JAHSSP
Archive of SID

http://jahssp.azaruniv.ac.ir/
http://dx.doi.org/10.22049/jassp.2020.26601.1256

مطالعات کاربردی تندرستی در فیزیولوژی ورزش
سال ششم، شماره دوم ؛
پاییز و زمستان ۱۳۹۸؛ صفحات ۹۵-۸۶

مقاله پژوهشی

اثر ترکیبی تمرین هوازی با عصاره زعفران بر برخی فاکتورهای تنظیمی آپوپتوز عضله نعلی موش های صحرایی نر فعالیت وامانده ساز متعاقب هوازی

امیر خسروی[۱*]

تاریخ دریافت: ۹۸/۰٤/۰۸ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۲/۲٦

چکیده

زعفران سرشار از ترکیبات آنتی اکسیدانی بوده که قادر به بلوکه کردن آپوپتوز ناشی از فعالیت های ورزشی وامانده ساز می باشد. تحقیق حاضر به منظور تعیین اثر ترکیبی تمرین هوازی با عصاره زعفران بر برخی فاکتورهای تنظیمی آپوپتوز عضله نعلی موش های صحرایی نر متعاقب فعالیت وامانده ساز هوازی انجام شد. در این مطالعهٔ تجربی، ۴۸ سر رت نر نژاد ویستار به‌صورت تصادفی به چهار گروه مساوی: G1؛ دارونما (بدون تمرین)، G2؛ مکمل (بدون تمرین+ ۱۰۰ میلی گرم عصاره آبی زعفران)، G3؛ تمرین (۸ هفته تمرین استقامتی)، و G4؛ ترکیبی (۸ هفته تمرین استقامتی + ۱۰۰ میلی گرم عصاره آبی زعفران) تقسیم شدند. در پایان تحقیق نیمی از موش‌ها بلافاصله پیش و نیمی‌دیگر بلافاصله پس از وامانده شدن بر روی نوار گردان، قربانی شدند. بیان ژن های bax و bcl-2با استفاده از روش Real-time PCR سنجیده شدند. داده‌ها با استفاده از روش آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه، در سطح معناداری ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند. نتایج نشان داد پیش از وامانده سازی بیان پروتئین bcl-2 و نسبت bax به bcl-2 گروه های G3 و G4 به طور معنی داری به ترتیب بیشتر و کمتر از دیگر گروه ها بود (p<۰/۰۵). همچنین متعاقب وامانده‌سازی بیان پروتئین های Bax و bcl-2 عضله نعلی موش های تمامی گروه ها بجز گروه G4 به ترتیب به طور معنی داری افزایش و کاهش نشان داد در حالی که نسبت Bax به bcl-2 افزایش یافت (p<۰/۰۵). در کل هشت هفته تمرین هوازی به تنهایی و با ترکیب با مصرف عصاره زعفران موجب افزایش معنی دار بیان پروتئین bcl-2 عضله نعلی موش ها می شود. همچنین تمرین هوازی توام با مصرف عصاره زعفران از افزایش بیان پروتئین Bax و نسبت Baxبه bcl-2 متعاقب یک وهله فعالیت وامانده ساز جلوگیری می کند.

واژه‌های کلیدی: فعالیت هوازی حاد وامانده ساز ،Bax ، bcl-2 ، عصاره زعفران.

با اسکن QR فوق می‌توانید جزئیات مقاله حاضر را در سایت www.jahssp.azaruniv.ac.ir/. مشاهده کنید.

۱. استادیار گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه آیت الله العظمی بروجردی (ره) ، بروجرد، ایران. (نویسنده مسئول):
STU_KHOSRAVI1@yahoo.com

تمامی حقوق این مقاله بازمتن برای دانشگاه شهید مدنی آذربایجان محفوظ است.

نحوه ارجاع: امیر خسروی. اثر ترکیبی تمرین هوازی با عصاره زعفران بر برخی فاکتورهای تنظیمی آپوپتوز عضله نعلی موش های صحرایی نر فعالیت وامانده ساز متعاقب هوازی. دو فصلنامه مطالعات کاربردی تندرستی در فیزیولوژی ورزش ۱۳۹۸؛ ۶(۲): ۹۵-۸۶.

www.SID.ir

JAHSSP
Archive of SID

http://jahssp.azaruniv.ac.ir/
http://dx.doi.org/10.22049/jassp.2020.26601.1256

Journal of Applied Health Studies in Sport Physiology
Volume 6, Number 2
Autumn/Winter 2019
86-95

Original Article

The combined effect of aerobic exercise with Saffron extract on some indices of soleus muscle apoptosis regulatory factors of male rats following an aerobic exercise until exhaustion

Amir khosravi[1*]

Received June 29 2019; Accepted March 16 2020

Abstract

Saffron has high levels of antioxidant compounds are able to Inhibition of apoptosis induced by exercise to exhaustion. The present study aims to investigate the effect of the combined effect of aerobic exercise with Saffron extract on some indices of soleus muscle apoptosis regulatory factors of male rats following an aerobic exercise until exhaustion. 48 Wistar male rats were assigned into following four groups (N=10) :G1) placebo ،without exercise :G2) supplement ،without exercise+ Saffron extract, 100 mg/kg :G3) exercise ،8 weeks exercise: G4) combination ،8 weeks exercise + Saffron extract, 100 mg/kg. The end of experiment, half of the rats was killed immediately before exhaustive exercise; on the other hand remaining rats were killed immediately after performing an acute bout of exhaustive exercise on the treadmill. Bax and Bcl2 genes expression were analyzed through the Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). The data were analyzed using a one-way ANOVA, with the significance level of $P < 0.05$.The results showed that prior exhaustive bcl-2 gene expression and Bax/Bcl2 ratio of the G3 and G4r groups were significantly mor and lower than the other groups respectively ($P < 0.05$). As well as, in the all groups except G4, the bax and bcl-2 protein expression increased and decreased, respectively while bax/bcl-2 ratio increased following an exhausting exercise ($P < 0.05$). In general, 8 weeks aerobic training only and combinational, with use of saffron extract significant increase bcl-2 expression in soleus muscle of rats. As well as the use of saffron extract with aerobic exercise prevented the increase of Bax gene expression and Bcl-2/Bax ratio following an exhausting exercise.

Keywords: aerobic exercise until exhaustion, Bcl-2, Bax , Saffron extract.

Scan this QR code to see the accompanying video, or visit jahssp.azaruniv.ac.ir

۱ Assistant Professor ،Department of Physical Education and Exercise Science ،Faculty of Humanities Ayatollah Ozma Borujerdi University, Borujerd ،Iran.
STU_KHOSRAVI1@yahoo.com

All rights are reserved for Azarbaijan Shahid Madani University.

Cite as: Amir khosravi. The combined effect of aerobic exercise with Saffron extract on some indices of soleus muscle apoptosis regulatory factors of male rats following an aerobic exercise until exhaustion. *Journal of Applied Health Studies in Sport Physiology*. 2019; 6(2): 86-95.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

انجام برنامه های تمرینی با کاهش خطر بیماریهای قلبی عروقی، متابولیکی، هورمونی، سرطان و... در سنین مختلف همراه است. به هرحال برای سازگاری به تمرین در جهت رسیدن به اهداف اختصاصی تمرین، اجرای وهله های فعالیت حاد ورزشی به صورت اضافه بار تدریجی و نسبتاً شدید ضروری است. با این وجود، فعالیت حاد ورزشی می تواند سبب ایجاد واکنشهای استرسی و تغییرات ناخواسته قابل ملاحظه پاتولوژیکی شامل واکنشهای التهابی و آپوپتوزیسی، نه تنها در عضلات اسکلتی، بلکه در بافتهای دیگری نظیر قلب، کلیه، کبد، لنفوسیتها و روده نیز شود (۱). مطالعات قبلی بر این باور بودند که آسیب ایجاد شده از فعالیت ورزشی حاد، ناشی از فرایندهای التهابی و نکروتیک بوده است اما شواهد اخیر اهمیت آپوپتوز در حین و پس از فعالیت حاد ورزشی شدید بر آسیب اغلب بافت ها به ویژه عضلات اسکلتی، قلبی و لنفوسیت ها را نشان می دهد (۱). آپوپتوز یا مرگ برنامه ریزی شده سلول، روشی فیزیولوژیک برای از بین بردن سلولهای آسیب دیده یا پیر و هومئوستاز بافتی می باشد که به طور کلی از دو مسیر خارجی و داخلی سلول را تحت تأثیر قرار داده و از بین می برد. در مسیر خارجی پیامهای مرگ سلولی نظیر IL-1β[1]، TNF-α[2] ، FasL[3] به گیرنده های مرگ غشای سلول، TNFR1[5]،TNFR2[4]، Fas TRAIL متصل می شوند و موجب فعال سازی کاسپاز۸[6] و در نهایت آپوپتوز سلولی می گردند (۲). در مسیر داخلی، میتوکندری و رتیکلوم اندوپلاسمیک محوریت فرایند را دارند که تحت تأثیر عوامل استرسی مثل گلوکوکورتیکوئیدها، سیتوکین ها، اکسید نیتریک و گونه های اکسیژن فعال[7] (ROS) با فعال کردن کاسپازها، آپوپتوز را القا میکنند (۲). مسیرهای پیام رسانی مختلفی سلول را به سوی مرگ برنامه ریزی شده یا آپوپتوز می برند که در این فرآیند پروتئین های ویژه ای به عنوان فاکتورهای آپوپتوزی نقش دارند. این پروتئین ها عاملی هستند که در نهایت ترکیبات کلیدی سلول همچون پروتئین های ساختاری اسکلت سلولی و پروتئین های هسته ای را تخریب می کنند. پروتئین های خانواده Bcl-2 مهمترین این نوع پروتئین ها در تنظیم آپوپتوزیس هستند که به دو نوع پروتئین های جداگانه ضد آپوپتوزی (Bcl-2–Bcl-XL) و پیش آپوپتوزی (Bax, Bid) تقسیم می شوند. حساسیت سلول به آپوپتوز به تعادل و نسبت فاکتورهای پیش آپوپتوزی و ضد آپوپتوزی بستگی دارد و در حقیقت نسبت متوسط این پروتئین ها سرنوشت سلول را تعیین می کند. عنوان شده است که فعالیت ورزشی حاد میتواند از طریق تغییر و تعدیل فاکتورهای مختلف موجب تغییر روند آپوپتوزیس گردد (۳, ۴). به عنوان مثال افزایش سطوح گلوکوکورتیکوئیدها، سایتوکاینها، فاکتور نکروز دهنده تومورآلفا[8](TNF-α)، اکسید نیتریک و ROS، ناشی از ورزش حاد میتوانند مرگ برنامه ریزی شده سلول را القا کند و از طرفی افزایش کنترل نشده سطوح کلسیم داخل سلولی یا تغییرات نفوذپذیری میتوکندری، تحت تأثیر فاکتورهای مهمی مثل Bax وp53 آپوپتوز را ایجاد کنند (۱). در خصوص اثر فعالیت ورزشی حاد بر آپوپتوز سلولی، مطالعات انگشت شماری تاکنون انجام شده است که اغلب بیانگر ایجاد آپوپتوز سلولی در فعالیت ورزشی با شدتهای متوسط به بالا می باشد (۳, ۴). از جمله، سان[9]و همکاران (۲۰۱۶) لی و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که سطوح بیان ژن های Bax و Bcl-2 پس از یک وهله فعالیت وامانده ساز به طور معنی داری به ترتیب افزایش و کاهش می یابد. همچنین نسبت Bax به Bcl-2افزایش می یابد (۳, ۴). افزایش کنترل نشده آپوپتوزیس ممکن است موجب از دست رفتن بیش از حد سلول شده، و عملکرد بافتها را تحت تأثیر قرار داده و روند ریکاوری بافتی را دچار اختلال کند (۵). در حال حاضر ورزشکاران با استفاده از روش های مختلفی از اثرات منفی آپوپتوز بر عملکرد جلوگیری می کنند. یکی از این راه کارهای موثر و مرسوم، مصرف داروهای غیر استروئیدی ضد التهابی[10]NSAID و یا مکمل های سنتزی آنتی اکسیدانی می باشد (۶). اما ثابت شده که مصرف طولانی مدت داروها ضد التهابی با اثرات نامطلوبی، مثل حالت تهوع، استفراغ، اسهال، یبوست و کم آبی بدن، کاهش اشتها، خارش، سردرد، خواب‌آلودگی، مشکلات معده ای و روده ای، نارسایی کلیه، نارسایی کبد، زخم معده، خون‌ریزی طولانی‌مدت، ادم مخصوصاً تورم زانو و اثرات نامطلوب قلبی عروقی همراه می باشد. همچنین در افرادی که به مصرف NSAID ها حساسیت دارویی دارند ممکن است علائم آسم و آلرژی بروز کند (۷). همچنین داروهای آنتی اکسیدانی اثرات نامطلوبی من جمله، اختلال در سازگاریهای بافت های عروقی و عضلات اسکلتی به تمرینات ورزشی (از طریق بلوکه کردن سیگنالهای درون سلولی)، آلوده بودن به مواد ممنوعه و تسریع روند استرس اکسایش داشته باشند (۸). امروزه با توجه به اثرات نامطلوب مصرف داروهای ضد التهابی و آنتی اکسیدانی و از سویی علاقمندی ورزشکاران به مصرف مکمل های ضد التهابی و آنتی اکسیدانی با منشا طبیعی و عملکرد موثرتر این مکمل های طبیعی در جلوگیری و یا تقلیل اثرات مخرب واکنش های التهابی در مقایسه با داروهای ضد التهابی و آنتی اکسیدانی سنتزی، سهولت دسترسی، کاهش عوارض جانبی و قیمت مناسب، مکمل های طبیعی به عنوان جایگزین های شایسته برای داروهای صناعی، همواره مورد بحث بوده و اخیرا به طور خاص مورد توجه محققین قرار گرفته اند است (۹).

یکی از گیاهانی که دارای مصارف فراوانی در طب سنتی، تبخ غذا، صنایع غذایی و دارویی در دنیا، به دلیل ترکیبات مفید، رنگ، طعم و روش مصرف آسان است زعفران[11]می باشد. این گیاه منبعی غنی از ترکیبات آنتی اکسیدانی از جمله فلاونوئیدها، پروتئین ها، ویتامین ها (ریبوفلاوین و تیامین)، آمینواسیدها، مینرآلها، صمغ ها و همچنین کاروتنوییدهای مثل سافرنال، کروستین و کروسین می باشد (۱۰). با توجه به ترکیبات این گیاه اثرات شناخته شده ای در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری ها دارد (۱۰). در خصوص اثر زعفران و یا ترکیبات موثره آن بر آپوپتوزیس مطالعات بسیار محدودی انجام شده است. صادقی و همکاران (۲۰۱۷) در تحقیق با بررسی اثرات ضد آپوپتوزی کروسین عنوان کردند استفاده از یک وهله کروسین با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به صورت وابسته به دوز سطوح Bcl-2 و آنزیم‌های آنتی‌کسیدانی را افزایش و سطح بافتی Bax و مالون‌دی‌آلدئید را در بافت کبد جنین جوجه کاهش می دهد

[1] Interleukin 1 beta
[2] Tumor necrosis factor alpha
[3] Fas ligand
[4] Tumor necrosis factor receptor 2
[5] Tumor necrosis factor receptor 1
[6] Cysteine-dependent aspartate-directed protease 8
[7] Reactive oxygen species
[8] Tumor Necrosis Factor-α
[9] Sun
[10] non-steroidal anti-inflammatory drugs
[11] Crocus satious L

www.SID.ir

Archive of SID

(۱۱). همچنین الشربینی[1] و همکاران (۲۰۱۶) در تحقیق عنوان کردند مصرف روزانه ۱۰ و ۲۰ میلی گرم کروسین به مدت ۲۱ روز از آپوپتوز و استرس اکسیداتیو ناشی از دوکسی روبیسین را در سلول های قلبی از طریق تقویت سیستم آنتی اکسیدانی و خاصیت ضد التهاب کاهش می دهد (۱۲). رضوی و همکاران (۲۰۱۳) نیز در بررسی تأثیر زعفران و مواد مؤثره آن بر روی آپوپتوز بافت قلبی ایجاد شده با دیازینون عنوان کردند که مصرف ۴ هفته ای کروسین به میزان ۲۵ و ۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روز سبب محافظت قلب رت ها در برابر آپوپتوز از طریق کاهش پراکسیداسیون لیپید غشای بافت قلب، افزایش میزان گلوتاتیون همچنین کاهش نسبت، Baxبه Bcl2 می شود (۱۳). مطالعات اندک انجام شده در زمینه اثرات محافظتی مصرف عصاره زعفران بر آپوپتوزی در شرایط القاء آپوپتوز با مواد شیمیای انجام شده است، در حالی که مکانیسم های که ورزش های وامانده ساز منجر به آپوپتوز به سلول های مختلف از جمله سلول های عضلانی شده و منجر به آپوپتوز سلولی می شوند بسیار متنوع و متفاوت تر از این روش می باشند. با توجه به اینکه انجام فعالیت ورزشی با شدت بالا برای اغلب ورزشکاران در راستای رعایت اصل اضافه بار تمرینی و سازگاریهای فیزیویوژیکی امری اجتناب ناپذیر است، تمرینات هوازی با شدت بالا نیز بخش اصلی فعالیت ورزشی را تشکیل می دهد و از سویی خطرات شناخته شده اینگونه تمرینات بر سلول های مختلف که ورزشکاران را مجبور به استفاده از مکمل های دارویی جهت کاهش عوارض ناشی از آپوپتوز سلولی کرده است. همچنین عوارض نامطلوب مصرف داروهای صناعی، معرفی مکمل های گیاهی شناخته شده برای عموم مثل زعفران، که دارای رنگ ، طعم، بو، قابلیت استفاده در روش های مختلف، در دسترس، اثرات مثبت اثبات شده ضد آپوپتوزی، بدون عوارض جانبی در دزهای مجاز، برای کاهش اثرات مخرب ناشی از تمرینات وامانده ساز بر آپوپتوز سلولی، بسیار مفید و ضروری می باشد. بنابراین معرفی زعفران برای کاهش اثرات مخرب تمرینات وامانده ساز برای ارائه به افراد درگیر در این گونه تمرینات می تواند در جلوگیری از بروز صدمات احتمالی ناشی از آپوپتوز سلولی و پیامدهای نامطلوب اینگونه تمرینات به حفظ و ارتقای سلامتی افراد در گیر در اینگونه تمرینات، و احتمالا جلوگیری و یا کاهش هزینه های درمانی مفید می باشد. همچنین افزایش دانش در زمینه اثر فعالیت ورزشی حاد شدید بر آپوپتوزیس و نقش مکمل زعفران بر آن به نظر مهم میرسد. در نتیجه، مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر هشت هفته تمرین هوازی و مصرف همزمان عصاره آبی کلاله زعفران بر برخی فاکتورهای تنظیمی آپوپتوز عضله نعلی موش صحرایی نر در حالت استراحت و متعاقب فعالیت وامانده ساز هوازی انجام شد.

روش پژوهش

پژوهش حاضر، به روش مطالعه ی تجربی بر روی۶۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی۲۴۰ –۲۰۰ انجام شد. موش ها از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی لرستان تهیه شد. برای نگهداری موشهای صحرایی از قفسهای جنس پلی کربنات شفاف با قابلیت اتو کلاو استفاده شد. برای جذب ادرار و مدفوع حیوانات و راحتی آنها از تراشه و بریده های چوب استریل استفاده شد. یک روز در میان شستشوی قفسها انجام شد و تراشه های چوب نیز تعویض گردید. دمای مطلوب سالن نگهداری حیوانات ۲۰ تا ۲۴ درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی حدود ۵۵ تا ۶۵ درصد کنترل و ثبت شد. چرخه روشنایی تاریکی نیز هر ۱۲ساعت یکبار به طور دقیق توسط تنظیم کننده الکترونیکی نور سالن نگهداری حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد. طی دوره پژوهش، موشها به آب و غذای مخصوص حیوانات آزمایشگاهی دسترسی آزادانه داشتند. یک هفته پس از انتقال موشها به محیط آزمایشگاهی به منظور غربالگری موش ها مجبور به دویدن با سرعت ۱۶/۶ متر بر دقیقه و به مدت ۵ دقیقه بر روی تردمیل ۱۲ کاناله TURBO T310 ساخت کره شدند. ۴۸ سر موش صحرایی با وزن تقریبی ۸±۲۱۲ گرم که توانایی دویدن در این سرعت را داشتند انتخاب شده و پس از همسان سازی وزن به صورت تصادفی به ۴ گروه (هر گروه ۱۲ سر موش) G1 : گروه دارونما (بدون تمرین+ ۲ میلی لیتر آب مقطر)، G2: گروه مکمل (بدون تمرین+ ۱۰۰ میلی گرم عصاره آبی زعفران + ۲ میلی لیتر آب مقطر)، G3: گروه تمرین (۸ هفته تمرین استقامتی + ۲ میلی لیتر آب مقطر)، و G4: گروه ترکیبی، تمرین + مکمل (۸ هفته تمرین استقامتی + ۱۰۰ میلی گرم عصاره زعفران + ۲ میلی لیتر آب مقطر) تقسیم شدند. گروه های G3 و G4 به مدت هشت هفته، پنج جلسه تمرین در هفته (روزهای پنج شنبه و جمعه تمرین انجام نمی شد)، بر روی نوارگردان (شیب صفر درجه) دویدند. در جدول شمارهٔ ۱، جزئیات پروتکل تمرینی ارائه شده است. در ابتدا و انتهای هر جلسه تمرین موش ها جهت گرم و سرد کردن در هر مرحله به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۶/۶۶ می دویدند (۱۴). همچنین موش های گروه های G1 و G2 همزمان با برنامه تمرینی هفته هشتم دو گروه دیگر (یک هفته پیش از وامانده شدن) به مدت ۱ هفته، ۵ روز متوالی هفته و هر روز یک جلسه (بین ۵ تا ۱۵ دقیقه) با سرعت ۱۶/۶ تا ۲۰ متر بر دقیقه بر روی تردمیل با شیب صفر درصد دویدند (۱۴). در انتهای هفته هشتم تحقیق متعاقب ۷۲ ساعت استراحت پس از آخرین جلسه تمرین نیمی از موش های هر چهار گروه (هر گروه ۶ سر و در مجموع ۲۴ سر موش) به طور تصادفی انتخاب و پس از بیهوشی جراحی شدند و نیم دیگر باقی مانده از موش های تمامی گروه ها وامانده شده (هر گروه ۶ سر و در مجموع۲۴ سر موش) و بلافاصله بیهوش سپس جراحی شدند. وامانده سازی بدین شکل بود که ابتدا به مدت ۳ تا ۵ دقیقه با سرعت ۸ متر در دقیقه موش ها بر روی تردمیل دویدند و سپس سرعت نوار گردان طوری افزایش یافت تا سرعت به ۲۰ متر بر دقیقه رسید. در این مرحله موش ها به مدت ۵ دقیقه دویده و سپس سرعت نوار گردان به ۲۵ متر در دقیقه افزایش یافت. در این مرحله نیز به مدت ۱۰ دقیقه دویدند در انتها سرعت نوار گردان به ۳۰ متر در دقیقه افزایش یافت و این سرعت تا زمان رسیدن آزمودنی به واماندگی حفظ شد. این پروتکل فزاینده وامانده ساز با توجه به هزینه انرژی طراحی شده و شدت آن در زمان واماده شدن تقریبا ۷۰ تا ۹۴ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی بود (۱۵). زمانی که موش ها در هر مرحله از وامانده سازی سه بار به شوک الکتریکی تعبیه شده در ابتدای تردمیل واکنش نمی دادند و به حالت خوابیده به پشت باقی می ماندند وامانده محسوب شده و بلافاصله جراحی می شدند (۱۵).

نحوه تهیه و خوراندن عصاره آبی زعفران بدین شکل بود که کلاله خشک زعفران[2] خوراکی معروف به زعفران پوشالی از قائنات تهیه شد. سپس برای آماده کردن عصاره آبی زعفران از روش خیساندن[3] استفاده شد. به این ترتیب که پس از ریختن کلاله خشک شده

[1] Elsherbiny

[2] Crocus sativus L

[3] Maceration method

www.SID.ir

Archive of SID

زعفران در داخل ظرف شیشه‌ای استوانه‌ای (بشر) به ازای هر ۱ گرم کلاله زعفران ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر به ظروف اضافه گردید و به مدت

جدول ۱ . برنامه تمرینی گروه‌ها در طی مداخله

گروه		تعداد جلسات تمرین در هفته	مدت هر جلسه تمرین بر حسب دقیقه	سرعت بر حسب متر بر دقیقه
گروه های G1 (دارونما) و G2 (مکمل)	یک هفته آشنایی با دویدن بر روی تردمیل	۵ جلسه	۵ تا ۲۵	۱۶/۶ تا ۲۰
گروه های G3(تمرین) و G4 (ترکیبی تمرین +مکمل)	هفته اول	۵ جلسه	۲۵	۲۰
	هفته دوم	۵ جلسه	۳۰	۲۰
	هفته سوم	۵ جلسه	۳۵	۲۱/۶۶
	هفته چهارم	۵ جلسه	۴۰	۲۱/۶۶
	هفته پنجم	۵ جلسه	۴۵	۲۳/۳۲
	هفته ششم	۵ جلسه	۵۰	۲۳/۳۲
	هفته هفتم	۵ جلسه	۵۵	۲۴/۹۸
	هفته هشتم	۵ جلسه	۶۰	۲۴/۹۸

۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد بر روی دستگاه چرخاننده به آرامی مخلوط گردیده تا استخراج به خوبی صورت گیرد. سپس مخلوط حلال و گیاه توسط صافی از هم جدا تا عصاره اولیه بدست آید. عصارهٔ اولیه وارد دستگاه تقطیر در خلاء گردیده و در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد حلال آنها به آرامی تبخیر گردید و عصاره تغلیظ شده بدست آمد. محلول حاصل به مدت دو هفته در دستگاه بن‌ماری با دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا حلال عصاره نیز به آرامی تبخیر شده و پودر عصاره به جا بماند (۱۶). پودر عصاره‌ها تا زمان استفاده در فریزر و در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. موشهای گروه مکمل و گروه ترکیبی تمرین +مکمل عصاره زعفران را به میزان ۱۰۰میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در ۲ میلی لیتر آب مقطر حل شده، روزانه یک وهله راس ساعت ۸ صبح و ۷ روز هفته به مدت ۸ هفته از طریق گاواژ دریافت کردند. همزمان به موشهای گروه دارونما و گروه تمرین نیز روزانه به همان میزان ۲ میلی لیتر آب مقطر به عنوان حلال عصاره زعفران گاواژ شد (۱۷). در انتهای پروتکل هشت هفته ای پژوهش وزن حیوانات ازطریق ترازوی دیجیتالی ۰/۰۱ (ساخت کشور ژاپن) اندازه گیری شد. بدین شکل که وزن همهٔ موشهای صحرایی ۲۴ ساعت قبل از جراحی از طریق این نوع ترازو اندازه گیری و ثبت شد.

جراحی و استخراج نمونه ها

جهت اندازه گیری میزان Bcl-2 و Bax تمامی موش ها در دو مرحله جراحی شدند. مرحله اول (بلافاصله پیش از وامانده سازی) ؛ در انتهای ۸ هفته تمرین متعاقب ۷۲ ساعت عدم فعالیت ورزشی نیمی ازتمامی موش ها (هر گروه ۵ سر و در مجموع۲۰ سر موش) مرحله دوم؛ در انتهای ۸ هفته تمرین متعاقب ۷۲ ساعت عدم فعالیت ورزشی نیم باقی مانده دیگر پس از وامانده سازی با داروی دی اتیل اتر بیهوش شدند (بیهوشی با استفاده از محفظه شیشهای درب دار محتوی پنبه آغشته به دی اتیل اتر انجام شد که پس از گذشت ۳-۵ دقیقه حیوان در بیهوشی مناسب قرار میگرفت). سپس توسط متخصصین کارآزموده جراحی انجام و عضله ی نعلی آنها استخراج و در مایع فیزیولوژیک انداخته شد. عضله ی نعلی موش ها برای بررسی میزان بیان ژنی یا mRNA پروتئینهای Bax، Bcl -۲ در دمای منفی۷۰ درجه نگهداری شد.

استخراج RNA

برای استخراج RNA از نمونه ها، طبق روش پیشنهادی کیت (Thermo,K0731, USA) و با اندکی تغییر مطابق شیوه **سیاه کوهیان و همکاران (۱۳۹۶)** (۱۸) حدود ۵۰ میلیگرم از بافت عضله ی نعلی با استفاده از یک میلی لیتر AccuZol (Bioneer, South Korea) هموژنه شده و در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه انکوبه گردید . پس از اضافه کردن۰/۲ میلی لیتر کلروفروم به هر میکروتیوب و تکان دادن آن با دست به مدت ۱۵ ثانیه، میکروتیوب ۵ دقیقه دردمای ۴ درجه انکوبه گردید و در ادامه به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط ۴ درجه و ۱۳۷۰۰ g سانتریفیوژ شد. سپس به دقت و بدون تکان دادن تیوب، قسمت بالایی که حاویRNA بود، جدا شده و به میکروتیوب دیگری انتقال داده شد . به محلول جدا شده حجم مساوی از ایزوپروپانول سرد اضافه گردید و برای ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰ -درجه انکوبه شد. سپس، میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه و ۱۳۷۰۰ g سانتریفیوژ شده، مایع روئی بیرون ریخته شد و یک میلی لیتر اتانول ۸۰ درصد به میکروتیوب اضافه گردید. بلافاصله میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه در شرایط ۴ درجه و ۱۳۷۰۰ gسانتریفیوژ شده، مایع رویی آن بیرون ریخته شد و به دقت اتانول خالی شد و حدود ۲۰ دقیقه اجازه داده شد تا الکل تبخیرگردد. سپس در آب تیمار شده با دی اتیل پیروکربنات (DEPC) حل شد. پس از استخراج RNA مقدار و خلوص آن توسط روش اسپکتروفتومتری (Bio-Rad, CA, USA) تعیین گردید. همچنین، RNA تام به وسیله الکتروفورز روی ژل آگاروز حاوی اتیدیوم بروماید قرار گرفت و دو باند مشخص ۱۸ s و۲۸ s مربوط به RNA ریبوزومی مشاهده و کنترل شد. RNA استخراج شده جهت استفاده در مراحل بعدی در دمای ۸۰- درجه نگهداری شد.

ساخت cDNA

طبق دستورالعمل کیت (Fermentas, Canada) Revert AID™ Firs Standard cDNA synthesis یک میکرولیتر RNA و یک میلکرو لیتر از DNase I reaction buffer 10X در یک تیوب ۱/۵ میلی لیتری ریخته شده و توسط DEPC-traeted water به حجم ۹ میکرولیتر رسید. برای از بین بردن آلودگی احتمالی با DNA یک میلکرولیتر Dnaseبه تیوب اضافه و پس از افزودن یک میلی لیتر از اتانول مطلق تیوب مربوطه به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر -۷۰ درجه قرار گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

سپس به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط ۴ درجه و g ۱۴۰۰۰ سانترفیوژ شد و پس از آن در زیر هود به دقت اتانول آن خالی شده و حدود ۱۰ دقیقه اجازه داده شد تا الکل تبخیر گردد. به تیوب یک میلکرولیتر DEPC-traeted water –و یک میلکرو لیتر پرایمر oligi (dt) یا پرایمر Random hexamer افزوده شد و ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه بر روی Dry block انکوبه گردید. چهار میکرولیتر reaction buffer 5X و دو میکرولیترdNTP 10mM mix و یک میلکرولیتر Transcription Ribo lock Ribo nuclease Inhibitor به تیوب افزوده شد و پس از سانترفیوژ مختصر به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه گردید. یک میلکرولیتر آنزیم Rverert Aid ™ H Minus M-MuLV Reverse به تیوب افزوده شد. در ادامه در صورت استفاده از پرایمر oligi (dt) ۶ دقیقه در ۴۲ درجه و در صورت استفاده از پرایمر Random hexamerابتدا ۵ دقیقه در ۲۵ درجه و به دنبال آن ۹۰ دقیقه در ۴۲ درجه انکوباسیون صورت گرفت واکنش با قرار دادن تیوب به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه پایان پذیرفت و نمونه در فریزر ۷۰- درجه نگهداری شد.

Real-time PCR

اندازه گیری میزان بیان ژنی پروتئین های Bax، Bcl-2 با استفاده از دستگاه-gene Corbett-Rotor (Corbett Research Australia) 6000انجام گردید . جفت پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از نرم افزار Primer3 طراحی و توسط بایونیر (Bioneer-Germany) سنتز شد و با غلظت نهایی ۸۰ nm مورد استفاده قرار گرفت.

پرایمرها

واکنشها بر مبنای استفاده از رنگ Syber green انجام شد. رنگ Syber green طی واکنشReal-time PCR به DNA دو رشتهای متصل شده و نور فلورسنت ساطع می کند. به عنوان بلانک از تیوبی که حاوی همه مواد موجود در واکنش به جز cDNA بود، استفاده شد و به جای cDNA به تیوب مربوطه، DEPC water اضافه گردید .پس از اتمام واکنش تکثیر، برای هر واکنشPCR یک نمودار رسم و سپس بر این اساس CT تعیین شد .در پایان قبل از آنالیز داده ها، منحنی ذوب (Melting curve) بدست آمده از هر واکنشReal-time PCR بررسی شد تا پیک مربوط به ژن مورد نظر و فقدان پرایمر دایمر تایید شود. برای آنالیز داده ها ابتدا ΔCt ژن در هر نمونه از افتراق Ct ژن مربوطه و Ct ژن B-actin به عنوان رفرنس محاسبه شد.

روش تجزیه وتحلیل اطلاعات

از آمار توصیفی برای تعیین شاخصهای مرکزی (میانگین) و پراکندگی (انحراف استاندار) استفاده شد. پس ازتأیید توزیع نرمال داده ها با استفاده از آزمون کولموگروف - اسمیرنف[1] داده های خام توسط نرم افزار آماری SPSS نسخه ی ۱۶ و با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی[2] در سطح معنی داری P≤۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شد.

براساس آزمون کولموگروف – اسمیرنف، داده های حاصل از تمامی متغیرها در تمامی گروه ها، از توزیع طبیعی دارا هستند (p >۰/۰۵). جدول ۲ تغییرات وزن بدن موش های صحرایی را در گروه های مورد بررسی پس از دو بار توزین (ابتدا و انتهای تحقیق) نشان می دهد. میانگین وزن بدن تمامی گروه ها، در مرحله دوم نسبت به مرحله ی اول به طور معنی داری افزایش یافت که با توجه به افزایش سن موش های جوان، طبیعی بود (p<۰/۰۵). در ابتدای دوره تحقیق هیچ گونه اختلاف معنی داری بین وزن گروه های مختلف مشاهده نشد (p>۰/۰۵). با این وجود در پایان تحقیق این اختلاف مشاهده شد که میانگین وزنی گروه های G1 و G2 به طور معنی داری از گروه های G3 و G4 بیشتر بود (p<۰/۰۵). همچنین جدول ۲ میانگین زمان وامانده شدن موش های ۴ گروه را نشان می دهد، که این زمان در گروه های G4 و G3 به طور معنی داری از موش های گروه های G1 و G2 بیشتر بود (p<۰/۰۵). در ابتدای تحقیق تعداد ۱۲ سر موش به دلیل عدم توانایی در دویدن در سرعت ۱۶/۶ متر بر دقیقه بر روی تردمیل از تحقیق کنار گذاشته شدند.

جدول ۲. میانگین وزن و زمان وامانده شدن گروه های مختلف

شاخص	زمان اندازه‌گیری	گروه G1 (دارونما)	گروه G2 (مکمل)	گروه G3 (تمرین)	گروه G4 (تمرین+ مکمل)
وزن (بر حسب گرم)	پیش آزمون	۲۱۴/۱± ۸/۳	۲۱۶/۱ ± ۸/۹	۲۱۳/۹ ± ۹/۵	۲۱۱/٤ ± ۷/۱
	پس آزمون	۲۹۳/٦± ۱۹/٦*	۲۸۲/۹ ± ۱٦/٦*	۲۵۰/۳± ۱۱/٤*¥	۲٤۳/۲±۹/۵*¥
	سطح معنی‌داری	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
زمان وامانده شدن (دقیقه)		۱۸/۵ ±۸/۵L	۲٤/۳ ± ۵/٦	۷۰/۵ ±¥ ۱۰/٦	۸۳/۹±۱٤/۱¥ H

داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار می باشند؛ * اختلاف معنی دار بین دو مرحله اندازه گیری (درون گروهی). ¥ اختلاف معنی‌دار با گروه های G1 و G2 (سطح معنی‌داری p<۰,۰۵). L و H به ترتیب کمترین و بیشترین میزان نسبت به سایر گروه‌ها.

Bcl-2

میزان بیان ژن Bcl-2 عضله نعلی موش های گروه G4 (گروه ترکیبی۸ هفته تمرین + مصرف عصاره) نسبت به تمامی گروه ها (در حالت استراحت پس از دوره ۸ هفته ای تحقیق، پیش از وامانده سازی) و گروه G3 (۸ هفته تمرین استقامتی) نسبت به گروه های G1 (دارونما) و G2 (مکمل) به طور معنی داری بیشتر بود (p<۰/۰۵). همچنین متعاقب یک وهله فعالیت حاد استقامتی نسبت به پیش از وامانده سازی بیان ژن Bcl-2 تمامی گروه ها بجز

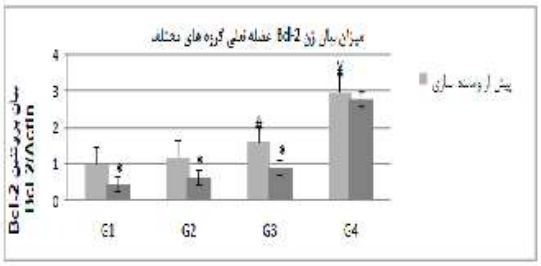
[1] Kolmogorov–Smirnov Test

[2] Tukey's Test

www.SID.ir

Archive of SID

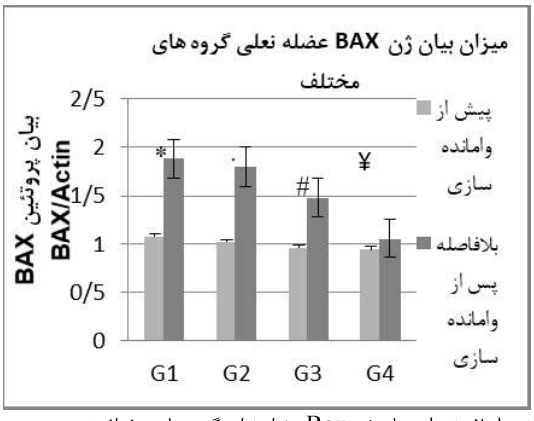
گروه G4 به طور معنی داری کاهش نشان داد (p<۰/۰۵). همچنین میزان بیان ژن Bcl-2 گروه G3 نسبت به گروه های G1 و G2 به طور معنی داری کمتر کاهش نشان داد (p<۰/۰۵). (نمودار شماره ۱).



نمودار ۱. تغییرات بیان ژن Bcl-2 عضله نعلی گروه های مختلف
* نشانه تفاوت معنی دار نسبت به پیش از وامانده سازی P<۰/۰۵ .
#نشانه تفاوت معنی دار نسبت به گروه های یک و دو P<۰/۰۵ .
¥ نشانه تفاوت معنی دار نسبت به سایر گروه ها P<۰/۰۵ .

:Bax

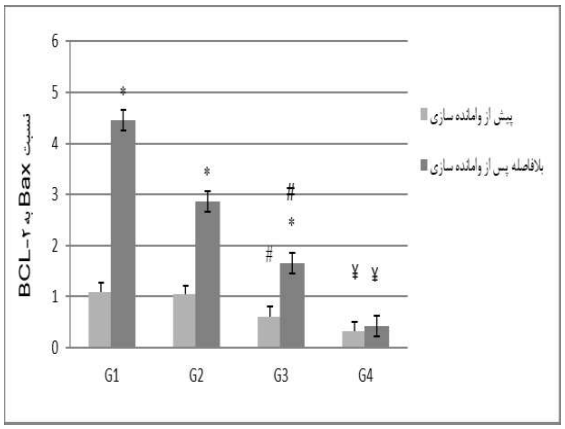
بین میزان بیان ژن Bax عضله نعلی تمامی گروه ها (در حالت استراحت پس از دوره ۸ هفته ای تحقیق، پیش از وامانده سازی) هیچ گونه اختلاف معنی داری مشاهده نشد (p>۰/۰۵). میزان بیان ژن Bax عضله نعلی موش های تمامی گروه ها بجز گروه G4 (گروه ترکیبی۸ هفته تمرین + مصرف عصاره) متعاقب یک وهله فعالیت حاد استقامتی نسبت به پیش از وامانده سازی به طور معنی داری افزایش نشان داد (p<۰/۰۵). بر این اساس ۸ هفته تمرینات استقامتی به همراه مصرف عصاره زعفران، از افزایش معنی دار میزان بیان ژن Bax عضله نعلی موش ها متعاقب یک وهله فعالیت حاد هوازی جلوگیری کرد. همچنین مقدار بیان ژن Bax عضله نعلی موش های گروه G3: (۸ هفته تمرین) متعاقب یک وهله فعالیت حاد استقامتی نسبت گروه های G1 (دارونما) و G2 (مکمل) به طور معنی داری کمتر بود (p<۰/۰۵). (نمودار شماره ۲).



نمودار ۲. تغییرات بیان ژن Bax عضله نعلی گروه های مختلف ؛
* نشانه تفاوت معنی دار نسبت به پیش از وامانده سازی P<۰/۰۵ .
#نشانه تفاوت معنی دار نسبت به گروه های یک و دو P<۰/۰۵ .
¥ نشانه تفاوت معنی دار نسبت به سایر گروه ها P<۰/۰۵ .

نسبت BAX به Bcl-2

نسبت BAX به Bcl-2 در حالت استراحت پیش از وامانده سازی به طور معنی دار در گروه های G4 و G3 نسبت به سایر گروه های کمتر بود (p<۰/۰۵). از سویی میزان این نسبت به طور معنی دار در گروه G4 نسبت به گروه G3 کمتر بود (p<۰/۰۵). همچنین متعاقب یک وهله فعالیت حاد استقامتی نسبت BAX به Bcl-2 تمامی گروه ها بجز گروه G4 به طور معنی داری افزایش نشان داد (p<۰/۰۵). بعلاوه این نسبت در گروه G3 نسبت به گروه های G2 و G1 به طور معنی داری کمتر بود (p<۰/۰۵). (نمودار شماره ۳).



نمودار ۳. تغییرات نسبت Bax به Bcl-2 عضله نعلی گروه های مختلف ؛
* نشانه تفاوت معنی دار نسبت به پیش از وامانده سازی P<۰/۰۵ .
#نشانه تفاوت معنی دار نسبت به گروه های G1 و G2 P<۰/۰۵ .
¥ نشانه تفاوت معنی دار نسبت به سایر گروه ها P<۰/۰۵ .

بحث و نتیجه گیری

پروتئین Bcl-2، یکی از پروتئین های مهاری آپوپتوز از خانواده ی Bcl-2 می باشد که با قرار گرفتن در غشای میتوکندری، باعث مهار پروتئین های تحریکی آپوپتوز می شود و بدین وسیله، از نفوذپذیری غیر عادی میتوکندری جلوگیری می کند و مانع ورود سیتوکروم C به سیتوپلاسم و در نهایت پلاسما می گردد (۱۹) پروتئین Bcl-2، از طریق حفظ یکپارچگی غشای میتوکندری با خارج ساختن یون های هیدروژن به عامل فعال سازی پروتئاز آپوپتوز متصل می شود و فعال سازی کاسپاز –۱ را مهار می کند. پروتئین BAX نیز عضوی از خانوادی Bcl-2 می باشد که با تاثیر بر گیرنده های آنیونی وابسته به ولتاژ، در دیواره میتوکندری باعث باز شدن، و نفوذپذیری دیوار میتوکندری به سیتوکروم C می شود (۱۹). افزایش میزان Bax منجر به تغییراتی در قابلیت نفوذ پذیری غشاء داخلی میتوکندری، کاهش پتانسیل غشاء و کاهش سنتز انرژی و در نتیجه تورم میتوکندری و تغییر در قابلیت نفوذ پذیری میتوکندریایی می شود. افزایش سطوح Bax و کاهش میزان Bcl-2 که منجر به افزایش نسبت Bax به Bcl-2 می شود بیان گر تشدید فرآیند آپوپتوز می باشد (۱۹).

تحقیق حاضر نشان داد که میزان بیان ژن Bax و همچنین نسبت Bax به Bcl-2 عضله نعلی تمامی گروه ها بجز گروه G4 (ترکیبی تمرین و عصاره) متعاقب فعالیت حاد هوازی به طور معنی داری نسبت به سطوح استراحتی افزایش و میزان بیان ژن Bcl-2 عضله نعلی کاهش یافت. همسو با نتایج مطالعه حاضر در گروه های کنترل، سان و همکاران (۲۰۱۶) لی

www.SID.ir

Archive of SID

و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که سطوح بیان ژن های Bax وBcl-2 پس از یک وهله فعالیت وامانده ساز به طور معنی داری به ترتیب افزایش و کاهش می یابد. همچنین نسبت Bax به Bcl-2 افزایش نشان می دهد (۳, ۴). سان و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند متعاقب یک وهله شنای وامانده ساز میزان بیان ژن های Bax و Bcl-2 عضله دوقلوی موش های صحرایی به طور معنی داری به ترتیب افزایش و کاهش می یابد. همچنین نسبت Bax به Bcl-2 به طور معنی داری افزایش نشان داد (۳). لی و همکاران (۲۰۱۳) نیز نشان دادند متعاقب فعالیت حاد هوازی میزان بیان ژن های Bax و Bcl-2 مغز موش به ترتیب افزایش و کاهش یافت. همچنین نسبت بیان ژن های Baxبه Bcl-2 افزایش نشان داد. موش ها یک جلسه بر روی تردمیل با سرعت ۱۹/۳ و۲۶/۸ متر در دقیقه به واماندگی رسیدند (۴).

گرچه مکانیسم دقیق اینکه چرا و چگونه آپوپتوز در نتیجه ورزش رخ می دهد شناخته شده نیست. اما به طور کلی آپوپتوز سلولی از دو مسیر خارجی و داخلی سلول را تحت تأثیر قرار داده و از بین می برد. در مسیر خارجی اعمال فشار مکانیکی- متابولیکی، تجمع کلسیم درون سلولی (تشدید فرآیند پروتئولیز) و حتی با افزایش فشار اکسایشی ناشی از انفجار نوتروفیلی (افزایش پراکسیداسیون فسفولیپیدهای غشایی) باعث فعال سازی عامل هسته ای کاپا – بی[1] (NF-kB) و پیامدهای بعدی آن یعنی بروز التهاب (آغاز آبشار واسطه های التهابی) می شود (۱). همچنین ماکروفاژهای فعال شده باعث ایجاد سیتوکین های پیش التهابی (همچون اینترلوکین- یک بتا، اینترلوکین –شش و عامل نکروز دهنده تومور آلفا) می گردند (۱). همچنین فعالیت های ورزشی شدید، از طریق فرآیند تحریک دستگاه عصبی سمپاتیکی و به دنبال آن کاهش ذخایر گلیکوژن عضلانی، باعث افزایش چشمگیری در سطح تومور آلفا (TNF-α) و پروتئین واکنش گر C و سایر سیتوکین ها می شوند. در تحقیق حاضر، آزمودنی ها، فعالیت شدید و فزاینده هوازی را اجرا نمودند که ممکن است شدت فعالیت از طریق ساز و کار پارگی و آسیب عضلانی در سطح سارکومری و تغییرات هورمونی از جمله افزایش آدرنالین و کورتیزول باعث تولید عامل نکروز دهنده تومور آلفا(TNF-α) و پروتئین واکنش گر C سرمی شده است (۲۰). بنابراین TNF-، IL-1β، FasL، Fas TRAIL، TNFR1،TNFR2 افزایش یافته از طریق سیتوکین های پیش التهابی به گیرنده های مرگ غشای سلول، متصل می شوند و موجب فعال سازی کاسپاز ۸ و در نهایت آپوپتوز سلولی می گردند (۲). در مسیر داخلی، میتوکندری و رتیکلوم اندوپلاسمیک محوریت فرایند آپوپتوز را دارند که تحت تأثیر عوامل استرسی که مهم ترین آنها اکسید نیتریک و گونه‌های فعال اکسیژن هستند قرار دارد. بدین شکل که در خلال تمرینات ورزشی وامانده ساز، مصرف اکسیژن به نحو چشمگیری در عضلات، قلب و دیگر بافت‌های فعال افزایش می‌یابد، به طوری که اکسیژن مصرفی کل بدن به۱۰ تا ۲۰ برابر سطوح استراحتی و در تارهای عضلانی فعال، تا ۲۰۰ برابر می‌رسد. در این حالت، تولید گونه‌های فعال اکسیژن میتوکندریایی و در نتیجه، نشت الکترون‌ها از میتوکندری به درون سیتوزول سلول، به طرز چشمگیری افزایش می‌یابد در این شرایط گونه‌های فعال اکسیژن با فعال کردن کاسپازها، آپوپتوز را القا می کنند (۲۱). همچنین گونه های اکسیژنی فعال با آسیب رسانی به DNA مستقیما موجب آپوپتوز می شود. سایر عواملی که در مسیر داخلی که با فعال کردن کاسپازها، آپوپتوز را القا می کنند گلوکوکورتیکوئیدها، سیتوکین ها، افزایش کنترل نشده سطوح کلسیم داخل سلولی یا تغییرات نفوذپذیری میتوکندری، تحت تأثیر فاکتورهای مهمی مثل Bax و p53 آپوپتوز را ایجاد می کنند (۲۲).

در دیگر یافته پژوهش مشخص شد میزان بیان ژن های Bax و Bcl-2، همچنین نسبت بیان ژن های Bax به Bcl-2 عضله نعلی موش های گروه G4 (ترکیبی عصاره تمرین) متعاقب فعالیت حاد هوازی نسبت به سطوح استراحتی تغییر معنی داری نکرد. همانطوری که در بخش قبلی عنوان شد، دلیل افزایش بیان ژن شاخص پیش آپوپتوزی Bax متعاقب فعالیت های حاد وامانده ساز، افزایش فاکتورهای تسریع کننده آپوپتوز مثل سایتوکین ها، فاکتورهای التهابی و افزایش ROS، گلوکوکورتئیدها، همچنین افزایش کنترل نشده ی کلسیم سیتوزولی بوده که سلول ها را به سمت آپوپتوز سوق می دهد. بنابراین هر عامل که بتواند بر این شاخص ها تحریک کننده آپوپتوز تاثیر گذار باشد می تواند از آپوپتوز جلوگیری کند. در تحقیقات مختلفی اثبات شده که کروسین و کروستین موجود در زعفران فعالسازی عامل هسته ای کاپایی NF-kB و سطوح عامل نکروز دهنده تومور آلفا TNF-α را که از مهم ترین عوامل ایجاد آپوپتوز از مسیر خارجی هستند را مهار می کند (۲۳). همچنین عصاره زعفران مسیر خارجی القاء آپوپتوز را نیز از طریق بلوکه کردن مسیرهای تولید ROS همچنین اکسید نیتریک و خنثی سازی ROS از طریق تقویت دفاع آنتی اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی مسدود می کند (۲۴). بنابراین عدم تغییر معنادار بیان ژن های Bax و bcl-2 عضله نعلی موش ها و در نتیجه عدم تغییر نسبت بیان ژن های Bax به Bcl-2 عضله نعلی در گروه G4 (ترکیبی عصاره و تمرین) به دلیل بلوکه شدن مسیرهای داخلی و خارجی آپوپتوز عضله نعلی موش های این گروه در نتیجه مصرف عصاره زعفران می باشد. نتایج این بخش از پژوهش حاضر که نشان دهنده اثرات ضد آپوپتوزی زعفران می باشد با نتایج تحقیقات صادقی و همکاران (۲۰۱۷) ،الشربینی و همکاران(۲۰۱۶) و رضوی و همکاران (۲۰۱۳) که عنوان کردند عصاره زعفران اثرات ضد آپوپتوزی دارد همسو می باشد (۱۱-۱۳). صادقی و همکاران (۲۰۱۷) در تحقیق با بررسی اثرات ضد آپوپتوزی کروسین عنوان کردند استفاده از یک وعده کروسین با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر به صورت وابسته به دوز سطوح بیان ژن Bcl-2 و آنزیم‌های آنتی‌کسیدانی افزایش و سطح بافتی بیان ژن Bax و مالون‌دی‌آلدئید کاهش می یابد (۱۱). الشربینی و همکاران (۲۰۱۶) عنوان کردند مصرف روزانه ۱۰ و ۲۰ میلی گرم کروسین به مدت ۲۱ روز از آپوپتوز و استرس اکسیداتیو ناشی دوکسی روبیسین را در سلول های قلب را از طریق تقویت سیستم آنتی اکسیدانی و خاصیت ضد التهاب کاهش داد (۱۲). رضوی و همکاران (۲۰۱۳) تأثیر زعفران و مواد مؤثره آن بر روی آپوپتوز بافت قلب مشخص شده است که مصرف ۴ هفته ای کروسین به صورت ۲۵ و ۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روز از راه داخل صفاقی سبب محافظت قلب رت در برابر آپوپتوز ایجاد شده با دیازینون از طریق کاهش پراکسیداسیون لیپید غشای بافت قلب و افزایش میزان گلوتاتیون، همچنین کاهش نسبت، Bax به Bcl2 می شود (۱۳).

از سویی با توجه به اینکه متعاقب وامانده سازی بیان ژن Bax و bcl-2 عضله نعلی گروه G3 (گروه تمرین) نسبت به گروه G1 (گروه دارونما) و گروه G2 (گروه عصاره زعفران) تغییر معنی دار کمتری داشت می توان عنوان کرد که ۸ هفته تمرین هوازی در کسب نتایج حاصل از گروه G4 موثر می باشد. در تایید این ادعا در دیگر یافته پژوهش حاضر مشخص شد که میزان بیان ژن bcl-2 عضله نعلی گروه های G4 و G3 در حالت استراحت پیش از وامانده سازی به طور معنی داری نسبت به سایر گروه ها به طور

[1] Nuclear Factor-kappa B

www.SID.ir

Archive of SID

معنی داری بیشتر بود. با این وجود، اختلاف معنی داری بین میزان ژن پروتئین Bax عضله نعلی گروه ها مختلف دیده نشد. در نتیجه نسبت Bax به bcl-2 در گروه های G4 و G3 در حالت استراحت پیش از وامانده سازی به طور معنی داری نسبت به سایر گروه ها کمتر بود. در چندین مطالعه نشان داده شده است که فعالیت ورزشی منظم میزان پروتئین bcl-2 را افزایش داده و نسبت Bax به bcl-2 را به سمت یک محیط ضد آپوپتوزی تغییر می دهد (۲۵–۲۹). برای نمونه مک میلان[1] و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که شش هفته تمرین روی نوار گردان باعث کاهش معنی دار نسبت bax به bcl-2در موش های صحرایی می شود (۲۷). همچنین و نیشتین[2] و همکاران (۲۰۱۱) نیز در مطالعه ای خود اشاره کردند که پس از هشت الی ۱۰ هفته تمرین هوازی نسبت bax به bcl-2 در آزمودنی های گروه تمرین کمتر از گروه کنترل بود (۲۸). چندین سازوکار برای اثرات محافظتی تمرینات ورزشی روی آپوپتوز مطرح شده است که شامل تغییر مستقیم در بیان پروتئین های مربوط به آپوپتوز، کاهش آزادسازی عوامل آپوپتوزی میتوکندری، تغییرات تولید گونه های فعال اکسیژن و وضعیت ضد اکسایش می باشد (۲۷). به نظر می رسد میتوکندری نقش مهمی در تنظیم آپوپتوز سلول های مختلف دارد. نسبت BAX به BCL-2 شاخصی برای نشان دادن پتانسیل آپوپتوز میتوکندریایی می باشد که BCL-2 با فعالیت پیش آپوپتوز میتوکندریایی می باشد که BCL-2 با فعالیت پیش آپوپتوزی BAX به وسیله ی جلوگیری از جابجایی آن به میتوکندری مقابله می کند. هنگامی که BAX به میتوکندری وارد می شود منافذی را در غشای میتوکندری شکل می دهد که در نتیجه پروتئین هایی از جمله سیتوکروم C آزاد شده و وارد سیتوزول می شود و باعث شروع پیام رسانی آپوپتوتیک آبشارهای کاسپاز پایین دستی می شود (۲۵). اهمیت نفوذ پذیری میتوکندری در مطالعه ی فنگ[3] و همکاران (۲۰۰۸) نشان داده شده است. آنها بیان کردند که مسدود کردن منافذ نفوذ پذیری میتوکندری میزان آپوپتوز را کاهش می دهد (۳۰). این نتایج هم راستا با ایده ای است که کاهش نسبت BAX به BCL-2 در اثر تمرینات ورزشی می تواند آپوپتوز را به وسیله ی به حداقل رساندن نفوذ پذیری میتوکندری کاهش دهد (۲۵, ۳۱). اعتقاد بر این است که گونه های اکسیژنی فعال نیز یک محرک قوی برای فعال کردن آپوپتوز در انواع مدل های آزمایشی و سلول های مختلف می باشد (۳۲). همچنین گزارش شده است که گونه های اکسیژنی فعال آپوپتوز را به طور عمده از طریق تعدیل مسیر مربوط به میتوکندری تحت تاثیر قرار می دهد (۳۲, ۳۳). احتمالا استرس اکسایش بالا هومئوستاز غشای میتوکندری را بی ثبات کرده و بنابراین تشکیل منافذ نفوذ پذیری غشای میتوکندری را تحریک می کند و باعث آزاد سازی فاکتورهای پیش آپوپتوزی مثل سیتوکروم C می شود (۳۲, ۳۴). اعتقاد بر این است که تمرینات وررزشی با افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی و تعدیل استرس اکسایشی باعث کاهش ژن های پیش آپوپتوزی می شوند (۲۵, ۳۲). با این حال نتایج پژوهش حاضر و مطالعات مذکور با برخی از تحقیقات انجام شده همسو نمی باشد. لیو[4] و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که ۹ هفته تمرین استقامتی موجب افزایش معنی دار نسبت BAX به BCL-2 در عضله اسکلتی می شود (۳۴). علت این تناقض ممکن است ناشی از زمان برداشت بافت باشد (۲۵). چون اندازه گیری ها در مطالعه کنونی روی بافت هایی انجام شد که ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین استخراج شده بودند اما در پژوهش لیو و همکاران (۲۰۱۳) استخراج بافت ۳۶ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین انجام شده بود (۳۴). همچنین نتیجه تناقض می تواند ناشی از شدت تمرین باشد (در ادامه توضیح داده خواهد شد). با توجه به دیگر یافته پژوهش حاضر مبنی بر این مورد که تغییرات شاخص های BAX و BCL-2بین گروه G2 (مکمل) و G1 (دارونما) در حالت استراحت و متعاقب وامانده سازی معنی دار نبود، می توان عنوان کرد که عصاره زعفران به تنهایی در کسب نتایج این بخش از تحقیق موثر نبوده بلکه فقط زمانی که عصاره زعفران در گروه G4 توام با تمرینات ورزش مصرف شده توانسته اثرات ضد آپوپتوزی داشته باشد. در خصوص مکانیسمی که منجر به نتایج حاصل از گروه G4 شده می توان به این نکته اشاره کرد که شدت تمرین ورزشی نقش تعیین کننده ای در اثرات ضد آپوپتوزی تمرین دارد. چراکه در تمرینات با شدت مختلف میزان تولید گونه های اکسیژنی فعال متفاوت می باشد. بنابراین یکی از دلایل کلیدی تضاد نتایج در خصوص اثرات ضد آپوپتوزی و یا تسریع کننده آپوپتوزی شدت تمرین می باشد به شکلی تمرینات با شدت بالا و یا پائین به ترتیب موجب تسریع و یا عدم تاثیر بر شاخص های تنظیمی آپوپتوز می شوند. احتمالا مصرف عصاره زعفران (با توجه به اثرات آنتی اکسیدانی قوی) در گروه G4 منجر به تعدیل گونه های اکسیژن فعال شده و سطوح بهینه ای از این گونه های فعال در سطوح سلول های عضلانی شده و در نتیجه بیان ژن Bcl-2 در این گروه متعاقب ۸ هفته تمرین در وضعیت استراحت پیش از وامانده سازی نسبت به سایر گروه ها به طور معنی داری بیشتر بود و در نتیجه متعاقب وامانده سازی Bcl-2 از افزایش BAXجلوگیری کرد. در نتیجه می توان نتیجه گرفت که شدت تمرین در تحقیق حاضر گرچه موجب افزایش بیان ژن Bcl-2 و در نتیجه تعدیل افزایش BAX متعاقب وامانده سازی شده اما از سطوح بهینه بالاتر بوده است.

نتیجه گیری

بر اساس مطالعه حاضر فعالیت حاد وامانده ساز منجر به آپوپتوز عضله نعلی موش های تمرین کرده و بی تمرین می شود. با این وجود، یک دوره تمرین هوازی و یا مصرف یک دوره عصاره زعفران به تنهایی آپوپتوز عضله نعلی موش ها را متعاقب فعالیت حاد وامانده ساز تقلیل می دهد. از سویی، مصرف یک دوره عصاره زعفران توائم با تمرین هوازی موجب بلوکه شدن آپوپتوز عضله نعلی موش ها متعاقب فعالیت حاد وامانده ساز می شود. به نظر می رسد، بهترین روش جهت جلوگیری از آپوپتوز عضله نعلی موش ها مصرف عصاره زعفران به همراه تمرینات هوازی می باشد. توصیه به مصرف عصاره زعفران به همراه تمرینات هوازی جهت بلوکه کردن آپوپتوز عضلانی آزمودنی های انسانی با توجه به اینکه نمونه های تحقیق جاری موش های ویستار بودند نیازمند تحقیقات تکمیلی با استفاده از نمونه های انسانی می باشد.

منابع مالی

حمایت مالی از این طرح تحقیقاتی تحت شماره گرنت ۱۳۶۷۹۵–۱۵۶۶۴ از طرف دانشگاه آیت الله العظمی بروجردی (ره) صورت پذیرفته است.

منابع

1. Quadrilatero J, Alway SE, Dupont-Versteegden EE. Skeletal muscle apoptotic response to physical activity: potential mechanisms for protection. Applied physiology, nutrition, and metabolism. 2011;36(5):608-17.

[1] McMillan
[2] Vainshtein
[3] FANG
[4] Liu

www.SID.ir

Archive of SID

Khadamat-i Bihdashti-i Darmani-i Tabriz. 2018 Feb 1;39(6):35-43.
19. Martinou J-C. Apoptosis: key to the mitochondrial gate. Nature. 1999;399(6735):411.
20. Bijeh N, Hosseini SA, Hejazi K. The effect of aerobic exercise on serum C-reactive protein and leptin levels in untrained middle-aged women. Iranian journal of public health. 2012;41(9):36.
21. Jenkins R, Friedland R, Howald H. The relationship of oxygen uptake to superoxide dismutase and catalase activity in human skeletal muscle. International journal of sports medicine. 1984;5(01):11-4.
22. Krüger K, Mooren FC. Exercise-induced leukocyte apoptosis. Exercise immunology review. 2014;20.
23. Milajerdi A, Bitarafan V, Mahmoudi M. A review on the effects of saffron extract and its constituents on factors related to neurologic, cardiovascular and gastrointestinal diseases. 2015.
24. Samarghandian S, Borji A. Anticarcinogenic effect of saffron (Crocus sativus L.) and its ingredients. Pharmacognosy research. 2014;6(2):99.
25. 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. Journal of applied physiology. 2008.
26. Song W, Kwak H-B, Lawler JM. Exercise training attenuates age-induced changes in apoptotic signaling in rat skeletal muscle. Antioxidants & redox signaling. 2006;8(3-4):517-28.
27. McMillan EM, Graham DA, Rush JW, Quadrilatero J. Decreased DNA fragmentation and apoptotic signaling in soleus muscle of hypertensive rats following 6 weeks of treadmill training. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2012.
28. Vainshtein A, Kazak L, Hood DA. Effects of endurance training on apoptotic susceptibility in striated muscle. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2011.
29. Adhihetty PJ, Taivassalo T, Haller RG, Walkinshaw DR, Hood DA. The effect of training on the expression of mitochondrial biogenesis-and apoptosis-related proteins in skeletal muscle of patients with mtDNA defects. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 2007.
30. Fang J, Wu L, Chen L. Postconditioning attenuates cardiocyte ultrastructure injury and apoptosis by blocking mitochondrial permeability transition in rats. Acta cardiologica. 2008;63(3):377-87.
31. Marzetti E, Lawler JM, Hiona A, Manini T, Seo AY, Leeuwenburgh C. Modulation of age-induced apoptotic signaling and cellular remodeling by exercise and calorie restriction in skeletal muscle. Free Radical Biology and Medicine. 2008;44(2):160-8.
32. Siu PM, Bryner RW, Martyn JK, Alway SE. Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles. The FASEB journal. 2004;18(10):1150-2.
33. Koçtürk S, Kayatekin B, Resmi H, Açıkgöz O, Kaynak C, Özer E. The apoptotic response to strenuous exercise of the gastrocnemius and solues muscle fibers in rats. European journal of applied physiology. 2008;102(5):515-24.
34. Liu J, Hu Y, Zhang H, Xu Y, Wang G. Exenatide treatment increases serum irisin levels in patients with obesity and newly diagnosed type 2 diabetes. Journal of Diabetes and its Complications. 2016;30(8):1555-9.
2. Won S-H, Lee H-J, Jeong S-J, Lee H-J, Lee E-O, Jung D-B, et al. Tanshinone IIA induces mitochondria dependent apoptosis in prostate cancer cells in association with an inhibition of phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2010;33(11):1828-34.
3. Sun Y, Cui D, Zhang Z, Zhang T, Shi J, Jin H, et al. Attenuated oxidative stress following acute exhaustive swimming exercise was accompanied with modified gene expression profiles of apoptosis in the skeletal muscle of mice. Oxidative medicine and cellular longevity. 2016;2016.
4. Li S, Liu J, Yan H. Medium-intensity acute exhaustive exercise induces neural cell apoptosis in the rat hippocampus. Neural regeneration research. 2013;8(2):127.
5. Cooper DM. The balance between life and death: defining a role for apoptosis in aging. J Clin Exp Pathol. 2012;4:001.
6. Woods JA, Wilund KR, Martin SA, Kistler BM. Exercise, inflammation and aging. Aging and disease. 2012;3(1):130.
7. Huang H-Y, Appel LJ, Croft KD, Miller ER, Mori TA, Puddey IB. Effects of vitamin C and vitamin E on in vivo lipid peroxidation: results of a randomized controlled trial. The American journal of clinical nutrition. 2002;76(3):549-55.
8. Gomez-Cabrera MC, Salvador-Pascual A, Cabo H, Ferrando B, Vina J. Redox modulation of mitochondriogenesis in exercise. Does antioxidant supplementation blunt the benefits of exercise training? Free radical biology and medicine. 2015;86:37-46.
9. Khosravi A, OmidAli F. The Effect of Saffron Stigmas Aqueous Extracts on Serum Cardiac Troponin T and Creatine Kinase MB Isoenzyme of Male Rats Following an Exhaustive Exercise. Journal of Arak University of Medical Sciences. 2018;21(2):43-54.
10. Rezaee R, Hosseinzadeh H. Safranal: from an aromatic natural product to a rewarding pharmacological agent. Iranian journal of basic medical sciences. 2013;16(1):12.
11. Sadoughi SD. Effect of Crocin on Bax/Bcl-2 Ratio, Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes Activity in Liver Tissue of Chick Embryo Treated with Silver Nanoparticles. Quarterly of Horizon of Medical Sciences. 2017;23(4):293-9. eng.
12. Elsherbiny NM, Salama MF, Said E, El-Sherbiny M, Al-Gayyar MM. Crocin protects against doxorubicin-induced myocardial toxicity in rats through down-regulation of inflammatory and apoptic pathways. Chemico-biological interactions. 2016;247:39-48.
13. Razavi M, Hosseinzadeh H, Abnous K, Motamedshariaty VS, Imenshahidi M. Crocin restores hypotensive effect of subchronic administration of diazinon in rats. Iranian journal of basic medical sciences. 2013;16(1):64.
14. Mirzaei B, khosravi a, rasoulian b, mehrabani j. Comparing the effects of acute exhaustive exercise on cardiac troponin T serum and malondialdehyde of heart tissue response levels of endurance trained young rats. 2. 2013;5(9):16-24. eng.
15. Belviranlı M, Gökbel H, Okudan N, Büyükbaş S. Effects of grape seed polyphenols on oxidative damage in liver tissue of acutely and chronically exercised rats. Phytotherapy Research. 2013;27(5):672-7.
16. Singh J. Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. 2008:67.
17. Rameshrad M, Razavi BM, Hosseinzadeh H. Saffron and its derivatives, crocin, crocetin and safranal: a patent review. Expert opinion on therapeutic patents. 2018;28(2):147-65.
18. Siahkohian M, Asgharpour-Arshad M, Bolboli L, Jafari A, Hesari FS. Effect of 12-weeks aerobic training on some indices of skeletal muscle apoptosis in male rats. Majallah-i pizishki-i Danishgah-i Ulum-i Pizishki va
www.SID.ir