

بررسی تغییرات بیان ژن های HSP60 و HSP70 متعاقب تمرین بی هوازی با شدت بالا پس از ایسکمی - رپرفیوژن در عضله قلبی رت های صحرائی نر: اثر مکمل ملاتونین

مسعود جوکار^{۱*}، پژمان معتمدی^۱

چکیده

۱-استادیار گروه فیزیولوژی ورزشی.

زمینه و هدف: هدف از پژوهش حاضر بررسی تغییرات بیان ژن HSP60 و HSP70 متعاقب تمرین بی هوازی با شدت بالا در عضله قلبی رت های صحرائی نر پس از ایسکمی - رپرفیوژن: اثر مکمل ملاتونین بود.

روش بررسی: بدین منظور ۲۴ رت نر صحرائی ویستار با وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم به ۴ گروه ۶ تایی شامل گروه کنترل، ملاتونین، تمرین بی هوازی، و تمرین بی هوازی + ملاتونین تقسیم شدند. پروتکل تمرین بی هوازی به مدت یک ماه اجرا شد؛ ضمناً گروه تمرین بی هوازی ملاتونین در مدت تمرین نیز تحت عمل گاوژ ملاتونین قرار داشتند. در پایان یک ماه رت ها بعد از دو روز استراحت تحت تزریق داروی ایزوپرنالین برای ایجاد ایسکمی رپرفیوژن قرار گرفتند. بعد از دو روز رت ها تشریح و بطن چپ آنها خارج گردید. سپس میزان بیان ژن HSP60 و HSP70 رت ها با استخراج RNA و با تکنیک Real Time اندازه گیری شد.

یافته ها: نتایج تحقیق نشان داد که مصرف ملاتونین میزان بیان ژن آپوپتوزی HSP60 را کاهش و HSP70 را پس از تمرین بی هوازی افزایش داد ($p \leq 0/05$).

نتیجه گیری: نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تمرینات بی هوازی شدید با مصرف ملاتونین موجب کاهش حجم آپوپتوز میوکارد پس از ایسکمی رپرفیوژن ناشی از تزریق ایزوپرنالین می شود.

واژگان کلیدی: ملاتونین، HSP70، HSP60، تمرینات بی هوازی، ایسکمی - رپرفیوژن.

۱-گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه خوارزمی تهران، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول:

مسعود جوکار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه خوارزمی تهران، تهران، ایران.

تلفن: ۰۰۹۸۹۳۶۰۶۰۳۷۱۵۷

Email: masoudjokar20@gmail.com

آپوپتوز را با افزایش پروتئولیز کاسپاز ۳ تحریک می‌کند (۵).

در زمینه پیش آماده‌سازی برای محافظت از قلب، تا به امروز رویکردهای متعددی شناسایی و بررسی شده است. این راهبردها شامل فعالیت ورزشی، استرس گرمایی، پیش آماده‌سازی ایسکمی، استرس اکسیداتیو و مداخلات دارویی هستند. با این حال مطالعات متعددی نتیجه‌گیری کرده‌اند که تنها راهبرد عملی و قابل تحمل برای دستیابی به محافظت قلبی، فعالیت منظم ورزشی می‌باشد (۶). از طرف دیگر درمان دارویی بلند مدت شامل داروهای مسدود کننده بتا، ملاتونین، ممانعت از عمل آنزیم مبدل آنژیوتانسین، آسپرین، پلاویکس، وارفارین و کنترل چربی خون با استاتین مورد توجه قرار گرفته‌اند (۷). مصرف این مواد بیشتر به علت نقش گشادکنندگی عروق توسط آنها می‌باشد؛ به طوری که وقوع سکته در ابتدای صبح به دلیل کاهش ترشح ملاتونین در بدن است (۸). در عین حال فعالیت ورزشی نسبت به حالت طبیعی تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را افزایش می‌دهد؛ اما در مقابل یک سیستم حمایتی-حفاظتی به نام سیستم آنتی اکسیدان را برای به حداقل رساندن اثرات مخرب گونه‌های فعال، بیشتر افزایش می‌دهد (۹). از طرفی یکی از دلایل فواید ورزشی جهت محافظت قلبی، تغییرات مارکرهای آپوپتوزی نظیر HSP60 و همچنین افزایش مارکرهای آنتی آپوپتوزی نظیر HSP70 در سلول‌های میوکاردی است. در این راستا، تأثیر دیدن با شدت‌های پایین‌تر از $VO_{2MAX} 60\%$ یا بالاتر از $VO_{2MAX} 75\%$ برای جلوگیری از انفارکتوس میوکارد مشخص نیست اما برخی تحقیقات نشان داده‌اند تمرین‌های منظم و طولانی مدت بی‌هوای (تا $VO_{2MAX} 85\%$) کاهش معنی‌داری در نشانگرهای حوادث قلبی و عروقی دارند؛ به طوری که پس از ورزش بی‌هوای میزان HSP70 در ورزشکاران افزایش دارد (۱۰)؛ لذا به نظر می‌رسد زمان و شدت فعالیت ورزشی نیز عامل مهمی در القاء محافظت قلبی

توسعه بیماری شریان کرونری، سرآغازی است که منجر به ایسکمی میوکارد می‌شود. بیماری ایسکمی میوکارد به نبود اکسیژن ناشی از خونرسانی ناکافی اطلاق می‌گردد که این خود از عدم تعادل بین عرضه و تقاضای اکسیژن میوکارد ناشی می‌شود (۱).

در عین حال، یکی از اختلالات ایسکمی یا اختلال در خون شریان کرونری، شکل‌گیری بافت مرده در میوکارد است که انفارکتوس میوکارد یا سکته قلبی نام دارد (۱). بعد از یک انفارکتوس حاد، برقراری جریان خون مجدد یا رپرفیوژن میوکاردی به موقع و موفقیت-آمیز، موثرترین استراتژی برای کاهش اندازه آسیب انفارکتوس و بهبود عوارض بالینی است. چرا که پروسه برقراری جریان خون مجدد (رپرفیوژن) به میوکارد ایسکمی شده می‌تواند آسیب را افزایش دهد (۲). این پدیده که آسیب رپرفیوژن میوکارد نامیده می‌شود؛ می‌تواند به طور متناقضی اثرات سودمند رپرفیوژن میوکارد را کاهش دهد، و منجر به آسیب کشنده میوکارد شود (۲). در طی آسیب ایسکمی رپرفیوژن قلبی، تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد مشتق شده از اکسیژن، افزایش HSP60 در گردش خون، افزایش کلسیم درون سلولی، نشت H در سطوح میتوکندری و التهاب تحمیل می‌شود؛ که منجر به باز شدن منافذ نفوذپذیر میتوکندری می‌گردد (۳). این موضوع می‌تواند به کاهش ATP، اکسیداسیون غیرقابل برگشت پروتئین، چربی و DNA در کاردیومیوسیت‌ها منجر گردد؛ و فرآیند آپوپتوز را شروع کنند (۴). شواهد نشان می‌دهند که HSP70 و HSP27 مهم‌ترین پروتئین‌های درگیر در آپوپتوز هستند که بیشترین محافظت سلولی در مقابل آسیب ایسکمی رپرفیوژن را عهده دارند (۵). زیرا HSP70 و HSP27 مسدودکننده‌های Apaf-1 و سیتوکروم c می‌باشند و متعاقباً مهارکننده کاسپاز ۹ در آپوپتوز می‌باشند و سپس آبشار کاسپازی پایین دست مهار می‌گردد. در مقابل HSP60 به تنهایی یا همراه با HSP10 به طور مستقیم

Archive of SID

ها به مدت یک ماه فقط تحت مصرف مکمل ملاتونین قرار گرفتند و سپس بر روی آنها ایسکمی ریپرفیوژن انجام شد. ۳- گروه تمرین بی‌هوآزی ($n=6$): نمونه‌ها به مدت یک ماه ورزش بی‌هوآزی انجام دادند و سپس تحت ایسکمی ریپرفیوژن قرار گرفتند. ۴- گروه تمرین بی‌هوآزی و ملاتونین ($n=6$): نمونه‌ها به مدت یک ماه تمرین بی‌هوآزی همراه با مصرف ملاتونین انجام دادند و سپس تحت ایسکمی ریپرفیوژن قرار گرفتند.

در این طرح ابتدا رت‌ها به مدت یک هفته آشناسازی با تردمیل را داشتند؛ سپس پروتکل تمرین بی‌هوآزی به مدت یک ماه اجرا شد؛ در عین حال مکمل ملاتونین به گروه‌های ملاتونین، گروه تمرین بی‌هوآزی با ملاتونین نیز گاوآژ می‌شد. در پایان یک ماه تمرین، رت‌ها به مدت ۴۸ ساعت استراحت کردند و در روز بعد تحت تزریق ایزوپرنالین با دوز ۱۵۰ میلی‌گرم برحسب کیلوگرم قرار گرفتند. و بعد از یک روز استراحت تزریق دوم ایزوپرنالین با دوز ۱۲۵ میلی‌گرم بر حسب کیلوگرم انجام شد. در نهایت رت‌ها یک روز استراحت کردند و سپس تحت جراحی برای برداشت بطن چپ قرار گرفتند (۱۰).

روش تعیین دز ایجاد سکتة قلبی: هدف از مطالعه پایلوت تعیین میزان تزریق ایزوپرنالین برای ایجاد سکتة در قلب رت‌ها بود. بدین منظور از مطالعه‌ایی که در این زمینه انجام شده بود استفاده گردید؛ در این پژوهش تزریق ایزوپرنالین با سه دوز ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در دو روز متوالی با فاصله ۲۴ ساعت به صورت تزریق درون صفاقی استفاده شده بود؛ که در نتیجه محققین گزارش کردند که دوز ۱۵۰ و ۲۰۰ باعث فیبروز و نکروز قلب می‌شود اما به دلیل کاهش تلفات دوز ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن انتخاب شده است. بنابراین در تحقیق حاضر در روز اول رت‌ها تحت تزریق ایزوپرنالین با دوز ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن قرار گرفتند که یک رت در روز اول به دلیل تزریق ایزوپرنالین مُرد و به دلیل کاهش تلفات تزریق دوم

باشد. در مجموع با توجه به اینکه فعالیت ورزشی و ملاتونین با کاهش التهاب، استرس اکسیداتیو و آپوپتوزیس رابطه دارند؛ و سبب بهبود اثرات حفاظتی مهمی در قلب می‌شوند؛ و همچنین تمرینات ورزشی و ملاتونین قبل از ایسکمی می‌توانند حجم ضایعه ایجاد شده را کاهش دهند؛ و از طرفی پیش‌آماده‌سازی به عنوان یک مکانیسم مفید برای کاهش ضایعه و بهبود عملکرد قلب پس از ایسکمی- ریپرفیوژن است؛ فرض بر این است که ورزش بی‌هوآزی با مصرف مکمل ملاتونین می‌تواند نقش کلیدی جهت کاهش ضایعه و بهبود عملکرد قلب پس از سکتة در افراد ایفا کنند. به هر حال با توجه به اینکه تحقیقات اندکی اثر تمرینات بی‌هوآزی با مصرف ملاتونین را به دنبال ایسکمی بررسی کرده‌اند؛ مطالعه حاضر سعی بر آن دارد که تغییرات بیان ژن HSP60 و HSP70 متعاقب تمرین بی‌هوآزی با شدت بالا در عضله قلبی رت‌های صحرائی نر پس از ایسکمی- ریپرفیوژن: اثر مکمل ملاتونین، را مورد مطالعه قرار دهد.

روش بررسی

پژوهش حاضر از نظر طراحی تجربی و از نظر هدف توسعه ای می‌باشد. در این پژوهش ۲۴ رت صحرائی نر ویستار با وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم و سن ۲ تا ۳ ماهه استفاده شد؛ سپس حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و با دسترسی آزاد به آب و غذا در دمای 22 ± 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. کلیه مراحل تحقیق با مجوز کمیته اخلاق معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بهبهان با کد اخلاق IR.AJUMS.REC.1394.462 و بر اساس پروتکل اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام گردید. با توجه به اهداف پژوهش حیوانات به طور تصادفی به ۴ گروه زیر تقسیم بندی شدند: ۱- گروه کنترل ($n=6$): نمونه‌ها بدون هیچ فعالیت ورزشی و مصرف مکمل ملاتونین در پایان پروتکل یک ماهه تحت ایسکمی ریپرفیوژن قرار گرفتند. ۲- گروه ملاتونین ($n=6$): نمونه-

شد و سپس در میکروتیوب قرار گرفت. در کل کپسول ازت مایع جهت عمل انجماد قرار داده شد.

روش استخراج RNA

به منظور مطالعه تغییرات بیان ژن پروتئین HSP60 و HSP70، از روش Real-Time PCR استفاده شد. بدین منظور نمونه‌های بطن چپ که در میکروتیوب در درون کپسول ازت مایع بودند؛ برای هموژنیزه کردن از کپسول بیرون آورده شدند؛ سپس بوسیله ازت مایع و هاون سنگی در ظرفی به صورت ذرات بسیار ریز تبدیل شدند؛ و سپس با محلول ترایزول در میکروتیوب ریخته شدند. به طوری که به ازای هر ۳۰ تا ۶۰ میلی‌گرم بافت، یک میلی‌لیتر محلول ترایزول به میکروتیوب حاوی بافت اضافه شد. سپس به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس انجام شد و در ادامه با سمپلر عمل پیپتاژ انجام گردید؛ در عین حال کلیه این مراحل بر روی رک‌های یخ زده انجام گرفت. سپس این مراحل ادامه یافت تا اینکه محلول بوجود آمده بتواند از سرنگ ۵ سی‌سی عبور کند؛ و نمونه‌های حل شده به مدت چند روز در فریز منفی ۸۰ نگهداری شدند. در ادامه نمونه‌ها از فریز خارج شدند و به اندازه ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به محلول مایع اضافه گردید؛ و با استفاده از تکان‌های دست محلول‌های موجود در میکروتیوب ترکیب شدند. سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. در ادامه محلول رویی پس از سانتریفیوژ برداشته شد و به همان اندازه ایزوپروپانول به آن اضافه گردید. سپس نمونه‌ها بعد از ماندن در فریزر منفی ۸۰ به مدت یک شب نگهداری و در ادامه به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سپس محلول رویی دور ریخته شد و رسوب ایجاد شده در ته میکروتیوب بوسیله الکل ۷۵٪ (تهیه شده با آب دیپس) به مقدار یک میلی‌لیتر به مدت ۵ دقیقه با دور ۷۵۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. در ادامه این مرحله برای بار دوم تکرار گردید و سپس الکل رویی دور ریخته شد و میکروتیوب در زیر هود در دمای محیط قرار داده شد تا الکل مانده در میکروتیوب از رسوب جدا گردد. در نهایت ۳۳ میکرولیتر آب تثبیت

با دوز ۱۲۵ میلی‌گرم برحسب کیلوگرم انجام گرفت؛ سپس رت‌های گروه پایلوت بعد از تزریق دوم ایزوپرنالین به مدت ۲۴ ساعت استراحت کردند و سپس به منظور بررسی ایجاد ایسکمی رپرفیوژن در قلب کشته شدند؛ و با روش رنگ آمیزی تری کروماتون میزان آپوپتوز و نکروز بطن چپ آنها اندازه‌گیری شد. این روش هیستوتکنیک نشان داد که تزریق ایزوپرنالین با دوز ۱۵۰ و ۱۲۵ میلی‌گرم برحسب کیلوگرم در روز اول و دوم باعث آپوپتوز و نکروز در بطن چپ رت‌ها می‌شود؛ بدین منظور این دوز به عنوان دوز پایه برای تحقیق حاضر در نظر گرفته شد.

گاوژ ملاتونین

پودر ملاتونین محصول شرکت سیگما آمریکا با توجه به وزن رت‌ها به میزان ۱۰ میلی‌گرم برحسب کیلوگرم با ترازوی دیجیتال وزن شد؛ و سپس با اتانول در میکروتیوب حل شد؛ و سپس با محلول سالین رقیق گردید و با سرنگ و نیدل گاوژ تزریق ملاتونین انجام گرفت. گاوژ ملاتونین هر روز به مدت ۳۰ روز به گروه‌های ملاتونین تحقیق به میزان ۱۰ میلی‌گرم برحسب کیلوگرم در بعد از ظهرها با توجه به چرخه خواب و بیداری رت‌ها و جمع جبری ساعت گاوژ مطالعات پیشین خورانده شد (۱۱). بعد از پایان یک ماه، رت‌های گروه تجربی تحقیق به مدت ۴۸ ساعت استراحت کردند و تحت اولین تزریق ایزوپرنالین با دوز ۱۵۰ میلی‌گرم برحسب کیلوگرم قرار گرفتند. در روز بعد به فاصله ۲۴ ساعت تزریق دوم با دوز ۱۲۵ میلی‌گرم برحسب کیلوگرم انجام شد. سپس ۲۴ ساعت بعد، عمل خارج کردن بطن چپ رت‌ها با عمل جراحی انجام شد.

روش جراحی رت‌ها

به منظور عمل جراحی، رت‌ها به طور دقیق وزن شدند. سپس با کلروفرم بی‌هوش گردیدند. برای تشخیص بی‌هوشی با پنس قسمت ابتدایی دم فشرده شد و در صورت عدم وجود رفلکس و اطمینان از بی‌هوشی کامل، پوست و عضلات سینه کنار زده شد تا عضله قلب مشخص شود. سپس بطن چپ قلب از بقیه قلب جدا گردید و سپس با محلول سرم فیزیولوژی شستشو داده -

Archive of SID

گزارش می‌شد که آلودگی DNA را نشان می‌داد یک مرحله DNAase I انجام می‌شد. بدین منظور RNA موجود نمونه‌ها به نسبت همسان همراه با مواد جدول ۲ به یک میکروتیوب ریخته شدند. قابل ذکر است که بیان گردد حتماً آنزیم DNase I باید در مرحله آخر ریخته شود.

در ادامه، محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس مقدار یک ماکرولیتر EDTA با غلظت ۵۰ میلی مولار به آن اضافه گردید؛ و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. در ادامه سنتز cDNA با استفاده از کیت شرکت ویوانتیس انجام شد؛ به طوری که ۸ میکروگرم از محلول RNA، به مقادیر ۱ ماکرولیتر پرایمر Oligo 18 (dT) یا رندوم هگزامر و ۱ ماکرولیتر dNTP mix اضافه گردید و با استفاده از آب فاقد نوکلئاز به حجم ۱۰ ماکرولیتر رسید. محلول حاصل به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید و سپس برای آماده‌سازی مرحله بعد به مدت ۲ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. در ادامه میزان ۱۰ ماکرولیتر از ترکیب محلول cDNA synthesis mix (جدول ۳) به آن اضافه شد؛ سپس در صورت استفاده از پرایمر رندوم هگزامر یک مرحله انکوباسیون با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه اعمال گردید در غیر این صورت از این مرحله چشم‌پوشی شد و سپس محلول حاصل به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس محلول cDNA حاصل به مقدار ۲۰ میکرولیتر به فریزر منفی ۸۰ یا ۲۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شد.

طراحی پرایمرها

به منظور پیدا کردن توالی پرایمرها ابتدا مقالات در این زمینه پیدا شدند و سپس توالی ژن HSP60 و HSP70 و همچنین house keeping بررسی گردیدند (۱۲، ۱۳، ۱۴)؛ سپس از طریق سایت ncbi تأیید شدند

کننده RNA به رسوب اضافه شد و به مدت ۵ تا ۷ دقیقه در انکوباتور با دمای ۵۵-۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵-۱۰ دقیقه قرار داده شد تا RNA در آب حل شود. سپس محلول ایجاد شده به میکروتیوب‌های ۵ میکرولیتری تقسیم و در نهایت در فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان سنتز cDNA نگهداری شد. به منظور تعیین کیفیت RNA استخراج شده ژل الکتروفورز تهیه شد. بدین منظور نیم گرم آگارز با ۵۰ میلی لیتر TEA یک درصد، داخل ارلن ترکیب شد و با حرارت حل شدند. بعد به ازای هر ۵۰ میلی لیتر از این ترکیب ۵ لاندان رنگ DNA Green viewer در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد ریخته شد. سپس با تکان‌های ارلن، رنگ و محلول ترکیب شدند و در ادامه این ترکیب در داخل کاست شانه داری ریخته شد و حدود نیم ساعت به همین حالت رها شد تا اینکه ژل آماده لود کردن نمونه‌ها گردید. در ادامه ژل مورد نظر در تانک الکتروفورز که با بافر یک درصد TEA (تریس، استیک اسید و EDTA) پر شده بود گذاشته شد؛ سپس RNA با لودینگ دای به نسبت ۵ به ۵ مخلوط گردید و در داخل چاهک‌ها ریخته شد. سپس دستگاه با ولتاژ ۹۰ و آمپر ۱۰۰ راه اندازی شد. در نهایت بعد از گذشت حدود ۱/۳۰ تا ۲ ساعت ژل در داخل دستگاه ژل داک بررسی گردید.

به منظور تهیه cDNA حدود ۳ لاندان از RNA استخراج شده بوسیله دستگاه نانودراپ تعیین غلظت شد؛ تا میزان غلظت RNA و آلودگی آنها با DNA با توجه به OD (نسبت طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰) مشخص شوند. در صورتی که OD نمونه‌ها از ۱/۸-۲/۲ کمتر بودند نشان از آلودگی DNA بود. مقدار غلظت RNA و OD تمام نمونه‌ها در جدول ۱ ارائه شده است.

روش سنتز cDNA

برای سنتز cDNA پس از اینکه مقدار ۳ میکرولیتر از RNA استخراج شده بوسیله دستگاه نانودراپ تعیین غلظت شد؛ در صورتی که OD (نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰) RNA استخراج شده کمتر از ۱/۸-۲/۲

طول یک ماه تمرین بود. برنامه تمرین به مدت یک ماه هر هفته سه جلسه اجرا شد (جدول ۶). شیب تردمیل در پروتکل بی‌هوای از ۵ درجه تا ۲۰ درجه در طول یک ماه تمرین هر هفته به میزان ۵ درجه نیز افزایش یافت؛ به طوری که پروتکل تمرین با شیب ۵ درجه شروع شد و با ادامه تمرین بی‌هوای هر هفته ۵ درجه به شیب هر دو پروتکل افزوده می‌شد؛ در نهایت پروتکل تمرینات بی‌هوای با شیب ۲۰ درجه پایان یافتند (۱۵،۱۶).

روش آماری

برای مقایسه میانگین وزن رت‌ها در گروه‌های مختلف از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه استفاده شد. سپس برای بررسی تفاوت میانگین فیروز در گروه پایلوت و سالم از آزمون تی مستقل استفاده گردید. در ادامه برای کمی‌سازی مقادیر بیان ژن‌های مورد نظر از فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ استفاده گردید؛ سپس از فرمول Fold change برای چند برابری بیان ژن استفاده شد. همچنین برای تفاوت بیان ژن بین گروه‌ها از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. در صورتی که داده همگن نبودند از آزمون ناپارامتریک کراسکال والیس استفاده گردید. در نهایت برای تمام آزمون‌ها سطح معناداری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

(جدول ۴). در نهایت دمای مطلوب پرایمرها از سایت محاسبه الیگونوکلئوتید کسب شد.

روش آماده سازی Real-time

به منظور آماده سازی مواد ریل تایم ۲۰ لاندا cDNA موجود با آب دیپس به نسبت ۱ به ۵ رقیق شد؛ سپس ۲ لاندا cDNA از هر گروه تحقیق به چاهک‌های دستگاه ریل تایم ریخته شد؛ در ادامه ۱۸ لاندا از محلول مستر میکس، آب و پرایمر (یک لاندا از پرایمر فوروارد و ریورز، ۱۳ لاندا آب و ۴ لاندا مستر میکس) به آن اضافه گردید (جدول ۵). در نهایت حجم نهایی چاهک‌ها ۲۰ لاندا شد زیرا کمتر از این مقدار باعث افزایش واریانس داده‌ها می‌گردید.

پروتکل تمرین

گروه‌های تجربی تحقیق به مدت یک هفته به منظور آشناسازی با پروتکل تمرین بر روی تردمیل عمل دویدن را با سرعت ۱۵ تا ۲۰ متر بر دقیقه به صورت یک روز در میان انجام دادند. سپس بعد از وزن کشی، پروتکل اصلی تمرین بی‌هوای با مصرف مکمل ملاتونین به مدت یک ماه انجام شد. پروتکل تمرین بی‌هوای تحقیق حاضر با کمی تغییر با توجه به مطالعات پیشین بدست آمد (۱۵،۱۶). تمرینات بی‌هوای شامل دویدن بر روی تردمیل مخصوص حیوانات با افزایش سرعت و شدت در

جدول ۱: مقدار غلظت RNA و OD نمونه‌های تحقیق

OD						نمونه‌های تحقیق
۶	۵	۴	۳	۲	۱	
۱/۹۲	۱/۹۰	۱/۸۲	۱/۹۰	۱/۸۶	۱/۸۶	گروه ایسکمی رپرفیوژن
۴۹۴۴	۲۰۶۹	۳۲۹۵	۳۵۴۲	۳۶۹۰	۱۹۱۷	غلظت ng/μl
۱/۹۶	۲	۱/۹۷	۱/۹۴	۱/۹۴	۱/۹۷	گروه ملاتونین
۲۶۵۸	۳۴۱۵	۲۴۳۹	۱۶۶۶	۲۱۰۳	۱۷۶۹	غلظت ng/μl
۱/۹۴	۱/۸۹	۱/۸۲	۱/۹۴	۱/۹۵	۱/۹۷	گروه بی‌هوای
۳۵۵۲	۱۸۹۸	۳۸۵۰	۲۵۷۷	۳۹۳۵	۲۱۴۴	غلظت ng/μl
۲/۰۸	۲	۲/۰۳	۲/۰۷	۲/۰۸	۲/۰۲	گروه بی‌هوای ملاتونین
۶۲۱۰	۲۱۹۳	۱۷۱۷	۲۲۰۲	۲۵۱۹	۸۳۸۸	غلظت ng/μl

جدول ۲: پروتکل DNAase I برای رفع آلودگی DNA

مقادیر مورد نیاز	مواد مورد نیاز
1 µg	RNA
1 µl	10X reaction buffer with MgCl ₂
0.5µl (0.5u)	DNaseI, RNase-free
to 10 µl	DEPC-treated Water

جدول ۳: محتویات محلول cDNA synthesis mix

مقادیر مورد نیاز	مواد مورد نیاز
2 µl	10x buffer m-Mulv
0.5µl (100 unit)	M-MulV Revers Transcriptase
top up to 10 µl	nuclease-free Water

جدول ۴: توالی پرایمرها

ژن مورد نیاز	توالی پرایمر	دمای بهینه
HSP60	F CAATAACACAAATGAAGAGGCTGG R TACAGCATCAACAGCCAACATC	۶۷
HSP70	F GGTCTCAAGGGCAAGATCAG R TTTCTCAGCCAGCGTGTTAG	۶۰
GAPDH	F GAACATCATCCCTGCATCCA R CCAGTGAGCTTCCCGTTCA	۶۰

جدول ۶: پروتکل تمرین بی‌هوایی

سرد کردن	بدنه اصلی تمرین بی‌هوایی	گرم کردن	مراحل تمرین مؤلفه تمرین
۶ دقیقه	۲۳ تا ۱۵ دقیقه	۶ دقیقه	زمان تمرین (دقیقه)
۵۰ تا ۶۰٪	۸۰ تا تقریباً ۱۰۰٪	۵۰ تا ۶۰٪	شدت تمرین (VO _{2max})
۱۵-۲۰	۳۰ تا تقریباً ۵۰	۱۵ تا ۲۰	سرعت دویدن (m/ min)
۹۰ تا ۱۲۰ متر	۶۹۰ تا ۷۵۰	۹۰ تا ۱۲۰ متر	مسافت کل بی‌هوایی
صفر	۵ تا ۲۰ درجه	صفر	شیب تردمیل (درجه)

یافته‌ها

برابر). نتایج fold change ژن HSP70 نشان داد که میزان بیان این ژن در گروه ملاتونین افزایش داشته است (۱/۴ برابر)؛ اما در بقیه گروه‌ها این افزایش بیشتر بود. نتایج این تحقیق نشان داد میزان بیان ژن HSP70 در گروه‌های تحقیق تغییرات معنی‌داری نداشته است؛ زیرا مقدار آماره (۰/۹۸۹) بزرگتر از مقدار معنی‌داری (۰/۰۵) است. به عبارت دیگر تیمار ملاتونین و تمرین بی‌هوایی بر بیان ژن HSP70 تأثیر معنی‌داری نداشته است (جدول ۸).

به منظور محاسبه fold change گروه‌های مختلف، میانگین بیان نسبی گروه کنترل تحقیق (کنترل) محاسبه گردید؛ سپس fold change تمام گروه‌های تحقیق، نسبت به بیان نسبی گروه کنترل گزارش شد. نتایج fold change ژن HSP60 نشان داد که میزان بیان این ژن در گروه ملاتونین افزایش داشته است (۱/۰۹ برابر)؛ اما در بقیه گروه‌ها کاهش داشته است؛ و همچنین کاهش در گروه تمرین بی‌هوایی ملاتونین بیشتر گزارش شد (۰/۳۸).

همچنین نتایج این تحقیق نشان داد میزان بیان HSP60 در گروه‌های تحقیق تغییرات معنی‌داری نداشته است؛ زیرا مقدار آماره (۰/۲۹۷) بزرگتر از مقدار (۰/۰۵) است. به عبارت دیگر تیمار ملاتونین و HSP60 تأثیر معنی‌داری نداشته است (جدول ۹).

جدول ۷: محاسبه مقادیر fold change تمام گروه‌های تحقیق

Final Fold change HSP70	Final Fold change HSP60	Fold change HSP70	Fold change HSP60	میانگین بیان نسبی گروه کنترل برای HSP70	میانگین بیان نسبی گروه کنترل برای HSP60	گروه‌ها
۱	۱	۰/۰۴۴۲۲۷۷۵۳	۰/۰۳۹۹۰۴۱۶۳	۰/۷۲۱۴۱۶	۴۴۵/۳۶۴۵	کنترل
		۲/۱۶۰۰۹۶۵۰۱	۳/۶۸۳۷۰۳۸۹۲	۰/۱۲۹۵۱۱۹۴۷		
		۰/۱۲۴۲۳۰۸۱۳	۰/۱۴۷۷۷۴۲۵۳			
		۱/۶۷۱۴۴۴۸۶۳	۰/۱۴۷۷۷۴۲۵۳			
۱/۴۴۵۸۳۹	۱/۰۹۳۴۱۲	۰/۷۱۷۵۲۳۹۴	۰/۵۸۲۸۳۴۰۶۱			ملاتونین
		۰/۴۲۹۶۰۸۱۹۴	۰/۲۸۵۴۱۹۷۵			
		۱/۲۹۳۳۳۴۷۸	۱/۱۹۰۱۶۱۲۸۸			
		۳/۳۴۲۸۸۹۷۲۷	۲/۳۱۵۲۳۲۵۳			
۱/۵۷۲۶۵۶	۰/۷۸۰۷۳	۰/۶۷۸۸۱۷۵۴۸	۰/۹۴۰۲۷۶۵۸۵			بی هوازی
		۱/۱۵۷۵۶۷۰۵۳	۱/۴۰۵۵۷۱۷۴۷			
		۴/۰۵۸۹۱۹۶۰۶	۰/۵۱۸۰۴۷۷۹			
		۰/۳۹۵۳۲۰۷۹۹	۰/۲۵۹۰۲۳۶۸۹۵			
۱/۷۷۸۰۸۱	۰/۳۸۳۵۸۲	۲/۲۶۳۷۷۹۹۹۵	۰/۲۴۸۴۷۷۲۳۲۸			ملاتونین بی هوازی
		۰/۳۰۱۶۸۱۰۰۵	۰/۰۴۶۷۵۱۵۲۱			
		۳/۷۰۹۱۶۸۳۹	۰/۷۰۲۷۸۵۸۷۴			
		۰/۷۳۷۶۹۴۶۹۵	۰/۵۳۶۳۱۶۷۰۶			

جدول ۸: آزمون تحلیل واریانس مقادیر بیان ژن HSP70 در گروه‌های تحقیق

Sig	F	لون	انحراف استاندارد	میانگین	گروه‌های تحقیق	متغییر تحقیق
				۱	کنترل	2-ΔΔCT HSP70
			۱/۳۱۴۶	۱/۴۴۵۸۳	ملاتونین	
۰/۹۸۹	۰/۱۰۷	۰/۶۶۴	۱/۶۸۷۰	۱/۵۷۲۶۵	بی هوازی	
			۱/۵۶۳۵	۱/۷۷۸۰۸	بی هوازی ملاتونین	

جدول ۹: آزمون کراسکال والیس برای مقادیر بیان ژن HSP60 در گروه‌های تحقیق

متغیر تحقیق	گروه‌های تحقیق	تعداد گروه‌ها	رتبه‌بندی میانگین‌ها	انحراف استاندارد	Sig
2-ACcHSP60	کنترل	۴	۸/۵		
	ملاتونین	۴	۱۷/۲۵	۰/۸۴۳	۰/۲۹۷
	بی‌هوازی	۴	۱۵/۷۵		
	بی‌هوازی ملاتونین	۴	۱۰/۵۰		

بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که مصرف ملاتونین میزان بیان ژن آپوپتوزی HSP60 و HSP70 را افزایش می‌دهد؛ اما این افزایش معنی دار گزارش نشد (سطح آماره گروه ملاتونین برای ژن‌های HSP60 و HSP70 به ترتیب ۰/۲۹۷ و ۰/۹۸۹ گزارش شد). نتایج تحقیق حاضر با تحقیقات پیشین از نظر افزایش بیان HSP60 و HSP70 همسو است اما از نظر معنی‌داری غیر همسو است. که این نتایج با یافته‌های تحقیق فورمن و همکاران در سال ۲۰۱۰ غیر همسو است (۱۱). زیرا این محققان اثرات مفید ملاتونین را بر تغییرات قلب رت‌های پیر بررسی کردند؛ در حالی که تحقیق حاضر از رت‌های ۲ تا ۳ ماهه استفاده کرده است؛ و به نظر می‌رسد که در تحقیق فورمن و همکاران ملاتونین بیشتر نقش آنتی‌اکسیدانی خود را اعمال کرده است زیرا آنتی‌اکسیدان‌ها در رت‌های پیر کاهش می‌یابد و متعاقباً با تیمار ملاتونین تا حدودی این کاهش جبران می‌شود و می‌تواند از حجم آپوپتوز و نشانگرهای آن بکاهد. در حالی که در تحقیق حاضر ملاتونین بیشتر نقش خواب‌آوری و رگ‌گشایی خود را در رت‌های ۲ تا ۳ ماهه اعمال کرده است؛ به طوری که با خواب‌آوری و عدم تحرک و عمل رگ‌گشایی میزان نفوذ چربی در میوکارد افزایش می‌یابد و در ادامه شاخص‌های التهابی مانند TNF- α و رادیکال‌های آزاد مانند ROS و RNS بیشتر می‌شوند و در نهایت میوکارد مستعد به آسیب ایسکمی می‌گردد. در تأیید این مطلب تحقیق فورمن و همکاران بیان کردند پس از درمان با ملاتونین پارامترهای التهابی، استرس اکسیداتیوی و

آپوپتوزی در رت‌های مستعد به پیری نسبت به رت‌های جوان بیشتر معکوس شدند. حال به نظر می‌رسد ملاتونین با ویژگی‌های خود مانند خاصیت آنتی‌اکسیدانی، رگ‌گشایی و خواب‌آوری می‌تواند نقش دوگانه ایفا کند؛ به طوری که اگر خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن غالب شود می‌تواند نقش مفیدی اعمال کند؛ اما در صورتی که نقش رگ‌گشایی و خواب‌آوری آن غالب گردد می‌تواند نقش زیان‌آوری اعمال کند. از طرفی دیگر تحقیقی نشان داد که ملاتونین منجر به کاهش VEGF و افزایش ROS در تخمدان می‌شود؛ بنابراین به نظر می‌رسد تیمار ملاتونین در تحقیق حاضر میزان آنژیوژنز میوکارد را به دلیل عدم تحرک و کاهش شیر استرس کاهش داده است و از این طریق شاید بطن چپ رت‌ها را بیشتر مستعد به آسیب ایسکمی ریپرفیوژن کرده است (۱۷). زیرا میزان اکسیژن‌رسانی به میوکارد کاهش و از طرفی میزان نفوذ لیپیدها، مواد التهابی افزایش می‌یابد؛ به این دلایل میوکارد بیشتر مستعد به آسیب می‌گردد.

یافته‌های دیگر تحقیق نشان داد که تمرین بی‌هوازی میزان بیان ژن HSP60 و HSP70 را کاهش و افزایش داده است. اما این کاهش در مقایسه با گروه ایسکمی ریپرفیوژن معنی‌دار بیان نشد (سطح آماره HSP60 ۰/۲۷۹ بیان شد). این نتایج از نظر اینکه میزان بیان ژن HSP60 کاهش و HSP70 افزایش داشته است با تحقیق شیرین بیان و همکاران (۱۳۹۰) همسو است (۱۸)، اما از نظر معنی‌داری غیر همسو است. رت‌های پژوهش شیرین بیان و همکاران، گروه‌های ۱ و ۲ به مدت ۳ هفته

شامل افزایش گردش خون شریان کرونری پروتئین های استرس شبکه آندوپلاسمی، افزایش فعالیت سیکلواکسیژناز ۲، القای پروتئین های شوک گرمایی میوکاردا، افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی سیتوزولی میوکاردا، افزایش سیگنالینگ نیتریک اکساید، تغییر فنوتیپ میتوکندریایی، تغییر و افزایش کانال های پتاسیم حساس به ATP سارکولمایی و غشای داخلی میتوکندریایی ذکر کرد. در نهایت محققین نشان دادند افزایش سطوح آنتی اکسیدانی میوکاردا و افزایش بیان کانال های پتاسیمی حساس به ATP به محافظت قلبی ناشی از ورزش در مقابل آسیب ایسکمی رپرفیوژن کمک می کند؛ چرا که این عوامل سبب کاهش آسیب به میتوکندری می شود و استحکام غشای میتوکندری را افزایش می دهند در نهایت سبب افزایش ژن HSP70 در میتوکندری می گردد (۲۰) (شکل ۵-۲).

یافته های دیگر تحقیق نشان داد که تمرین بی‌هوای با مصرف ملاتونین میزان بیان ژن HSP60 و HSP70 را به ترتیب کاهش و افزایش داده است. اما این کاهش و افزایش در مقایسه با گروه ایسکمی رپرفیوژن معنی دار بیان نشد (سطح آماره به ترتیب برای ژن HSP60 ۰/۲۹۷ و در ژن HSP70 ۰/۹۸۹ بیان شد)؛ این نتایج نشان می دهد که تمرین بی‌هوای با مصرف ملاتونین توانسته است میزان بیان HSP60 را نسبت به سایر گروه ها به مقدار بیشتر کاهش دهد؛ زیرا از طرفی مصرف ملاتونین با خاصیت آنتی اکسیدانی خود توانسته به عدم سازگاری تمرین در گروه تمرین بی‌هوای کمک کند و کمبودهای آنتی اکسیدانی گروه هوای و بی‌هوای را جبران کند؛ و از طرف دیگر تمرین ورزشی میزان نفوذ پروفایل های چربی را مانند LDL و VLDL در گروه ملاتونین به دلیل عدم تحرک و خواب آوری جبران کرده است و این عوامل اثر افزایشی بر هم گذاشته اند که در نهایت منجر به کاهش میزان HSP60 در میوکاردا شده اند.

اما دلیل افزایش بیشتر بیان ژن HSP70 در گروه تمرین ورزشی با ملاتونین در مقابل تمرین ورزشی به تنهایی به نظر می رسد میزان التهاب کمتر در گروه ورزشی

(۵) جلسه در هفته) با سرعت ۱۷-۱۵ متر در دقیقه و مدت ۳۹-۲۵ دقیقه و گروه های ۳ و ۴ به مدت ۶ هفته با سرعت ۲۰-۱۵ متر در دقیقه و مدت ۵۴-۲۵ دقیقه تمرین کرده اند؛ در حالی که رت های تحقیق حاضر ۴ هفته و در هر هفته ۳ بار تمرین داده شدند. حال به نظر می رسد مدت تمرین به منظور سازگاری ویژگی های تمرین می تواند مفید باشد. تمرین بی‌هوای که دارای شدت بیشتری بوده است به دلیل سازگاری کمتر میزان بیان ژن HSP70 آن کمتر بوده است. حال به نظر می رسد اگر مدت زمان جلسات تمرین بیشتر شود و یا تواتر آن در هفته افزایش یابد بتوان بر میزان بیان نشانگرهای HSP70 تأثیر گذار باشد. زیرا با سازگاری تمرین عوامل اکسیدانی، التهابی، پروفایل های چربی و در نهایت عوامل آپوپتوزی مانند کاسپاز ۳ کاهش می یابند در مقابل عوامل آنتی اکسیدانی، پیش بقای سلولی مانند مسیر IGF1-R/PI3K/AKT افزایش می یابند که در مجموع می تواند آپوپتوز قلبی را کاهش دهند. از طرف دیگر رت های تحقیق شیرین بیان و همکاران ۶ هفته تمرین هوای داشته اند اما رت های تحقیق حاضر ۴ هفته تمرین کرده اند. بنابراین به نظر می رسد مدت زمان تمرین به منظور سازگاری ویژگی های تمرین می تواند عامل مهمی برای تحت تأثیر قرار دادن بیان ژن HSP70 در میوکاردا باشد. زیرا تحقیقات نشان داده اند که سازگاری سیستم اکسایشی نسبت به تمرینات ورزشی برای افراد ضروری است؛ زیرا افرادی که تمرینات منظم ندارند و یا معمولاً در پایان هفته، یک وهله تمرین شدید و خستگی ساز را انجام می دهند علاوه بر آسیب مکانیکی دچار آسیب بافتی بیشتر به دلیل رادیکال های آزاد می شوند (۱۹). بنابراین به نظر می رسد با افزایش مدت تمرین ورزشی می توان عوامل پیش آپوپتوزی میوکاردا را کاهش داد. در تأیید مطالب بالا اسکات و همکاران در سال ۲۰۰۸ در طی تحقیقی بیان کردند که تمرین ورزشی، محافظتی در مقابل آسیب ایسکمی رپرفیوژن میوکاردا است (۲۰). زیرا تمرین استقامتی در مقابل تمام سطوح آسیب های ایسکمی رپرفیوژن از قلب محافظت می کند. این تحقیق مکانیزم های مورد نظر اثرات محافظت قلبی ناشی از ورزش را

Archive of SID

گلوکاتایون پراکسیداز ناشی از ورزش پس از درمان با ملاتونین جلوگیری شد (۲۲). از طرف دیگر همچنین ورزش و ملاتونین با توجه به افزایش عوامل پیش بقا مانند مسیرهای سلولی IGF1-R/PI3K/AKT و JAK2/STAT3 توانسته‌اند میزان پیش بقای میوکارد را افزایش دهند که احتمالاً با افزایش مدت زمان تمرین و مصرف ملاتونین می‌توان به یک نتیجه بهتری دست یافت. چرا که ورزش و ملاتونین هموستاز کلسیم، نفوذپذیری میتوکندری، رهایش سیتوکروم C و آدرنالین را بهبود می‌بخشند که همه این عوامل می‌توانند به کاهش آسیب ایسکمی ریپرفیوژن دخالت کنند (۲۳). حال با توجه به یافته تحقیق حاضر و تحقیقات پیشین به نظر می‌رسد ملاتونین همراه با ورزش می‌تواند از اختلالات سیستم قلبی عروقی مانند افزایش رادیکال‌های آزاد، ROS، RNS، اکسیدان‌ها و عوامل آپوپتوزی مانند HSP60 جلوگیری کند و از طرف دیگر عوامل آنتی اکسیدانی را مانند سوپراکسید دسموتازها و گلوکاتایون و همچنین عوامل آنتی آپوپتوزی را مانند HSP70 و پروتئین‌های شوک گرمایی مانند HSP72 و پروتئین‌های کانال‌های یونی مانند کلسیم و پتاسیم را افزایش دهد. از این رو توصیه می‌گردد با افزایش مدت زمان تمرین و تواتر تمرین در هفته همراه با مصرف ملاتونین بتوان از میزان حجم آپوپتوز احتمالی ناشی از ایسکمی ریپرفیوژن کاست (۲۴).

نتیجه‌گیری

به طور خلاصه اصلی‌ترین یافته پژوهش حاضر این است که تمرینات بی‌هوای با مصرف ملاتونین موجب کاهش حجم آپوپتوز میوکارد پس از ایسکمی ریپرفیوژن ناشی از تزریق ایزوپرنالین می‌شود. زیرا ایسکمی موجب سلسله رویدادهایی مانند کاهش اکسیژن و مواد غذایی سلول و متعاقباً افزایش کلسیم، لاکتات و رادیکال‌های آزاد می‌شود که در نهایت منجر به آپوپتوز و مرگ برنامه ریزی شده سلول می‌گردد. بنابراین براساس یافته‌های

با مصرف ملاتونین باشد. زیرا ونوروسو و همکاران در سال ۲۰۰۹ بیان کردند هنگامی که عضله قلب تحت ورزش حاد قرار می‌گیرد باعث افزایش علائم آسیب سلولی می‌شود (۲۱)؛ چرا که ورزش همراه با افزایش معنی‌دار فعالیت مالوپراکسیدازها و سطوح mRNA $TNF-\alpha$ ، $IL-1$ و $IL-6$ است. علاوه بر این، محققین نشان دادند هر دو غلظت mRNA و پروتئین مولکول چسبان درون سلولی ۱، نیتریک اکساید سنتتاز القایی و سیکلوآکسیژناز ۲ افزایش یافت. همچنین فعالیت معنی‌دار NF-KB در رت‌های تمرین کرده مشاهده شد. در مقابل این اثرات به طور کلی و جزئی با تیمار ملاتونین مسدود شد. بنابراین می‌توان گفت ملاتونین از آسیب قلبی ناشی از ورزش محافظت می‌کند (۲۱).

در تأیید این مطلب کومار و همکاران در سال ۲۰۰۲ تحقیقی تحت عنوان اثرات ملاتونین خوراکی و استرس اکسیداتیو ناشی از ورزش در افراد سالم انجام دادند (۲۲). در این تحقیق به افراد سالم اجازه داده شد تا بر روی تردمیل به مدت ۱۲ دقیقه بر اساس پروتکل بروس بدونند. خون افراد پیش و پس از ورزش جمع-آوری شد تا محصولات پراکسیداسیون لیپید، فعالیت کل آنتی اکسیدان در پلاسما و سوپراکسید دسموتاز برآورد شود. پس از سه روز، همان افراد ۱۰ میلی گرم قرص ملاتونین دو ساعت پیش از ورزش دریافت کردند. سپس پراکسیداسیون لیپید، فعالیت کل آنتی اکسیدان در پلاسما و سوپراکسید دسموتاز پیش و پس از ورزش سنجش شد. در افراد پس از ورزش محصولات پراکسیداسیون لیپید مانند مالونیل دی آلدئید به طور معنی‌داری افزایش داشت؛ در حالی که سوپر اکسید دسموتاز و گلوکاتایون پراکسیداز کاهش داشت. تغییری در فعالیت کل آنتی اکسیدان پلاسما یا فعالیت کاتالاز در RBC پیش و پس از ورزش وجود نداشت. سطح پایه محصولات پراکسیداسیون لیپید در افراد تحت درمان با ملاتونین در مقایسه با مطالعه بدون ملاتونین به طور معنی‌داری کاهش داشت؛ همچنین از کاهش سوپراکسید دسموتاز و

عنوان روشی در دستور کار بیماران مستعد دارای بیماری قلبی شریان کرونر قرار گیرد؛ زیرا برخلاف دارو درمانی که عوارض جانبی و اثربخشی محدود به همراه دارد تمرین ورزشی هیچگونه عوارض جانبی ندارد؛ به همین دلیل یافته تحقیق حاضر از اهمیت ویژه ای برخوردار است.

قدردانی

تحقیق حاضر برگرفته از رساله دکتری دانشکده تربیت بدنی دانشگاه خوارزمی تهران می‌باشد. مراتب سپاس و قدردانی خود را از تمام افرادی که در انجام این تحقیق کمک نمودند اعلام می‌نمایم.

پژوهش حاضر، سازوکارهای احتمالی به منظور کاهش حجم آپوپتوز میوکارد تمرین ورزشی و مصرف داروها می‌باشد. چرا که موجب ارتقای هموستاز سلول از نظر غشای سلول، آنتی اکسیدان‌ها، غشای میتوکندری، کانال‌های یونی مانند کلسیم و پتاسیم و در نهایت افزایش مقاومت سلول در مقابل ایسکمی رپرفیوژن می‌گردد. در عین حال، بخش‌های ناشناخته زیادی در سطح سلول وجود دارد؛ اما بیان ژن HSP60 و HSP70 از مهمترین نشانگرهای آپوپتوز می‌باشند؛ که یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که تمرین بی‌هوای با مصرف ملاتونین می‌تواند بر بیان ژن HSP60 و HSP70 تأثیر بگذارد؛ و میزان بیان آنها را به ترتیب کاهش و افزایش دهند. بنابراین رویکرد پیش آماده‌سازی ورزش می‌تواند به

منابع

- 1-Borges JP, França GdO, Cruz MD, Lanza R, Nascimento ARd, Lessa MA. Aerobic exercise training induces superior cardioprotection following myocardial ischemia reperfusion injury than a single aerobic exercise session in rats. *Motriz: Revista de Educação Física*. 2017;23(SPE).
- 2-Ghahremani R, Salehi I, Komaki A, Damirchi A. Preconditioning Effect of High-Intensity Aerobic Training on Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury and Beclin-1 Gene Expression in Rats. *PTJ*. 2018; 8 (2) :115-121
- 3-Younis NS, Mohamed ME. β -Caryophyllene as a Potential Protective Agent Against Myocardial Injury: The Role of Toll-Like Receptors. *Molecules*. 2019;24(10):1929.
- 4-Ha S-J, Kim W. Mechanism of ischemia and reperfusion injury to the heart: from the viewpoint of nitric oxide and mitochondria. *Chonnam Medical Journal*. 2010;46(3):129-39.
- 5-Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(1):92-100.
- 6-Borges JP, da Silva Verdoorn K. Cardiac ischemia/reperfusion injury: the beneficial effects of exercise. *Exercise for Cardiovascular Disease Prevention and Treatment: Springer*; 2017. p. 155-79.
- 7-Rasouli M, Fazel Bakhsheshi M. Brand Positioning of the Sport Sciences Research Institution of Iran using Perceptual Mapping Technique. *Annals of Applied Sport Science*. 2018;6(1):103-13.
- 8-Zhai M, Li B, Duan W, Jing L, Zhang B, Zhang M, et al. Melatonin ameliorates myocardial ischemia reperfusion injury through SIRT 3- dependent regulation of oxidative stress and apoptosis. *Journal of pineal research*. 2017;63(2):e12419.
- 9-Sen CK. Oxidants and antioxidants in exercise. *Journal of applied physiology*. 1995;79(3):675-86.
- 10-Yamada P, Amorim F, Moseley P, Schneider S. Heat shock protein 72 response to exercise in humans. *Sports Medicine*. 2008;38(9):715-33.
- 11-Forman K, Vara E, García C, Kireev R, Cuesta S, Acuña- Castroviejo D, et al. Beneficial effects of melatonin on cardiological alterations in a murine model of accelerated aging. *Journal of pineal research*. 2010;49(3):312-20.
- 12-Hosseinzadeh L, Behravan J, Mosaffa F, Bahrami G, Bahrami A, Karimi G. Curcumin potentiates doxorubicin-induced apoptosis in H9c2 cardiac muscle cells through generation of reactive oxygen species. *Food and Chemical Toxicology*. 2011;49(5):1102-9.
- 13-Shi J, He J, Lin J, Sun X, Sun F, Ou C, et al. Distinct response of the hepatic transcriptome to Aflatoxin B 1 induced hepatocellular carcinogenesis and resistance in rats. *Scientific reports*. 2016; 6:31898.
- 14-Yang B, Jain S, Ashra SY, Furness PN, Nicholson ML. Apoptosis and caspase-3 in long-term renal ischemia/reperfusion injury in rats and divergent effects of immunosuppressants. *Transplantation*. 2006;81(10):1442-50.
- 15-Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen Ø. 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.

Archive of SID

- 16-Haram PM, Kemi OJ, Lee SJ, Bendheim MØ, Al-Share QY, Waldum HL, et al. Aerobic interval training vs. continuous moderate exercise in the metabolic syndrome of rats artificially selected for low aerobic capacity. *Cardiovascular research*. 2008;81(4):723-32.
- 17-Li Y, Liu H, Sun J, Tian Y, Li C. Effect of melatonin on the peripheral T lymphocyte cell cycle and levels of reactive oxygen species in patients with premature ovarian failure. *Experimental and therapeutic medicine*. 2016;12(6):3589-94.
- 18-Milne KJ, Noble EG. Exercise-induced elevation of HSP70 is intensity dependent. *Journal of Applied Physiology*. 2002;93(2):561-8.
- 19-Gomez-Cabrera M-C, Domenech E, Viña J. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free radical biology and medicine*. 2008;44(2):126-31.
- 20-Powers SK, Quindry JC, Kavazis AN. Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia–reperfusion injury. *Free Radical Biology and Medicine*. 2008;44(2):193-201.
- 21-Veneroso C, Tuñón MJ, González- Gallego J, Collado PS. Melatonin reduces cardiac inflammatory injury induced by acute exercise. *Journal of pineal research*. 2009;47(2):184-91.
- 22-Kumar KV, Naidu M. Effect of oral melatonin on exercise-induced oxidant stress in healthy subjects. *Indian Journal of Pharmacology*. 2002;34(4):256-9.
- 23-Ekeløf SV, Halladin NL, Jensen SE, Zaremba T, Aarøe J, Kjærgaard B, et al. Effects of intracoronary melatonin on ischemia–reperfusion injury in ST-elevation myocardial infarction. *Heart and vessels*. 2016;31(1):88-95.
- 24-Ozban M, Aydin C, Cevahir N, Yenisey C, Birsen O, Gumrukcu G, et al. The effect of melatonin on bacterial translocation following ischemia/reperfusion injury in a rat model of superior mesenteric artery occlusion. *BMC surgery*. 2015;15(1):18.

Evaluation of Melatonin on HSP60 and HSP70 Gene Expression Following High-Intensity Anaerobic Training after Ischemia-Reperfusion in Male Rats

Masoud Jokar^{1*}, Pejman Motamedi¹

1-Assistant Professor of Exercise Physiology.

1-Department Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Kharazmi University Tehran, Tehran, Iran.

**Corresponding author:*

Masoud Jokar; Department Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Kharazmi University Tehran, Tehran, Iran.

Tel: +989306037157

Email: masoudjokar20@gmail.com

Abstract

Background and Objective: The aim of the present study was to evaluate the effect of melatonin supplementation on HSP60 and HSP70 gene expression changes following high intensity anaerobic exercise in male rats after ischemia-reperfusion.

Materials and Methods: Twenty four male Wistar rats weighing approximately 200-250g were divided into 4 groups of 6 each: study groups including control, melatonin, anaerobic training, and anaerobic+melatonin training. The anaerobic exercise protocol was performed for one month, while the melatonin anaerobic training group underwent melatonin gavage during the exercise. At the end of one month, rats were injected with isoprenaline after two days of rest to induce ischemia-reperfusion. After two days the rats were killed, their left ventricle removed and the expression levels of HSP60 and HSP70 genes were measured by RNA extraction and Real Time technique.

Results: Results showed that melatonin consumption decreased HSP60 and increased HSP70 apoptotic gene expression after anaerobic exercise ($P < 0.05$).

Conclusion: The results of this study showed that intake of melatonin concurrent with intensive anaerobic exercise reduce the volume of myocardial apoptosis after ischemia-reperfusion-induced ischemia-reperfusion.

Keywords: Melatonin, HSP70, HSP60, Anaerobic Training, Ischemia-Reperfusion.

► Please cite this paper as:

Jokar M, Motamedi P. Evaluation of Melatonin on HSP60 and HSP70 Gene Expression Following High-Intensity Anaerobic Training after Ischemia-Reperfusion in Male Rat. *Jundishapur Sci Med J* 2020; 18(5):471-484

Received: Oct 12, 2019

Revised: Dec 10, 2019

Accepted: Dec 22, 2019