲۰۱۷)، به بررسی هم‌زمان فعالیت ورزشی و مصرف مکمل کروسین بر ژن‌های پروآپوپتوتیک 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).

ازآنجاکه شواهد نشان می دهد، تحت شرایط

فیزیولوژیک و پاتولوژیک، آنتی‌اکسیدان‌های درون‌زاد نمی توانند به‌طور کامل از آسیب اکسایشی جلوگیری کنند و با توجه به اثر فعالیت ورزشی بر فشار اکسیداتیو و نقش آنتی‌اکسیدانی کروسین، این پرسش مطرح است که آیا می توان از ترکیب این دو مداخله برای کنترل فشار اکسیداتیو و مهار آپوپتوز در سلول های کاردیومایوسیتی در شرایط القای فشار اکسیداتیو با پراکسید هیدروژن استفاده کرد؛ ازاین‌رو، این تحقیق با هدف اثر ترکیبی تمرین هوازی در آب و مکمل کروسین بر بیان ژن های Apaf-1، سیتوکروم C و کاسپاز ۹ کاردیومایوسیتی در رت های نر مسموم‌شده با پراکسید هیدروژن اجرا گردید.

## مواد و روش ها

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

پژوهش حاضر کد اخلاق از پژوهشگاه تربیت‌بدنی به شمارهٔ IR.SSRI.REC.1397.254 دارد. در این مطالعه، اصول و کلیهٔ 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، به‌صورت آموزش و تمرین برگزار گردید. مرحلهٔ آموزش شامل هفتهٔ اول بود که رت ها به مدت ۱۰ دقیقه در یک مخزن استاندارد (۱۴۰× ۶۰ × ۴۵ سانتی متر) با درجهٔ حرارت آب ۳۳ تا ۳۶ درجهٔ سانتی گراد فعالیت داشتند؛ سپس مرحلهٔ تمرین در آب درنهایت به مدت ۶۰ دقیقه در روز و ۵ روز در هفته (درمجموع 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 میلی‌مول بر کیلوگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، H2O2 یک روز در میان به شکل زیر صفاقی، به علت جذب سریع‌تر در سمت راست رت‌ها، ۳۰ دقیقه پیش از تمرین تزریق شد (۳۱). تزریق کروسین با خلوص ۹۸ درصد، روزانه با سرنگ انسولین در ناحیهٔ صفاق ۱۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم با ۵ سی‌سی آب مقطر رقیق‌شده به علت جذب سریع‌تر، در گروه های کروسین+فشار اکسیداتیو و فشار اکسیداتیو+کروسین+تمرین بلافاصله پس از تزریق H2O2 در سمت چپ رت‌ها انجام گرفت (۳۲) (جدول شمارهٔ ۱).

به‌منظور حذف اثر حاد آخرین جلسهٔ 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 ازت قرار داده شد و به فریزر ۸۰- درجه منتقل گردید.

برای بررسی بیان ژن های Apaf-1، سیتوکروم C و کاسپاز ۹ کاردیومایوسیتی در رت های مسموم‌شده با پراکسید هیدروژن، از روش کمی Real Time PCR استفاده شد. ابتدا طراحی آغازگرها بر اساس اطلاعات در بانک ژنی NBCI انجام گرفت.

**جدول شمارهٔ ۱.** تفکیک گروه‌ها و عملکرد هر گروه

| گروه | عنوان | عملکرد |
|---|---|---|
| اول | شم | تزریق سرم سالین |
| دوم | القای فشار اکسیداتیو | تزریق یک میلی‌مول H2O2 |
| سوم | القای فشار اکسیداتیو+کروسین | تزریق یک میلی‌مول H2O2+کروسین |
| چهارم | القای فشار اکسیداتیو+تمرین | تزریق یک میلی‌مول H2O2+تمرین در آب |
| پنجم | القای فشار اکسیداتیو+کروسین+تمرین | تزریق یک میلی‌مول H2O2+کروسین+تمرین در آب |
| ششم | کنترل | تأثیر محیط |

سپس RNA از بافت‌ها استخراج گردید و به cDNA تبدیل شد؛ سپس cDNA به روش PCR تکثیر گردید و از نظر بیان ژن‌های ذکرشده بررسی شد. ضمن اینکه از Gapdh (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) به‌عنوان ژن مرجع استفاده گردید. برنامهٔ دمایی استفاده‌شده در Real Time PCR شامل دمای ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در مرحلهٔ گرم شدن صفحهٔ قرارگیری نمونه و سیکل‌های گرمایی شامل ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه (تکرار ۴۰ چرخه) بود. نمودار ذوب برای بررسی درستی داده‌ها و نمودار استاندارد به‌منظور بهینه‌سازی شرایط آزمایش رسم شد و بیان داده‌ها توسط نسبت بیان ژن های Apaf-1، سیتوکروم C و کاسپاز ۹ نسبت به ژن مرجع محاسبه گردید. میزان بیان ژن‌های مرجع نیز با روش (CT $\Delta\Delta$-)۲ اندازه گیری شد (جدول شمارهٔ 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 $P\leq0.05$ به معنای رد فرض صفر در نظر گرفته شد. برای همهٔ محاسبات آماری از نرم‌افزار SPSS vol.23 و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده گردید.

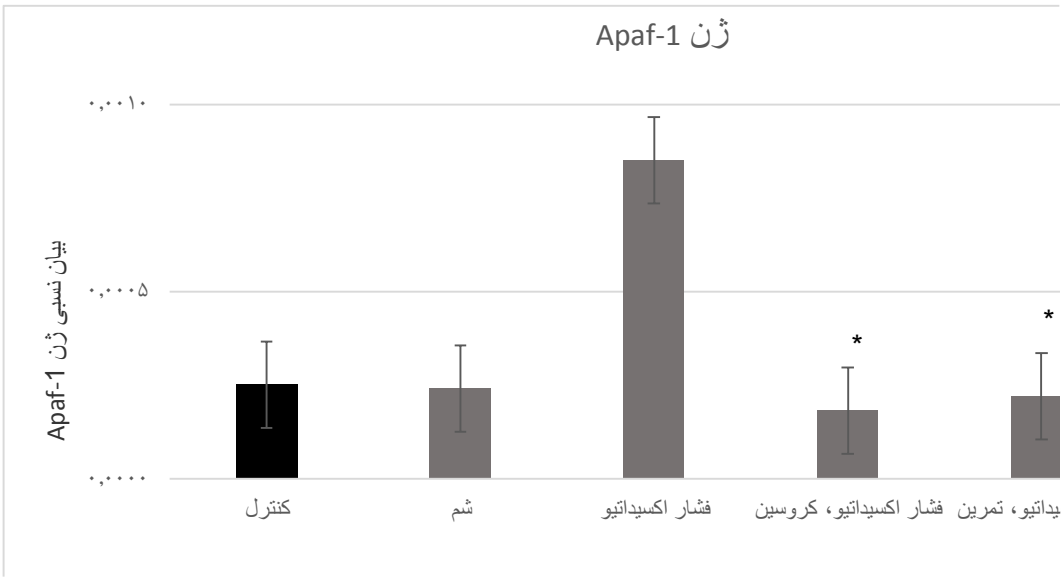
**جدول شمارهٔ ۲.** توالی پرایمرهای بیان ژنی عضلهٔ قلبی رت‌های نر بالغ

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

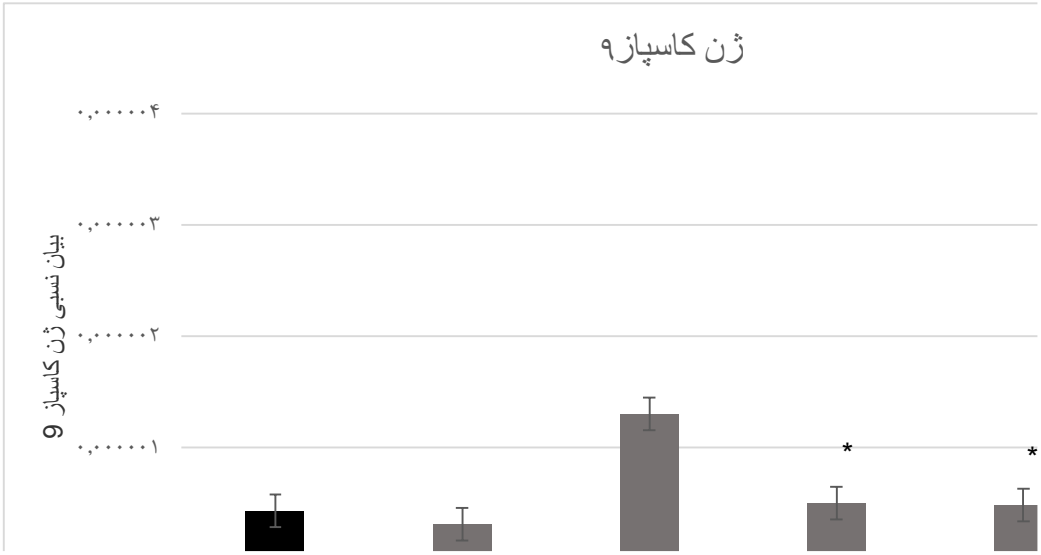
## یافته ها

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 Apaf-1، سیتوکروم C و کاسپاز ۹ کاردیومایوسیتی در رت های نر مسموم‌شده با پراکسید هیدروژن و درنهایت، کاهش مرگ سلولی شده است ($P\leq0.001$) (نمودار شمارهٔ ۱).

(الف)




(ب)




(ج)

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

## بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعهٔ حاضر به بررسی اثر تمرین هوازی در آب و مصرف کروسین بر بیان ژن های پیش آپوپتوزی Apaf-1، سیتوکروم C و کاسپاز ۹ کاردیومایوسیتی در رت های نر مسموم‌شده با پراکسید هیدروژن پرداخته شد که بر اساس نتایج پژوهش، شش هفته تمرین هوازی در آب و مصرف کروسین کاهش بیان ژن های درگیر در مسیر میتوکندریایی آپوپتوز را به همراه داشت.

مدارک و شواهد نشان می دهد که انواع فعالیت های ورزشی آثار متفاوتی بر آپوپتوز کاردیومایوسیتی می گذارد (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 عضلهٔ قلب رت ها به همراه داشت و با نتایج مطالعهٔ حاضر همسو بود (۲۰). از سوی دیگر، اولا 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

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام /دی ۱۴۰۱، دوره ۳۰، شماره ۵، ۱۱۱-۱۰۱

تمرین هوازی موجب افزایش چشمگیر بیان ژن‌های AIF و کاسپاز ۹ عضلهٔ نعلی موش های صحرایی نر شد (۳۶).

بر اساس این نتایج متناقض می توان به این نتیجه رسید که سطح بیان ژن های مسیر آپوپتوز همیشه الگوی یکسانی از پاسخ به ورزش را نشان نمی دهد. فعالیت ورزشی توانایی‌ای دارد که تکثیر و مرگ سلولی را از طریق سایتوکین ها، هورمون ها، عامل‌های رشد و مسیرهای متابولیک تعدیل می کند (۳۷). اخیراً شواهدی برای آپوپتوزیس ناشی از ورزش موجود است که در لنفوسیت و عضله حادث می شود؛ برای مثال، گلوکوکورتیکوئیدها، جز واکنشی اکسیژن، افزایش در سطوح Ca2+ درون‌سلولی و عامل نکروزدهندهٔ تومور برخی از سیگنال هایی اند که می توانند سبب آپوپتوزیس گردند. ROS از طریق اکسیداسیون بازهای پورین و پیریمیدین و به‌ویژه گوانین به DNA صدمه می‌زند و باعث مرگ سلول می شود و آپوپتوزیس سبب از بین رفتن سلول های تارهای عضلانی آتروفی‌شده می گردد (۳۸)؛ بنابراین، انجام یک برنامهٔ تمرینی با حجم بالا و در مدت طولانی می تواند 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 می گردد 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 می رسد که افزایش شدت تمرین با بالا بردن فشار سوخت‌وساز، موجب افزایش فشار اکسیداتیو می‌شود و همین فشار اکسیداتیو که نتیجهٔ آن افزایش رادیکال های آزاد است، موجب پیش‌برد و افزایش پیام‌رسانی آپوپتوتیک منجر می گردد (۴۱).

کروسین آثار فارماکولوژیک متعدد ازجمله 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 القاشده با H2O2 که به‌صورت متراکم شدن هسته، ایجاد جوانه در سطح غشا و تشکیل اجسام آپوپتوتیک است، به‌صورت معنی داری جلوگیری نموده است؛ پس به این نتیجه رسیدند که کروسین اثر پیشگیری‌کننده بر آپوپتوز سلولی القاشده با H2O2 دارد (۴۴). بوچانگ و همکاران (۲۰۱۵) در تحقیقی با عنوان «تأثیر کروسین در برابر آسیب ناشی از H2O2 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 می یابد (۴۶). پژوهش های اندکی تأثیر هم‌زمان فعالیت ورزشی و کروسین را بر عوامل آنتی اکسیدانی مطالعه کرده اند. مرادی و همکاران (۲۰۱۹) به بررسی تأثیر تمرینات شنا و مصرف کروسین بر مسیر آپوپتوز ذاتی در عضلهٔ اسکلتی رت ها 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 ژن های پروآپوپتوتیک پرداختند و نتایج بیانگر افزایش بیان ژن Bcl-2 در بافت قلب در اثر تمرین استقامتی همراه با مصرف کروسین بود (۲۹) که شیوهٔ تمرین در این مطالعه با

پژوهش ما متفاوت بود. به‌نظر می رسد، تمرین در آب نسبت به تمرین بر تردمیل، فشار کمتری را بر مفاصل وارد می کند و تحمل وزن و نیروی ایستایی در آب کمتر از خشکی است (۴۷). با در نظر محدودیت های موجود در پژوهش حاضر محققان نتوانستند پروتئین‌های مسیر آپوپتوزی را بسنجند و تنها به اثر ترکیبی تمرین و مکمل بر سطوح بیان ژن‌های پیش آپوپتوزی پرداختند؛ ازاین‌رو، پیشنهاد می‌شود که در مطالعات آینده از روش‌های اندازه‌گیری دیگر مانند وسترن بلات برای سنجش نشانگرهای آپوپتوزی استفاده گردد؛ همچنین با توجه به تأثیر ROS و کاسپازها بر شروع آپوپتوز میتوکندری و آثار آنتی اکسیدانی کروسین به‌نظر می‌رسد یکی از محدودیت‌های این مطالعه اندازه‌گیری نکردن سطوح اکسیدان و آنتی اکسیدان باشد؛ بنابراین، پیشنهاد می‌شود مطالعات آتی 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 به‌گونه‌ای در بخش اجرای پژوهش در آزمایشگاه یاری نمودند، تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

## تعارض منافع

نویسندگان تضاد منافعی را اعلام نکردند.

**کد اخلاق:** IR.SSRI.REC.1397.254

# References

1. 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.
2. Young IS, McEneny J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. Biochem Soc Trans 2001;29:358-62. doi: 10.1042/bst0290358.
3. 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
4. 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.
5. Khalatbary AR. Apoptosis in neurodegenerative diseases. J Gorgan Uni Med Sci 2014;16:1-1. (persian)
6. 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: 10.2174/13894501166661 50202155915
7. Phaneuf S, Leeuwenburgh C. Apoptosis and exercise. Med Sci Sports Exerc 2001;33:393-6. doi: 10.1097/00005768-200103000-00010.
8. 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.
9. Bezzerides V, Rosenzweig A. Saying yes to exercise and NO to cardiac injury. Circ Res 2011; 108:1414-16. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.247122.
10. 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.
11. Haykowsky MJ. Left ventricular remodelling and the athlete's heart: time to revisit the Morganroth hypothesis. J Physiol 2011;589:5915-23. doi: 10.1113/jphysiol.2011.221903.
12. 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.
13. 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/ japplphysiol.00605.2011.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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/antiox 10030452.
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, Pucsok 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. Favaloro 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-κB. 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.