

تأثیر تمرین هوازی همراه با مکمل دهی عصاره چای سبز بر پروتئین‌های Bax و Bcl-2 بافت قلب موش‌های صحرایی نر سالخورده به روش ایمونوهیستوشیمی

محدثه رجبی هزاوه^۱، ناصر بهپور^{۲*}، احمد همت‌فر^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۷/۸

خلاصه

مقدمه: پیری با اختلال در عملکرد بیولوژیکی همراه است و باعث بروز بیماری‌هایی از جمله دیابت، افزایش فشارخون و نارسایی قلبی و عروقی می‌شود. تمرین هوازی منظم و عصاره چای سبز با داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی می‌توانند عوارض پیری را کاهش دهند. هدف پژوهش حاضر تعیین تأثیر تمرین هوازی همراه با مصرف عصاره چای سبز بر میزان پروتئین‌های Bax و Bcl-2 بافت قلب موش‌های صحرایی نر سالخورده بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۳۲ سر موش صحرایی نر به صورت تصادفی در چهار گروه ۸ تایی شامل گروه کنترل، گروه تمرین، گروه مکمل و گروه تمرین + مکمل قرار گرفتند. گروه‌های تمرینی ۱۲ هفته (۵ روز در هفته) فعالیت هوازی با شدت ۶۰ تا ۷۵ درصد اوج اکسیژن مصرفی انجام دادند، در همین مدت گروه‌های دریافت‌کننده مکمل، مکمل عصاره چای سبز دریافت کردند. برای اندازه‌گیری بیان Bax و Bcl-2 از روش ایمونوهیستوشیمی استفاده شد. داده‌ها توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey آنالیز شدند.

یافته‌ها: بیان Bax به صورت معنی‌داری در گروه‌های تمرین ($p=0/031$)، مکمل ($p=0/002$) و تمرین + مکمل ($p=0/000$) نسبت به گروه کنترل کاهش داشت. همچنین، بیان Bcl-2 به صورت معنی‌داری در گروه تمرین + مکمل نسبت به گروه کنترل افزایش نشان داد ($p=0/036$).

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج مطالعه حاضر می‌توان گفت ترکیب ۱۲ هفته تمرین هوازی با مصرف مکمل عصاره چای سبز نسبت به تمرین هوازی و مصرف مکمل چای سبز به تنهایی می‌تواند بیان Bax و نسبت Bax به Bcl-2 در بافت قلب رت‌های نر سالخورده را کاهش دهد.

واژه‌های کلیدی: سالمندی، موش صحرایی، تمرین هوازی، چای سبز، بافت قلب، Bax، Bcl-2

۱-دانشجوی دکتری، گروه تربیت‌بدنی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران.

۲-دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران. (نویسنده مسئول)

پست الکترونیکی: benaser647@gmail.com ، تلفن: ۰۹۱۳۳۲۷۱۸۷۳

۳-استادیار، گروه تربیت‌بدنی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران.

مقدمه

می‌توان گفت که فعالیت بدنی منجر به کاهش آپوپتوز و پیری سلولی می‌شود.

چای سبز با نام علمی *Camellia sinensis* یک نوشیدنی محبوب است که ۳۰ درصد وزن آن در حالت خشک را پلی فنل‌های چای تشکیل داده است. Epigallocatechin gallate (EGCG) بیشترین و فعال‌ترین کتشنین موجود در چای سبز، در سیستم بیولوژیکی یک آنتی‌اکسیدان است و خیلی سریع از روده کوچک جذب خون می‌شود. پلی فنل‌های موجود در چای سبز می‌توانند رادیکال‌های آزاد را خنثی کرده و کاهش دهند و حتی ممکن است از برخی از اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد جلوگیری کنند [۸]. مطالعه Sheng آثار سودمند چندین آنتی‌اکسیدان از جمله ویتامین C، گلوکاتین و N-استیل-L-سیستین بر جلوگیری از آپوپتوز را گزارش داده است [۹]. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی EGCG از ویتامین C و ویتامین E بیشتر است [۱۰]. با توجه به اثرات استرس اکسیداتیو بر فرآیند پیری سلولی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی چای سبز، به نظر می‌رسد که مصرف چای سبز می‌تواند تأثیر مثبتی بر جلوگیری از پیری سلولی داشته باشد.

با توجه به آثار سودمند فعالیت ورزشی بر جلوگیری از پیری سلولی در بافت قلب و تأثیرات مثبت و آنتی‌اکسیدانی چای سبز بر پیری سلولی، این پرسش مطرح می‌شود که آیا ترکیب فعالیت بدنی و مصرف چای سبز می‌تواند تأثیر بیشتری را نسبت به هر کدام از آن‌ها بر فرآیند آپوپتوز و جلوگیری از پیری سلولی در دوران سالمندی داشته باشد؟ تا جایی که امکان بررسی وجود داشت، مطالعه‌ای یافت نشد که به بررسی این بحث پرداخته باشد. از این‌رو، در این پژوهش تأثیر ۱۲ هفته تمرین هوازی همراه با مصرف عصاره چای سبز بر میزان پروتئین‌های Bax و Bcl-2 بافت قلب موش‌های صحرایی نر سالخورده بررسی شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش به روش تجربی و کنترل شده در سال ۱۳۹۸ در آزمایشگاه شرکت دانش پی هادی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی ارومیه انجام شد. در این پژوهش تأثیر ۱۲ هفته تمرین هوازی با شدت متوسط به همراه مکمل عصاره چای سبز بر

با توجه به پیشرفت علم پزشکی در جهان امروزی و افزایش امید به زندگی، جمعیت سالمندان رو به افزایش است. پیری بیولوژیکی با اختلال در عملکرد بیولوژیک همراه است و باعث بروز بیماری‌های گوناگونی از جمله دیابت، افزایش فشارخون و نارسایی قلبی و عروقی می‌شود [۱]. بنابراین یافتن راه‌های مناسب جهت جلوگیری از پیری سلولی در دوران سالمندی ضروری به نظر می‌رسد. پیری سلولی نتیجه تعادل بین آسیب و ترمیم است که منجر به از دست دادن عملکرد سلول و عدم توانایی پاسخ مناسب به استرس خارجی می‌شود [۲]. آپوپتوز واژه‌ای یونانی که اولین بار در سال ۱۹۷۲ توسط Kerr و همکارانش بکار گرفته شد، و به نوع جدیدی از مرگ سلولی که در کبد مشاهده شده بود دلالت می‌کرد و خصوصیتی داشت که آن را از سایر انواع مرگ سلولی متمایز می‌ساخت [۳]. تعادل بین Bax/Bcl-2 به عنوان یک عامل مهم در میزان افزایش آپوپتوز است. مطالعات نشان دادند که در رت‌های مبتلا به فشارخون مزمن، هایپرتروفی بطن چپ و اختلال عملکرد بطن چپ با افزایش Bax و نسبت Bax/Bcl-2 همراه است، که منجر به آپوپتوز سلول‌های قلبی می‌شود [۴].

نتایج مطالعات نشان می‌دهد که آپوپتوز در قلب بر اثر پیری افزایش می‌یابد و فعالیت ورزشی منظم باعث کاهش آپوپتوز در قلب سالخورده می‌شود. در این ارتباط Kwak و همکاران گزارش دادند که فعالیت ورزشی منظم در بافت قلب سبب کاهش مقادیر Bax و افزایش مقادیر Bcl-2 شد [۵]. این نتایج توسط Soufi و همکاران تأیید شد [۶]. این نتایج با کاهش بیان و مقادیر پروتئین Bax و افزایش پروتئین Bcl-2 نشان‌دهنده تأثیرات آنتی‌آپوپتوزیس فعالیت بدنی در بافت قلب در هنگام سالمندی است. افزایش نسبت Bax به Bcl-2 در بافت قلب در اثر پیری منجر به فعال‌سازی آبشار کاسپازها از طریق آزادسازی سیتوکروم C، فعال‌سازی کاسپاز ۹ و سپس کاسپاز ۳ و در نهایت شکسته شدن DNA و مرگ سلولی می‌شود. بر عکس، فعالیت ورزشی منظم سبب کاهش سطوح کاسپاز ۹، کاسپاز ۳ و همچنین کاهش نسبت Bax به Bcl-2 در بافت قلب سالخورده می‌شود [۷]. با توجه به این نتایج

کمیته اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد با شناسه IR.IAU.B.REC.1396.11 به تصویب رسید.

پروتکل تمرینی: رت‌های گروه‌های تمرینی، تمرین هوازی بر روی نوارگردان را به مدت ۱۲ هفته (۵ روز در هفته، هر جلسه ۶۰ دقیقه) انجام دادند. قبل از اجرای پروتکل اصلی به منظور آشنایی با تمرین، رت‌ها یک هفته با شدت ۱۰ متر بر دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه تمرین کردند. سپس، پروتکل اصلی آغاز شد. مدت و شدت تمرین به صورت تدریجی اضافه شد به این صورت که مدت تمرین هر جلسه از ۱۰ دقیقه در هفته اول به ۶۰ دقیقه در هفته ششم رسید و پس از آن تا اتمام دوره ثابت ماند. شدت تمرین بر اساس سرعت نوارگردان از ۱۷ متر بر دقیقه (حدود ۶۰٪ VO_2^{peak}) در هفته اول به ۲۷ متر بر دقیقه (حدود ۷۵٪ VO_2^{peak}) در هفته دوازدهم رسید [۱۳]. شیب نوار گردان در طول پروتکل ثابت و برابر صفر بود. در ابتدای هر جلسه آزمودنی‌ها سه دقیقه را با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه به عنوان گرم کردن می‌دویدند و سپس به ازای هر ۲ دقیقه ۳ متر بر دقیقه به سرعت اضافه می‌شد تا به سرعت مورد نظر برسد، در انتهای هر جلسه نیز به منظور سرد کردن در طی ۵ دقیقه سرعت به صورت تدریجی کاهش داده می‌شد تا به ۸ متر بر دقیقه برسد [۱۴].

میزان پروتئین‌های Bax و Bcl-2 بافت قلب موش‌های صحرایی نر سالخورده بررسی گردید. تعداد ۳۲ سرت نر ویستار ۲۴ هفته‌ای با وزن ۲۷۰ تا ۳۰۰ گرم نمونه آماری این تحقیق را تشکیل دادند. رت‌ها در ۴ گروه ۸ تایی شامل گروه تمرین، گروه مکمل، گروه تمرین به اضافه مکمل و گروه کنترل قرار داده شدند و طبق دستورالعمل انجمن ایرانیان حمایت‌کننده از حیوانات آزمایشگاهی در قفس‌های جداگانه نگهداری شدند [۱۱]. حیوانات در محیطی با میزان رطوبت ۴۴±۵٪ و سیکل شبانه‌روزی ۱۲ ساعت روشنایی ۱۲ ساعت تاریکی و دمای 22 ± 2 C نگهداری شدند. حیوانات دسترسی آزاد به غذای مخصوص حیوانات و آب داشتند. مدت‌زمان دو هفته جهت آشنایی با محیط آزمایشگاه و نوارگردان برای آزمودنی‌ها در نظر گرفته شد. پس از گذشت دو هفته پروتکل اصلی تمرین شروع شد. به این صورت که گروه تمرین به مدت ۱۲ هفته تحت تأثیر تمرینات هوازی با شدت متوسط قرار گرفتند، گروه مکمل به مدت ۱۲ هفته عصاره چای سبز دریافت کردند و گروه تمرین به اضافه مکمل به مدت ۱۲ هفته همراه با مصرف عصاره چای سبز، تمرینات هوازی با شدت متوسط انجام دادند. پس از اتمام دوره در حالت ناشتا و ۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی، بعد از بیهوشی حیوان بافت بطن چپ خارج و جمع‌آوری شد [۱۲]. این مطالعه در

جدول ۱- پروتکل تمرین ورزشی برای رت‌های سالخورده بر روی نوارگردان به مدت ۱۲ هفته

هفته	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
شیب نوارگردان (درصد)	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
مدت تمرین در هر جلسه (دقیقه)	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰	۵۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰
سرعت نوار گردان (متر بر دقیقه)	۱۷	۱۷	۱۹	۱۹	۲۱	۲۱	۲۳	۲۳	۲۵	۲۵	۲۷	۲۷

FOODS NOW آمریکا به روش هیدروالکلی و با الکل اتانول ۹۶ درصد بدست آمده بود. به میزان ۳۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن از پودر کپسول در ۱ سی‌سی آب مقطر حل گردید و به‌وسیله گاوژ به رت‌ها داده شد [۸].

روش آزمایشگاهی: برای بررسی بیان پروتئین‌های Bax و Bcl-2 در بافت قلب از روش ایمنوهیستوشیمی استفاده

مکمل دهی: رت‌های گروه‌های دریافت‌کننده مکمل ۵ روز در هفته به مدت ۱۲ هفته عصاره چای سبز دریافت کردند. عصاره چای سبز به صورت کپسول ۴۰۰ میلی‌گرمی پودر عصاره چای سبز، ساخت شرکت NOW FOODS کشور آمریکا با کد 4805B بود که هر کپسول حاوی ۴۰ درصد کتشین بود. عصاره چای سبز بر اساس دستورالعمل شرکت

فرمالین انجام شد (جدول ۲). تصاویر با میکروسکوپ نوری مدل BM-180N ساخت شرکت صایران کشور ایران گرفته شد. برای تجزیه و تحلیل تصاویر و مشخص کردن میزان پروتئین‌های Bax و Bcl-2 از نرم‌افزار Image J استفاده شد که بیان پروتئین‌های Bax و Bcl-2 را بر اساس درصدی از تصویر نشان داد [۳].

شد. برای این منظور از آنتی‌بادی Bax (Bax Monoclonal Antibody) ساخت شرکت Elabscience با شماره کاتالوگ E-AB-22212 و آنتی‌بادی Bcl-2 (Bcl-2 Monoclonal Antibody) ساخت شرکت Elabscience با شماره کاتالوگ E-AB-27046 ساخت کشور آمریکا استفاده شد. ایمنوهیستوشیمی پس از قرارگیری ۴۸ ساعته نمونه‌ها در

جدول ۲- مراحل انجام روش آزمایشگاهی ایمنوهیستوشیمی بر روی بافت قلب موش‌های صحرایی نر سالخورده

۱	قرار دادن بافت قلب مورد نظر در داخل تامپون و کدگذاری
۲	برای آبیگری نمونه‌ها داخل الکل در آون (دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شدند.
۳	بافت‌ها تقریباً به مدت ۱۱ ساعت (از شب تا صبح) در مخلوط روغن صدر (سه چهارم) + گزلیل (یک چهارم) قرار داده شدند.
۴	بافت‌ها به مدت ۱ ساعت داخل گزلیل خالص قرار گرفتند.
۵	بافت‌ها به مدت ۴ ساعت داخل پارافین خالص قرار داده شدند. سپس به مدت ۴ ساعت داخل پارافین + موم قرار گرفتند.
۶	توسط پارافین کاملاً مذاب با مخلوط موم قالب‌گیری انجام شد، اندازه قالب‌ها ۲×۲ سانتی‌متر بود. به مدت یک ساعت اجازه داده شد که قالب‌ها کاملاً سرد و خشک شوند، سپس داخل یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.
۷	قالب‌ها با میکروتوم ۵ میکرونی برش زده شدند. سپس بافت برش خورده داخل بن ماری با دمای ۴۰ سانتی‌گراد قرار داده شد و بعد از ۵ دقیقه بر روی لام منتقل گردید.
۸	لام‌ها به مدت ۱۲ ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند.
۹	لام‌ها به مدت نیم ساعت در دمای ۷۰ درجه قرار داده شدند.
۱۰	برای پارافین زدایی نمونه‌های بافت قلب به مدت نیم ساعت داخل گزلیل قرار داده شدند.
۱۱	مرحله آبدی: لام‌ها به مدت ۵ دقیقه به ترتیب داخل هر یک از الکل‌های ۹۶، ۹۰، ۸۰ و ۷۰ درصد و آب مقطر قرار گرفتند.
۱۲	نمونه‌های بافت قلب داخل محلول رتریوال (تری سدیم سیترات، Tween 20 و آب مقطر) قرار گرفتند و سپس سه دقیقه در ۷۲۰ وات و سپس ۱۱ دقیقه در ۱۸۰ وات در داخل مایکروویو گذاشته شدند.
۱۳	برای بلاک کردن اندروژن‌های پراکسیداز به مدت ۵ دقیقه سطح لام‌ها با آب اکسیژنه پوشانده شد.
۱۴	سوپر بلاک به مدت ۱۰ دقیقه روی مقاطع ریخته شد و سپس در PBS شستشو داده شد.
۱۵	آنتی‌بادی اولیه (آنتی‌بادی Bax و Bcl-2) به نسبت ۱ به ۲۰۰ روی مقاطع ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در یک جعبه تاریک در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.
۱۶	آنتی‌بادی روی مقاطع خالی گردید و در PBS شستشو داده شدند.
۱۷	پس از خشک کردن، آنتی‌بادی ثانویه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق آنکوبه شد. در PBS شستشو داده شد و سپس لام‌ها کاملاً خشک شدند.
۱۸	روی لام‌ها محلول horseradish peroxidase (HRP) ریخته شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق آنکوبه شد.
۱۹	۵ میکرولیتر کروموژن با یک میلی‌لیتر از دب سوپستریت در یک میکروتیوب مخلوط شد. برای مدت ۱۰ دقیقه روی همه مقاطع با مخلوط پوشانده شد. سپس در PBS شستشو و خشک شد.
۲۰	رنگ همتوکسیلین به مدت ۱۰ ثانیه روی مقاطع ریخته شد و سپس در یک ظرف آب مقطر شستشو داده شد.
۲۱	پس از بررسی کیفیت تصاویر با میکروسکوپ، روی مقاطع با لامل فیکس شد.

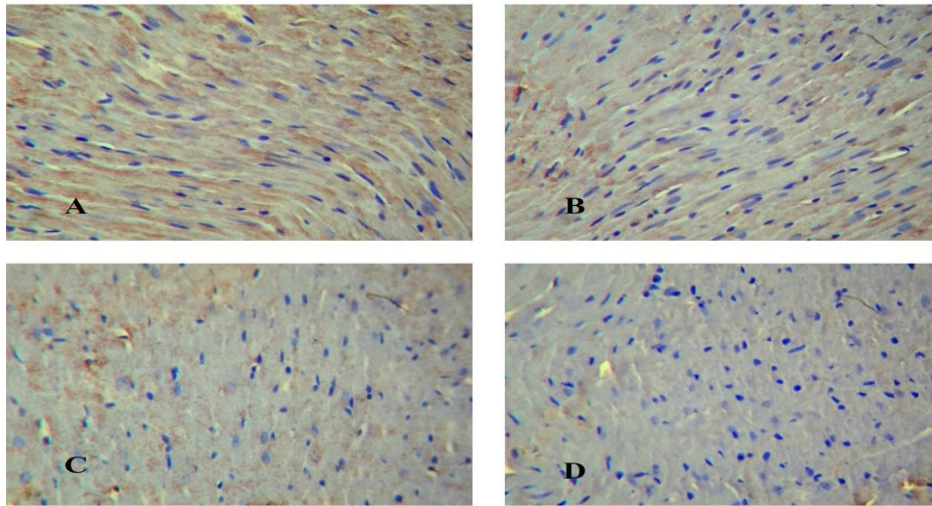
شد. سطح معنی‌داری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS 24 انجام گرفت. برای رسم نمودار از نرم‌افزار Excel 2007 استفاده شد.

یافته‌ها

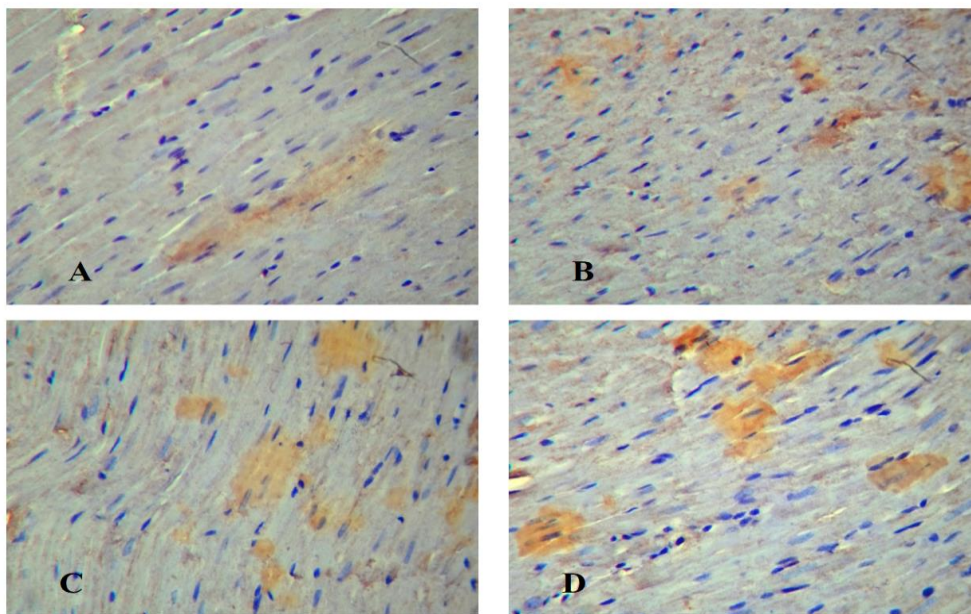
روش‌های آماری: از آمار تو صیفی برای تو صیفی داده‌ها و رسم نمودار استفاده شد. نرمال بودن توزیع داده‌ها توسط آزمون شاپیرو ویلک و همگن بودن واریانس‌ها توسط آزمون لون بررسی گردید. برای مقایسه بین گروه‌ها از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی استفاده

قهوه‌ای مشخص شده است. نقاط آبی هسته سلول‌ها هستند. داده‌ها بر اساس درصدی از کل تصویر با استفاده از نرم‌افزار Image J بدست آمدند. آزمون ANOVA نشان داد که در مقدار بیان Bax ($F=18/797, p<0/001$)، مقدار بیان Bcl-2 ($p<0/001$) و نسبت Bax به Bcl-2 ($F=3/608, p=0/037$) و نسبت Bcl-2 به Bax ($F=22/771$) بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری وجود دارد.

نتایج آزمون شاپیرو ویلک برای بیان Bax ($p=0/842$) و بیان Bcl-2 ($p=0/368$) از لحاظ آماری معنی‌دار نبود که نشان‌دهنده توزیع نرمال داده‌ها است. نتایج آزمون لون برای بیان Bax ($p=0/155$) و بیان Bcl-2 ($p=0/620$) از لحاظ آماری معنی‌دار نبود که نشان‌دهنده همگن بودن واریانس‌ها است. شکل‌های ۱ و ۲ تصاویر ایمنوهیستوشیمی گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد. نقاط بیان Bax و Bcl-2 به رنگ



شکل ۱- تصاویر ایمنوهیستوشیمی (400x) برای بیان Bax. A. گروه کنترل، B. گروه تمرین، C. گروه مکمل، D. گروه تمرین + مکمل



شکل ۲- تصاویر ایمنوهیستوشیمی (400x) برای بیان Bcl-2. A. گروه کنترل، B. گروه تمرین، C. گروه مکمل، D. گروه تمرین + مکمل

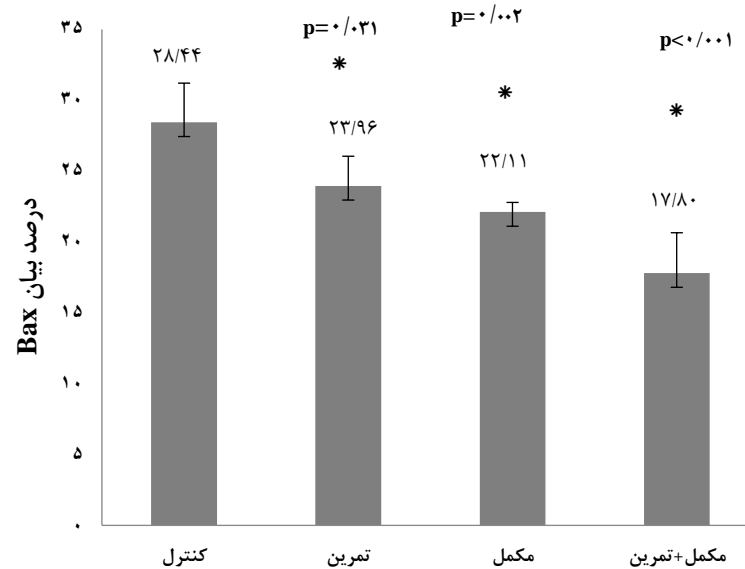
است، همان‌گونه که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود بیان Bax صورت معنی‌داری در گروه‌های تمرین (۱۵ درصد)، مکمل (۲۲ درصد) و تمرین + مکمل (۳۷ درصد) نسبت به گروه کنترل

نمودار ۱ مقادیر بیان Bax در بافت قلب را در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد. نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد که اختلاف بین همه گروه‌های تجربی با گروه کنترل معنی‌دار

مقدار بیان Bax در گروه مکمل نسبت به گروه تمرین پایین تر بود اما از لحاظ آماری معنی دار نبود.

کاهش داشت ($p \leq 0/05$). همچنین، بیان Bax به صورت معنی داری در گروه تمرین+مکمل نسبت به گروه های تمرین (۲۵ درصد) و مکمل (۱۹ درصد) کاهش داشت ($p \leq 0/05$).

نمودار ۱- نتایج آزمون تعقیبی توکی برای بیان Bax در بافت قلب موش های صحرایی نر سالخورده

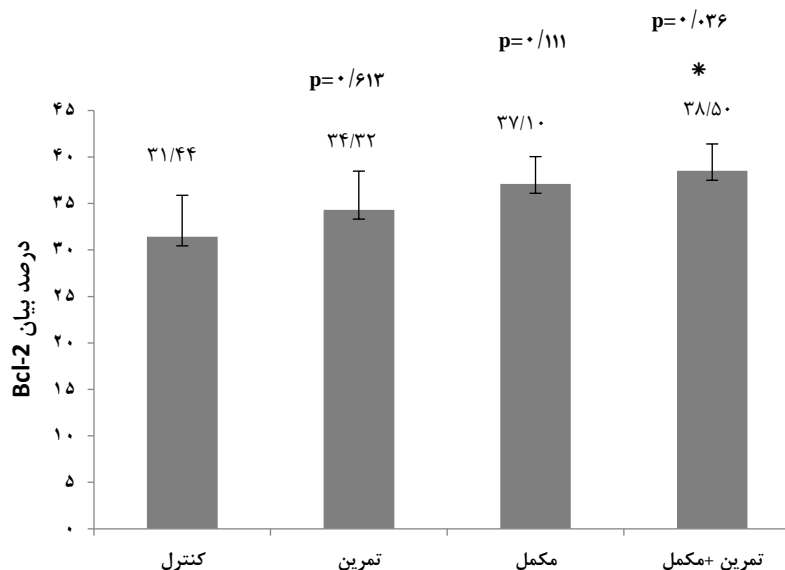


* معنی داری نسبت به گروه کنترل. سطح معنی داری $p \leq 0/05$

بیان Bcl-2 در گروه های تمرین (۹ درصد)، مکمل (۱۸ درصد) نسبت به گروه کنترل بالاتر بود اما از لحاظ آماری معنی دار نبود.

نمودار ۲ مقادیر بیان Bcl-2 در بافت قلب را در گروه های مختلف نشان می دهد. نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد بیان Bcl-2 در گروه تمرین+مکمل نسبت به گروه کنترل به صورت معنی داری افزایش (۲۲ درصد) داشته است. همچنین،

نمودار ۲- نتایج آزمون تعقیبی توکی برای بیان Bcl-2 در بافت قلب موش های صحرایی نر سالخورده

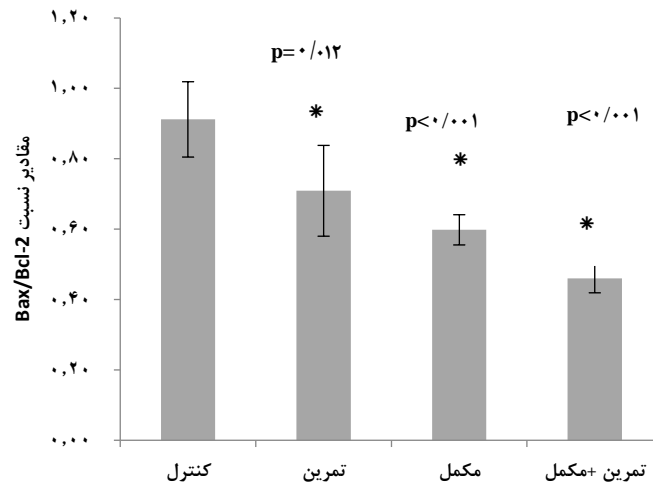


* معنی داری نسبت به گروه کنترل. سطح معنی داری $p \leq 0/05$

توکی نشان داد که اختلاف بین همه گروه‌های تجربی با گروه کنترل معنی‌دار است.

نمودار ۳ مقادیر نسبت بیان Bax به Bcl-2 در بافت قلب را در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد. نتایج آزمون تعقیبی

نمودار ۳- نتایج آزمون تعقیبی توکی برای بیان Bax به Bcl-2 در بافت قلب موش‌های صحرایی نر سالخورده



* معنی‌داری نسبت به گروه کنترل. سطح معنی‌داری از لحاظ آماری $p \leq 0.05$

بحث

قلب رت‌های سالخورده را بررسی کرد و نشان دادند که ۱۲ هفته تمرین هوازی موجب کاهش سطوح کاسپاز-۳، کاسپاز ۹ و نسبت Bax به Bcl-2 در بافت قلب شد [۵] که با نتایج مطالعه حاضر همسو است.

مطالعات اندکی تأثیر عصاره چای سبز بر مسیرهای آپوپتوز را بررسی کرده‌اند. Sheng و همکاران تأثیر EGCG بر مسیر تلومریک آپوپتوز در بافت قلب رت‌ها را بررسی کرد و نشان داد که EGCG موجب کاهش آپوپتوز، کاهش تخریب DNA، کاهش مقادیر P53 و P21 در بافت قلب شد [۱۷]. نتایج مطالعات Sheng با نتایج مطالعه حاضر همسو است که علت آن می‌تواند تأثیرات آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌التهابی چای سبز باشد.

عوامل التهابی از عوامل تأثیرگذار بر آپوپتوز و پیری سلول هستند. مسیر خارج سلولی آپوپتوز به وسیله فاکتورهای التهابی به ویژه $TNF-\alpha$ القا می‌شود [۱۸]. یکی از مهم‌ترین خواص چای سبز که اکثر مطالعات به آن اشاره کرده‌اند، خاصیت ضدالتهابی آن است [۱۶]. EGCG برای اثر بخشیدن ویژگی ضدالتهابی خود با خنثی سازی گونه‌های فعال اکسیژن و نیترژن و دیگر رادیکال‌های آزاد، مانع انتقال NF- κ B و AP-1 و در نتیجه بیان عوامل التهابی می‌شود [۱۹]. IL-۸

در مطالعه حاضر مشاهده شد که ۱۲ هفته تمرین هوازی و همچنین ۱۲ هفته مصرف عصاره چای سبز به تنهایی، سبب کاهش بیان Bax و نسبت Bax به Bcl-2 شدند اما تأثیری معنی‌داری بر بیان Bcl-2 نداشتند. ۱۲ هفته تمرین هوازی همراه با مصرف عصاره چای سبز سبب کاهش بیان Bax و نسبت Bax به Bcl-2 و افزایش معنی‌دار بیان Bcl-2 در بافت قلب رت‌های سالخورده شد. Huang تأثیر ۱۰ هفته فعالیت هوازی با شدت متوسط ۵ روز در هفته و هر جلسه یک ساعت بر مسیرهای داخل سلولی و خارج سلولی آپوپتوز بافت قلب رت‌های یائسه شده را بررسی و بیان کرد که فعالیت هوازی سبب کاهش کاسپاز-۳، کاسپاز ۹، Fas لیگاند، گیرنده‌های Fas و کاسپاز ۸ در بافت قلب رت‌های سالخورده شد [۱۵]. نتایج مطالعه Huang با نتایج مطالعه حاضر همسو است. Kong و همکاران تأثیر ۳ ماه فعالیت هوازی با شدت متوسط را بر فاکتورهای آپوپتوز بافت قلب رت‌های چاق و سالخورده را بررسی کرد و گزارش داد که فعالیت هوازی سبب کاهش فعالیت کاسپاز ۹، کاسپاز ۸ و کاسپاز-۳ شد [۱۶]. نتایج مطالعه Kong و همکاران با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد. Kwak تأثیر ۱۲ هفته تمرین هوازی بر آپوپتوز در بافت

به Bcl-2 در بافت قلب در مطالعه حاضر، سرکوب مسیر خارج سلولی آپوپتوز در اثر تمرین هوازی باشد.

در این مطالعه به علت نبود منابع مالی امکان اندازه‌گیری دیگر پروتئین‌های درگیر در فرآیند آپوپتوز به ویژه کاسپازها وجود نداشت. همچنین، چنانچه امکان بررسی روش‌های تمرینی دیگر و مقایسه آن با اثر تمرین هوازی بر آپوپتوز وجود داشت، تصمیم‌گیری در ارتباط با پیشنهاد نوع تمرین ورزشی برای جلوگیری از پیری سلولی آسان‌تر می‌شد. این پژوهش پیشنهاد می‌کند که پژوهش‌های دیگری تأثیر انواع تمرین‌های ورزشی به همراه مصرف عصاره چای سبز بر فرآیند آپوپتوز را بررسی کنند.

نتیجه‌گیری: در مجموع، بر اساس نتایج پژوهش حاضر

به نظر می‌رسد که ترکیب ۱۲ هفته تمرین هوازی و مصرف مکمل عصاره چای سبز نسبت به تمرین هوازی و مصرف مکمل چای سبز به تنهایی می‌تواند بیان Bax و نسبت Bax به Bcl-2 در بافت قلب رت‌های نرسالخورده را کاهش دهد. انجام تمرین هوازی و یا مصرف عصاره چای سبز به تنهایی نیز موجب کاهش بیان Bax در بافت قلب سالخورده می‌شود.

تعارض منافع

در این مقاله، هیچ‌گونه تعارض منافی توسط نویسندگان، گزارش نشده است.

سهم نویسندگان

ناصر بهپور استاد راهنمای اول و احمد همت‌فر استاد راهنمای دوم رساله‌ای بوده‌اند که این مقاله از آن استخراج شده است. نگارش و گردآوری اطلاعات و داده‌های پژوهش بر عهده محدثه رجبی هزاوه (دانشجو) بود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه برگرفته از رساله دکتری رشته فیزیولوژی ورزشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد می‌باشد. از تمامی عزیزانی که ما را در انجام این پژوهش یاری کردند به ویژه

می‌تواند تجمع نوتروفیل‌ها را تحریک کند و فعال‌سازی گونه‌های اکسیژن فعال را افزایش دهد. مشخص شده است که EGCG می‌تواند تولید IL-8 از سلول اپیتلیوم را مهار کند، بنابراین موجب کاهش شدت پاسخ التهابی می‌شود [۲۰]. علاوه بر این، Tang مشاهده کرد که EGCG بیان ژن‌های التهابی که به سیل‌گیرنده P2X4 القا می‌شوند را با سرکوب مسیر سیگنالینگ JAK1/2 تیروزین کیناز در سلول‌های اندوتلیال عروقی، مهار می‌کند [۲۱]. با توجه به تأثیر عوامل التهابی در فرآیند آپوپتوز و مرگ سلولی، احتمال دارد که دیگر عامل تأثیرگذار بر نتایج پژوهش حاضر در اثر مصرف عصاره چای سبز، خاصیت ضدالتهابی آن باشد.

مطالعات نشان دادند که مقدار پروتئین HSP70 در اثر پیری در بافت قلب کاهش می‌یابد. افزایش بیان HSP70 در بافت قلب تأثیرات محافظتی دارد [۶]. HSP70 نقش مهمی در پاسخ به سازگاری‌ها دارد و در مکانیسم‌های آنتی آپوپتوزیس درگیر است [۲۲]. Rinaldi گزارش داد که فعالیت ورزشی منظم از طریق افزایش بیان HSP70، سبب کاهش نارسایی قلبی و بیماری‌های عروقی مرتبط با افزایش سن و آپوپتوز در بافت قلب رت‌های سالخورده می‌شود [۲۳]. Ko [۱۸] و Soufi [۶] نشان دادند که فعالیت بدنی منظم سطوح HSP70 را در بافت قلب سالخورده افزایش می‌دهد. از این‌رو، احتمال دارد که یک عامل تأثیرگذار در کاهش بیان Bax و نسبت Bax به Bcl-2 در بافت قلبی رت‌های سالخورده در اثر فعالیت هوازی در مطالعه حاضر، پاسخ پروتئین HSP70 به فعالیت هوازی و تأثیر آن بر آپوپتوز باشد.

TNF- α یک مولکول پیش آپوپتوزی و پیش التهابی است که در مسیر خارج سلولی آپوپتوز با اتصال به گیرنده TNFR1 می‌تواند کاسپاز ۸ را فعال کرده و آپوپتوز را شروع کند. از دیگر عوامل خارج سلولی آپوپتوز می‌توان Fas لیگاند و گیرنده‌های Fas را نام برد که با فعال‌سازی کاسپاز ۸ سبب فعال‌سازی کاسپاز-۳ و در نهایت آپوپتوز می‌شوند [۱۵]. Huang و Kong و همکاران گزارش کردند که تمرین هوازی با شدت متوسط سبب کاهش مقادیر TNF- α ، Fas لیگاند و گیرنده‌های Fas در بافت قلب شد [۱۵ و ۱۶]. بنابراین، احتمال دارد که سازوکار دیگر عامل کاهش بیان Bax و نسبت Bax

کردند، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

آقای صابر قاضی‌زاده که در انجام امور آزمایشگاهی و دکتر میرزا حسین نوروزی که برای مشاوره تمرینی ما را یاری

References

1. Chilton W, O'Brien B, Charchar F. Telomeres, Aging and Exercise: Guilty by Association? *IJMS* 2017;18(12):2573.
2. Norouzi Kamareh MH, Zolfaghari MR, Ghaderi Pakdel F, Tolouei azar J. The effect of taking green tea extract for 12 weeks on telomerase enzyme content in heart tissue of old rats in response to acute exhaustive exercise. *Studies in Medical Sciences* 2018;29(2):103-9. [Persian].
3. Norouzi Kamareh MH, Zolfaghari MR, Ghaderi Pakdel F, Tolouei Azar J. Effect of 12 Weeks Moderate Intensity Resistance Training and Green Tea Extract on Cardiac Caspase-3 Expression and Telomerase Enzyme Content in Aged Male Rats. *Sport Physiology* 2018;10(39):107-26. [Persian].
4. Kalkavan H, Green DR. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. *CDD* 2018;25(1):46-55.
5. Kwak H-B, Song W, Lawler JM. Exercise training attenuates age-induced elevation in Bax/Bcl-2 ratio, apoptosis, and remodeling in the rat heart. *The FASEB Journal* 2006;20(6):791-3.
6. Soufi FG, Farajnia S, Aslanabadi N, Ahmadiasl N, Alipour M, Alipour M, et al. Long-term exercise training affects age-induced changes in HSP70 and apoptosis in rat heart. *General physiology and biophysics* 2008;27(4):263.
7. Kwak H-B. Effects of aging and exercise training on apoptosis in the heart. *JER* 2013;9(2):212.
8. Gad SB, Zaghloul DM. Beneficial effects of green tea extract on liver and kidney functions, ultrastructure, lipid profile and hematological parameters in aged male rats. *GV* 2013;11(2):191-205.
9. Sheng R, Gu ZL, Xie ML, Zhou WX, Guo CY. Epigallocatechin gallate protects H9c2 cardiomyoblasts against hydrogen dioxides- induced apoptosis and telomere attrition. *EJP* 2010;641(2-3):199-206.
10. Rice-Evans C. Implications of the mechanisms of action of tea polyphenols as antioxidants in vitro for chemoprevention in humans. *SEBM* 1999;220(4):262-6.
11. Mobasher M, Sasani P, Al-e-Davood SJ, Aramesh K, Larijani B. Revision of the guideline for ethical use of animals. *Medical Ethics and History of Medicine* 2012;5(1):70-111. [Persian].
12. Norouzi Kamareh M, Zolfaghari M, Ghaderi Pakdel F, Tolouei Azar J. Effect of 12 weeks aerobic training combined with hydroalcoholic green tea extract on cardiac telomerase enzyme in aged male rats. *JAMS* 2017;20(126):86-95. [Persian].
13. Hoydal MA, Wisloff U, Kemi OJ, Ellingsen O. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation* 2007;14(6):753-60.
14. Akbari H, Maleki MJ, Ravasi AA, kordi MR, Dizagi A, Miri M, et al. The effect of an endurance training period with cellular Anti-aging purpose on telomerase enzyme activity in cardiac tissue and peripheral blood lymphocytes in male rats. *Journal of Medical Council of Islamic Republic of Iran* 2014;31(4):389-96. [Persian].
15. Huang C-Y, Lin Y-Y, Hsu C-C, Cheng S-M, Shyu W-C, Ting H, et al. Antiapoptotic effect of exercise training on ovariectomized rat hearts. *Journal of Applied Physiology* 2016;121(2):457-65.
16. Kong CM, Lee XW, Wang X. Telomere shortening in human diseases. *The FEBS journal* 2013;280(14):3180-93.
17. Sheng R, Gu ZL, Xie ML. Epigallocatechin gallate, the major component of polyphenols in green tea, inhibits telomere attrition mediated cardiomyocyte apoptosis in cardiac hypertrophy. *IJC* 2013;162(3):199-209.
18. Ko I-G, Kim S-E, Kim C-J, Jee Y-S. Treadmill Exercise Alleviates Aging-induced Apoptosis in Rat Cardiac Myocytes. *IJGE* 2013;7(3):152-7.
19. Tedeschi E, Menegazzi M, Yao Y, Suzuki H, Förstermann U, Kleinert H. Green tea inhibits human inducible nitric-oxide synthase expression by down-regulating signal transducer and activator of transcription-1 α activation. *Molecular pharmacology* 2004;65(1):111-20.
20. Kim I-B, Kim D-Y, Lee S-J, Sun M-J, Lee M-S, Li H, et al. Inhibition of IL-8 production by green tea polyphenols in human nasal fibroblasts and a549 epithelial cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2006;29(6):1120-5.
21. Tang Y, Matsuoka I, Ono T, Inoue K, Kimura J. Selective up-regulation of P2X4-receptor gene expression by interferon- γ in vascular endothelial cells. *JPS* 2008;107(4):419-27.
22. Aceros H, Farah G, Cobos-Puc L, Stabile A, Noiseux N, Mukaddam-Daher S. Moxonidine improves cardiac structure and performance in SHR through inhibition of cytokines, p38 MAPK and Akt. *BJP* 2011;164(3):946-57.
23. 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. *Experimental gerontology* 2006;41(8):764-70.

The Effect of Aerobic Exercise with Green Tea Extract Supplementation on Bax and Bcl-2 in Aged Male Rat's Heart Tissue by Immunohistochemistry

Rajabi Hezave M¹, BehpourN², Hematfar A³

1-Ph.D Student, Dept of Physical Education, Boroujerd Branch, Islamic Azad University, Boroujerd, Iran.

2-Associate Prof, Dept of Sport Sciences, Razi University, Kermanshah, Iran. (Corresponding Author)

Email: benaser647@gmail.com, Tel: +989123271873

3-Assistant Prof, Dept of Physical Education, Boroujerd Branch, Islamic Azad University, Boroujerd, Iran.

Received: 25 December 2019

Accepted: 28 September 2020

Introduction: Aging is associated with impaired biological function, leading to various diseases, including diabetes, hypertension, and cardiovascular failure. Regular aerobic exercise and green tea extract with antioxidant properties can reduce the effects of aging. This study aims to investigate the effect of 12 weeks of aerobic exercise and consumption of green tea extract on the levels of Bax and Bcl-2 proteins in the heart tissue of aged male rats.

Materials and Methods: 32 aged male rats were randomly divided into 4 groups: control, exercise, supplement, and exercise+ supplement. Exercise groups performed aerobic exercise at an intensity of 60-75% of VO_2^{peak} for 12 weeks and 5 days per week; meantime, the supplementary groups consumed green tea extract. The immunohistochemistry method was used to measure the expression of Bax and Bcl-2. Data were analyzed by ANOVA and Tukey's post-hoc test. The significance level was considered $p < 0.05$. Statistical analysis was performed using Spss 24 software.

Results: The results showed that Bax expression was significantly lower in the exercise group ($p=0.031$), supplement group ($p=0.002$), and exercise + supplement group ($p=0.000$) than the control group. Also, Bcl-2 expression was significantly higher in the exercise+ supplement group ($p=0.036$) than in the control group.

Conclusion: According to the results, a combination of 12 weeks of moderate-intensity aerobic exercise with green tea extract supplementation can decrease the expression of cardiac Bax and ratio of Bax to Bcl-2 than aerobic exercise and green tea supplementation alone.

Keywords: Aging, Rat, Aerobic exercise, Green tea, Heart tissue, Bax, Bcl-2

Please cite this article as follows:

Rajabi Hezave M, BehpourN, Hematfar A. The Effect of Aerobic Exercise with Green Tea Extract Supplementation on Bax and Bcl-2 in Aged Male Rat's Heart Tissue by Immunohistochemistry. *Community Health journal* 2020; 14 (3): 55-64.

Funding: This study was funded by the Department of Physical Education, Boroujerd Branch, Islamic Azad University.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The research was approved by the Ethics Committee of Boroujerd Branch, Islamic Azad University (IR.IAU.B.REC.1396.11).