The effect of eight weeks of resistance training in combination with nanoliposome BCAA supplement on the expression of HSP60 and HSP70 genes in mitochondrial cardiomyocytes of heart attack model rats

Makan Khajevandy[1], Elham Farhadfar[2* 1]

[1] Department of Physical Education and sport Science, Center Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[2] Department of Physical Education and sport Science, Dezful Branch, Islamic Azad University, Dezful, Iran

Received: 06 June 2024; Accepted: 13 July 2024, Published: 20 December 2024

Abstract

Purpose: The purpose of this study was to investigate the effect of eight weeks of resistance training in combination with nanoliposome BCAA supplement on the expression of HSP60 and HSP70 genes in mitochondrial cardiomyocytes of heart attack model rats**.**

Method: 32 male Wistar rats with heart attack model were randomly divided into 4 groups: control, supplemented (BCAA nanoliposome), combined (resistance training + BCAA nanoliposome supplement) and training (resistance training). Resistance training consisted of eight weeks of ladder training with moderate intensity (70% of MVCC) and five days a week. In the supplement and combined groups, 5 days a week and for 8 weeks, BCAA nanoliposome supplement was received by gavage in the amount of 600 mg per kilogram of body weight. The relative expression of mitochondrial HSP60 and HSP70 genes was obtained using Real-time PCR method. The data were analyzed using two-way analysis of variance and Tukey's post hoc test**.**

Findings: The results of the two-way analysis of variance test showed that the average expression of HSP60 and HSP70 genes in cardiomyocytes in the trained groups with and without BCAA consumption (exercise + supplement and exercise) was significantly higher than the untrained groups with and without consumption. BCAA (supplement and control**.**

Conclusion: The results of this research clearly shown the importance of HSP60 and HSP70 in the proliferation and differentiation of muscle cells along with regeneration from damage caused by heart infarction**.**

Keywords: resistance training, BCAA nanoliposome supplement, HSP60 and HSP70 and heart attack model rats.

[1] . **Corresponding author**
Elham Farhadfar
Address: Department of Physical Education & sport Science, Dezful Branch, Islamic Azad University, Dezful, Iran
Tel: 09122579849
Email: elhamfarhadfar1@gmail.com

تاثیر هشت هفته تمرین مقاومتی در ترکیب با مکمل BCAA نانولیپوزوم بر بیان ژن‌های HSP60 و HSP70 میتوکندری کاردیومیوسیت‌های رتهای مدل سکته قلبی

خواجه وندی ماکان [۱] ، فرهادفر الهام[۱*] [۲]

[۱] گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۲] گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد دزفول، دانشگاه آزاد اسلامی، دزفول، ایران

تاریخ دریافت: ۳/۱۷ /۱۴۰۳ ، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۴/۲۳، تاریخ چاپ: ۳۰/ ۹/ ۱۴۰۳

چکیده

هدف: هدف از پژوهش حاضر بررسی تاثیر هشت هفته تمرین مقاومتی در ترکیب با مکمل BCAA نانولیپوزوم بر بیان ژنهای HSP60 و HSP70 میتوکندری کاردیومیوسیتهای رت های مدل سکته قلبی بود.

روش بررسی: ۳۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار مدل سکته قلبی به صورت تصادفی به ۴ گروه کنترل، مکمل (BCAA نانولیپوزوم)، توام (تمرین مقاومتی+ مکمل BCAA نانولیپوزوم) و تمرین (تمرین مقاومتی) تقسیم شدند. تمرین مقاومتی شامل هشت هفته تمرین نردبان با شدت متوسط (۷۰ درصد از MVCC) و پنج روز در هفته،گروه‌های مکمل و توام ۵ روز در هفته و به مدت ۸ هفته، مکمل BCAA نانولیپوزوم و به میزان ۶۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت گاواژ دریافت شد. جهت ایجاد آنفارکتوس تجربی میوکارد از تزریق درون صفاقی ایزوپروترنول به میزان ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن به صورت محلول در نرمال سالین (به ازای هر یک میلی گرم داروی ایزوپروترنول، یک میلی لیتر نرمال سالین) در دو روز متوالی و با فاصله ۲۴ ساعت استفاده شد. برای اطمینان از القای آنفارکتوس میوکارد تجربی، از اندازه‌گیری تروپونین I قلبی (cTnI) استفاده شد. پس از القای آنفارکتوس میوکارد و اطمینان از آن، موش‌های صحرایی واجد شرایط وارد تحقیق شدند. بیان نسبی ژن‌های HSP60 و HSP70 میتوکندری با استفاده از روش Real-time PCR به دست آمد. داده ها با استفاده از آزمون آنووای دوطرفه و آزمون تعقیبی توکی و به وسیله نرم افزار(SPSS) نسخه ۲۳ در سطح معنی داری $p\leq ۰/۰۵$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند .

یافته ها: نتایج آزمون تحلیل واریانس دو طرفه نشان داد که میانگین بیان ژن‌های HSP60 و HSP70 کاردیومیوسیت‌ها در گروه‌های تمرین کرده با و بدون مصرف BCAA (تمرین+ مکمل و تمرین) به طور معنی‌داری بیشتر از گروه‌های تمرین نکرده با و بدون مصرف BCAA (مکمل و کنترل) است.

نتیجه گیری: هر ۲ مداخله با اثرات نسبتا مفیدی بر افزایش HSP60 و HSP70 درگیر در آپوپتوز کاردیومیوسیت ها به دنبال القای سکته قلبی حاد ناشی از تزریق درون صفاقی ایزوپرترنول (بازتاب دهنده شرایط آسیب قلبی مدل ایسکمی-تزریق مجدد) همراه هستند و تمرین مقاومتی و مکمل BCAA تا اندازه ای احتمالا می‌تواند آپوپتوز را کمتر کند. این نتایج اثر مثبت مقاومتی و مکمل BCAA در حفظ حیات سلول و تعدیل آپوپتوز و ضرورت گنجاندن آن در برنامه‌های ورزشی را نشان می‌دهد.

واژگان کلیدی: تمرین مقاومتی، مکمل BCAA نانولیپوزوم، HSP60 و HSP70 و رت های مدل سکته قلبی.

[۱]. **نویسنده مسوول**

الهام فرهادفر

نشانی: گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد دزفول، دانشگاه آزاد اسلامی، دزفول، ایران

تلفن: ۰۹۱۲۲۵۷۹۸۴۹

ایمیل: elhamfarhadfar1@gmail.com

مقدمه

بیماری‌های قلبی عروقی علت اصلی مرگ ومیر در کشورهای توسعه یافته می‌باشد. انفارکتوس میوکارد، با انهدام و مرگ سلولی غیر قابل برگشت بخشی از عضله قلب که به علت از بین رفتن جریان و وقوع ایسکیمی شدید در آن قسمت از قلب و در نتیجه انسداد عروق تغذیه کننده قلب روی می دهد، همراه است (۱). به طور کلی، عملکرد ناقص میتوکندری موجب استرس انرژی و در نتیجه افزایش کلسیم سلولی، افزایش تولید گونه های واکنش پذیر اکسیژن و همچنین فعال شدن مسیرهای آپوپتوزی می‌شود (۴). سکته قلبی یک بیماری کشنده متداول است که در آن بخشی از میوکارد به دلیل تدارک اکسیژن ناکافی در مدت کوتاه و به دنبال آن تزریق مجدد دچار آسیب دیدگی غیرقابل جبرانی می‌شود. در واقع، سکته قلبی یک آسیب ایسکمیک ناشی از انسداد شریان کرونری است که به تدارک اکسیژن ناکافی به عضله قلب و تخریب قابلیت انقباضی آن و بروز آریتمی منجر می‌شود. در شرایط آسیب ناشی از ایسکمی و تزریق مجدد، میتوکندری‌ها به شدت تحت تاثیر قرار می‌گیرند. رادیکال‌های آزاد سبب بروز آسیب اکسایشی به پروتئین ها، چربی‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شوند. آسیب بافتی و یا مرگ ابتدا توسط ایسکمی ناشی از اختلال در جریان خون و سرانجام اختلال در سطوح اکسیژن روی می‌دهد. در ادامه تزریق مجدد سبب احیای سطوح اکسیژن می‌شود، اما تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن روی می‌دهد. بنابراین تزریق مجدد سبب آسیب بافت میوکارد می‌شود. این آسیب ممکن است به باز شدن منافذ انتقالی غشای میتوکندری مربوط باشد که به عدم توازن در هموستاز یونی و در نهایت مرگ سلولی نکروزی می‌انجامد (۵). فرایند آپوپتوز[1] (مرگ برنامه ریزی شده سلول) در فرایندهای مهم زیست شناختی مانند تکامل طبیعی، ترمیم، نوسازی و هومئوستاز بافتی، حذف سلول‌های تخریب شده یا آلوده به ویروس و حذف سلول‌های ایمنی فعال شده علیه آنتی ژن‌های خودی نقش بسیار حیاتی را بر عهده دارد(۱). هرگونه اختلال در روند آپوپتوز، منجر به بیماری می شود که می تواند منجر به ایجاد و رشد سلول های سرطانی و یا اختلالات خود ایمنی گردد(۳). همچنین نشان داده شده است که اختلال عملکرد اندوتلیال نشان‌هنده یک رویداد مرکزی در پاتوژنز بیماری‌های قلبی عروقی است. عوامل خطرزایی چون پیری، افزایش کلسترول، هایپرگلیسیمیا، سیگار، عفونت و هایپوکسی می‌توانند پتانسیل غشای میتوکندری را تغییر دهند که نهایتاً منجربه تولید ROS میتوکندریایی مازاد می‌شود. بیمارهای متابولیکی نیز با فراهمی مواد مغذی و کاهش تقاضای ATP منجربه هایپرپلاریزاسیون غشا شده که با تولید بیش‌از حد ROS همراه است. هرگونه تعدیل در اجزای میتوکندری می‌تواند بر mtDNA، پروتئین‌ها و لیپیدها تاثیر گذاشته و به نوبه خود منجر به تحریک تولید ROS و ایجاد یک چرخه معیوب شود که نتیجتاً با پیشرفت بیماری‌های عروقی همراه است(۲۲). در این میان یکی از مشخص‌ترین پاسخ‌های سلولی به استرس، تولید پروتئین‌های شوک گرمایی حرارتی هستند[2] (HSP). هدف از تولید این پروتئین‌ها برگرداندن هومئوستاز، ترمیم و حفاظت از سلول در برابر آسیب‌های بیشتر است(۸). هر کدام از پروتئین‌های شوک گرمایی با گروه خاصی از مولکول‌ها واکنش نشان می‌دهند (۹). خانواده HSP 70 با زنجیره‌های سنگین ایمنوگلوبین و کمپلکس‌های در حال همانند سازی DNA ترکیب و در نگهداری ساختمان و یا در تجزیه آنها بعد از استفاده شرکت می کنند (۱۰). HSP 60 در میتوکندری به تسهیل تاشدگی پروتئین کمک می‌کند و به دلیل نقش اساسی در پشتیبانی از عملکرد میتوکندری به عنوان یکی از مهمترین پروتئین‌ها برای بقای سلول به شمار می‌رود. (۱۱). از آنجایی که HSP 60 می‌تواند بر آپوپتوز قلبی تأثیر بگذارد، تصور می‌شود این چاپرون در پاتوژنز نارسایی قلبی مشارکت می‌کند. این وضعیت اساساً حالت التهاب مزمن و آسیب پیشرونده کشنده عضله قلب است که منجر به مرگ سلول و در نتیجه کاهش عملکرد پمپاژ قلب می‌شود(۱۴). فعال‌سازی آپوپتوز از طریق کاهش بیان پروتئین‌های شوک

[1] . Apoptosis
[2] . Heat shock protein

گرمایی HSP60 و HSP70 اتفاق می افتد که از مشخص‌ترین پاسخ‌های سلولی به استرس ناشی از تحلیل عضلانی هستند (۱۱). کاهش HSP60 در کاردیومیوسیتها (CMC) منجر به تجزیه کمپلکس های بین چاپرونی، Bak و Bax می‌شود که به نوبه خود باعث آپوپتوز می‌شود و با انتشار و رها سازی سیتوکروم C ، فعال سازی کاسپاز ۳ و قطعه قطعه شدن DNA اتفاق می‌افتد (۷۶). همچنین، هیپوکسی موجب تجزیه کمپلکس HSP60-Bax در کاردیومیوسیت‌های موش می‌شود که با انتقال cHSP60 به غشای پلاسما و Bax به میتوکندری همراه است، که این عوامل به نوبه خود باعث شروع آپوپتوز می‌شوند. از این رو، به نظر می‌رسد توزیع مجدد cHSP60 به غشا پلاسما در طول هیپوکسی، به آغاز آبشار آپوپتوتیک کمک می‌کند. حضورHSP60 در غشای پلاسما فی‌نفسه مکانیسم بیماری زایی نارسایی قلب (HF) به شمار می‌رود (۷۸). از آنجایی که HSP60 می‌تواند بر آپوپتوز قلبی تأثیر بگذارد، تصور می‌شود این چاپرون در پاتوژنز نارسایی قلبی (HF) شرکت می‌کند. از جمله عواملی که باعث HF می‌شوند، کاردیومیوپاتی گشاد شده و سکته قلبی است. در این شرایط ، سطح پروتئین HSP60 و mRNA ۲-۵ برابر افزایش می‌یابد (۶۷). در حال حاضر، فعالیت ورزشی به عنوان اصلی ترین ابزار موثر برای مقابله با بیماریهای قلبی به رسمیت شناخته شده است (۵). به نظر می‌رسد فعالیت بدنی و به‌طور ویژه تمرین مقاومتی می‌تواند از کاهش توده عضلانی جلوگیری کند و حتی روند آن را معکوس سازد (۳۰). اثرات تمرینات هوازی روی مرگ برنامه ریزی شده سلولی عضله اسکلتی بررسی شده است. ۸ هفته تمرین تردمیل باعث افزایش نسبت Bcl2/Bax و افزایش بیان Hsp70 می شود که نشلن داده شده به عنوان یک پروتئین ضد مرگ برنامه ریزی سلولس بوسیله بازدارندگی تشکیل آپوپتوزوم نقش دارد. اما اطلاعات کمی در مورد سازوکارهای درگیر در کاهش آسیب های سلولی و یا ترمیم پس از آن وجود دارد، با این حال شواهد موجود از این ادعا که HSP در فرآیندهای پس از ورزش مقاومتی درگیر هستند، حمایت می کند(۲۸). گزارش شده که استفاده از یک پروتکل ورزشی که منجر به آسیب معنی دار تارچه های عضلانی می شود مانند ورزش برون گرا با نیروی بالا، ممکن است پاسخ HSP مشخص تری را نسبت به پاسخ گزارش شده بعد از فعالیت روی نوارگردان، القاء کند (۲۲). افزون بر آن، مداخلات درمانی نوآورانه در سال‌های اخیر برای درمان سکته های قلبی بررسی شده است که یکی از آن‌ها، مداخلات تغذیه‌ای است و برای کاهش اثرات آپوپتوز نقش تمرینات ورزشی در تعامل با مکمل دهی مورد بررسی قرار گرفته است(۱۴).اسیدهای آمینه شاخه دار شامل لوسین، ایزولوسین و والین می باشند که جزء اسید های آمینه ضروری طبقه بندی می شود .بدن قادر به سنتز این اسیدهای آمینه نمی باشد و باید در رژیم غذایی گنجانده شوند .اواسط دهه هفتاد عنوان شد که اسیدهای آمینه شاخه دار، خصوصاً لوسین، در محیط آزمایشگاهی باعث سنتز پروتئین می شود و از تجزیه پروتئین ممانعت می کند .این یافته ها و یافته های مشابه دیگر منجر به استفاده گسترده از اسیدهای آمینه شاخه دار به عنوان مکمل غذایی در بهبود شرایط آنابولیکی در میان ورزشکاران قدرتی شد (۱۲). اسید های آمینه به عنوان یک تغذیه مستقیم در سیستم ایمنی مورد نیازمی باشند .لوسین، ایزولوسین و والین در میان اسیدهای آمینه دیگر، در سلول های جانوری و به صورت ویژه در لنفوسیت ها موردنیاز هستند. حذف تنها یک BCAA از محیط کشت لنفوسیتها منجر به توقف کامل سنتز پروتئین می شود که این بازتاب واقعی نیازمندی به BCAA در سیستم ایمنی می باشد (۱۵). پروتئین های شوک گرمایی نیز تحت تاثیر ورزش قرار می گیرند. در واقع سطح HSP70 پس از فعالیت جسمانی حاد و مزمن در اندامهای مختلف جوندگان(۶،۷،۸) و نیز گردش خون آنها و انسانها(۱۱) افزایش می یابد. HSP70 گردش خون به عنوانHSP70 خارج سلولی (ehsp) شناخته شده و افزایش آن طی فعالیت ورزشی بوسیله رهایش از ارگانهای دیگر ایجاد می گردد (۱۲). با این تفاسیر افزایشHSP70 بافتی و پلاسمایی ناشی از فعالیت ورزشی ممکن است مکانیزم مهمی باشد که بوسیله آن فعالیت ورزشی می تواند از سلولها، بافتها و ارگانها در برابر گستره

ای از فشازاها و ناراحتیها محافظت نماید (۳) و فاکتور اصلی تحریک تولید HSP70 افزایش دمای سلول است (۱۴). در واقع تولیدHSP70 در بسیاری ارگانها هنگامی شتاب می گیرد که فعالیت ورزشی و تمرین با افزایش دمای بدن ترکیب شده باشد(۱۶). در سلولهای پستانداران این مولکولها توسط انواع متنوعی از عوامل فیزیکی و شیمیائی و همچنین ایسکمی بوجود می آیند. در پاسخ به بعضی محرکهای پاتولوژیک، سلولها یک سری تغییرات متابولیک، تحت عنوان پاسخ استرس سلول، از خود نشان می دهند که یک مکانیسم سلولی اساسی و مهم بوده و سلولها را قادر می سازد تا در مقابل آسیب های محیطی زنده بمانند. سلولهایی که تحت استرس قرار گرفته اند ژنهائی را که مسئول کد کردن پروتئین های ساختمانی نرمال هستند خاموش می کنند و بیان ژنهایی که مسئول کد کردن پروتئین هایی هستند که دارای عملکرد های سازمان دهی سلولی و حفاظت سلولی می باشند را در سطح بالائی نشان می دهند. بسیاری از پروتئین های استرس سلول ابتدا در پاسخ به شوک حرارتی تجربی توصیف شدند، لذا گروه عمده و اصلی تحت عنوان پروتئین های شوک حرارتی نام گذاری شده اند. واژه های عمومی "پروتئین شوک حرارتی " و "پروتئین استرس سلول " مترادف هستند(۱۱). وقتی بروسلاها در معرض افزایش درجه حرارت قرار می گیرند پروتئین های شوک حرارتی سنتز می کنند. پروتئین‌های HSPبه عنوان چاپرون‌های مولکولی در فرایندهای متعددی همچون فولدینگ پروتئین‌ها، تجمع و انتقال آنها، عبور و مرور پپتیدها و پردازش آنتی ژن تحت شرایط فیزیولوژیک و استرسی نقش دارند. بیان پروتئین‌های HSP بواسطه چندین نوع از عوامل استرس زا همچون تب، الکل، التهاب، استرس‌های اکسیداتیو، فلزات سنگین و همچنین شرایطی که موجب جراحت و نکروزیس می‌گردد القاء می‌گردند. پروتئین های شوک حرارتی دارای وظایف متعددی در بدن هستند که از جمله وظایف آنها می توان شرکت در پیچ خوردگی و خمیدگی، بازکردن خمیدگی پروتئین ها و کمک به سلولها برای پاسخ به استرس ذکر کرد. تحقیقات اخیر نشان می دهد که با افزایش میزان HSP در فیبرهای عضلانی بیماران مبتلا به دیستروفی عضلانی دوشن می توان آنها را تا حد زیادی درمان کرد(۲۲).

توجه به اینکه پروتئین های شوک گرمایی سنتز و بیان پروتئین را افزایش می دهند (مخصوصاً پروتئین‌هایی که نقش سازماندهی و حفاظتی دارند)، این بیان (سنتز پروتئین) نیازمند وجود اسید آمینه به عنوان سوبسترا در محیط خواهد بود. درصد حضور اسید آمینه‌ها نشانگر میزان بیان خواهد بود. در بین حدود ۲۰ نوع اسید آمینه توجه به نقش‌های شناخته شده BCAA مطابق مطالعات متعدد می‌تواند تاکید مجددی بر افزایش بیان پروتئین‌های و مخصوصاً پروتئین شوک گرمایی باشد. عضلات اسکلتی از اسیدهای آمینه شاخه‌دار حین ورزش به عنوان منبع انرژی استفاده می‌کند (۱۸). نتایج مطالعات نشان می‌دهدBCAA موجب افزایش توده عضلانی و هورمون‌های آنابولیک حین ورزش می‌شود (۲۶). در این بین تکنولوژی نانولیپوزوم روش جدیدی برای تسهیل ارائه مناسب‌تر دارو به بافت‌های مورد نیاز بدن است(۹). در پژوهش‌های صورت‌گرفته گزارش شده است که BCAA لیپوزومال در طول فعالیت بدنی، با کاهش رهایش مارکرهای آسیب عضلانی موجب کاهش خستگی مرکزی می‌شود (۲۹).

شواهد موجود حاکی از آن هستند که BCAA با جلوگیری از هایپرتروفی قلبی ناشی از نورآدرنالین، یا آنژوتنسین II و یا جبران آسیب های ناشی از ایسکمی تزریق مجدد و همچنین از طریق مهار فعالیت هیستون استیل ترانسفراز p300 از نارسایی قلبی جلوگیری می‌کند. همچنین BCAA به واسطه تاثیر بر مسیرهای NF-Kb و همچنین افزایش اتوفاژی، بازداری از استرس اکسایشی کاردیومیوسیت ها و میتوکندری‌ها،تاثیر بر مسیرهای نسخه برداری، فسفوریلاسیون JNK ، کاهش ناقل‌های فسفات و افزایش بیان هم اکسیژناز از مرگ کاردیومیوسیت‌ها نیز جلوگیری می‌کند. علاوه بر این در شرایط شبیه سازی شده سکته قلبی و ایسکمی تزریق مجدد، BCAA از طریق افزایش بیان پروتئین های شوک گرمایی همراه با بهبود ظرفیت ضد اکسایشی سبب بهبود عملکرد بطنی می‌شود (۲۵).

موریواکی[1] و همکاران (۲۵) نیز نشان دادند دریافت BCAA منجر به افزایش بیوژنز میتوکندریایی بافت عضله می‌شود. پیترسون و همکاران (۱۴) در مطالعه ای بر آپوپتوز عضله‌ی اسکلتی بین کردند که تمرین استقامتی به طور غیر معنی‌داری موجب افزایش سطوح پروتئین Bcl2 عضله‌ی چهارسر موش‌های مسن شد. مورر و همکاران (۲۲) گزارش دادند که چهار هفته تمرین هوازی با شدت متوسط میزان PGC-1α را افزایش داده و مسیر اتوفاژی میتوکندریایی را با تبدیل LC3-I به LC3-II و سایر فاکتورهای درگیر بهبود بخشیده است. امین و همکاران (۹) نشان دادند که تمرین تناوبی با شدت متوسط (MIIT) منجر به بهبود پروتئین‌های همجوشی و شکافت میتوکندری در رت‌های مبتلا به انفارکتوس میوکارد می‌شود. سانگ[2] و همکاران (۱۷) بیان کردند که ۱۲ هفته تمرین مقاومتی با شدت متوسط موجب افزایش معنی‌دار بیان HSP60 و کاهش قطعه قطعه شدن DNA در عضله اسکلتی موش‌های صحرایی سالخورده می‌شود . لی[3] و همکاران (۲۳) گزارش کردند که تمرین هوازی بر بیان پروتئین‌های Bcl-2 وHSP70 در گروه تمرین بیشتر از گروه کنترل بود (غیرمعنی‌دار). با توجه به نقش حساس و کلیدی میوکارد در سلامتی و عملکردجسمانی، این موضوع یکی از نگرانی‌ها و چالش‌های جدی است. علاوه بر این با توجه به اثر مثبت فعالیت بدنی به نظر می آید درک فرایندهای سلولی و مولکولی متأثر از ورزش بتواند به استفاده از فعالیت تمرین مقاومتی و مکمل BCAA به عنوان یک درمان هدفمند و بدون عوارض در آینده منجر شود. لذا هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر هشت هفته تمرین مقاومتی در ترکیب با مکملBCAA نانولیپوزوم بر بیان ژنهای HSP60 وHDP70 میتوکندری کاردیومیوسیت‌های رتهای مدل سکته قلبی بود.

روش شناسی

برای مطالعه‌ی حاضر، ۳۲ سر موش صحرایی[3] نر دو ماهه از سویه[4]ویستار از انستیتو پاستور ایران خریداری شد و در هر قفس دو سر موش صحرایی نگهداری می شد. پس از سازگاری دو هفته ای آزمودنی‌ها به محیط جدید و آشنایی با پروتکل تمرین به صورت تصادفی به ۴ گروه کنترل، مکمل (BCAA نانولیپوزوم)، توام (تمرین مقاومتی+ مکملBCAA نانولیپوزوم) و تمرین مقاومتی (۸ =n) تقسیم شدند و پس از گروه بندی، سکته قلبی به رتها القا شد. در مراحل مختلف پژوهش، ضمن رعایت مسائل اخلاقی، مطابق دستورالعمل کمیته‌ی اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی مستخرج از دستورالعمل هلسینکی از هرگونه آزار جسمی و روش‌های غیرضروری کار با حیوانات اجتناب گردید. جهت جلوگیری از استرس و تغییر شرایط فیزیولوژیکی، حیوانات مورد مطالعه به مدت دو هفته تحت شرایط استاندارد جدید با دمای (۲±۲۲سانتی‌گراد)، رطوبت نسبی (۵±۵۰درصد) و چرخه‌ی تاریکی به روشنایی ۱۲:۱۲ ساعته درحیوانخانه‌ی دانشکده‌ی تربیت بدنی و علوم ورزشی نگهداری شدند. در طی این دوره، تمامی آزمودنی‌های به صورت آزادانه از غذای استاندارد و آب استفاده می‌کردند و میزان غذای مصرفی روزانه آنها به صورت دقیق اندازه گیری و ثبت می‌شد.

پروتکل تمرین: پس از اطمینان از القای آنفارکتوس میوکارد، موش صحرایی جهت آشنایی با نحوه فعالیت مقاومتی در برنامه آشنایی شرکت داده شدند. رت‌ها در هر دو گروه تجربی به‌منظور آشناسازی با نحوۀ اجرای پروتکل تمرینی، پنج روز بدون وزنه تمرین، بالا رفتن از نردبان را انجام دادند. پس از آخرین جلسۀ سازگاری، از حیوانات آزمون حداکثر ظرفیت حمل ارادی[5] (MVCC) گرفته شد

1. Moriwaki
2. Song
3. Lee
3 . Rat
4 . Strain
5 . Maximum Voluntary Carrying Capacity

که به‌عنوان بیشترین بار حمل‌شدهٔ موفقیت‌آمیز تعریف شد (۲۲). سپس هر دو گروه تمرین مقاومتی به‌مدت پنج جلسه در هفته و به‌مدت هشت هفته تمرین مقاومتی را انجام دادند. با توجه به سازگاری حیوانات با تمرین در انتهای هر چهار هفته، از حیوانات آزمون حداکثر ظرفیت حمل ارادی گرفته شد و شدت تمرین حیوانات براساس آزمون جدید تعیین شد (۷). پروتکل تمرین مقاومتی شامل بالارفتن از یک نردبان تمرینی مخصوص (طول ۱۱۰ سانتیمتر، شیب ۸۰ درجه، ۲۶ پله و دو سانتیمتر ارتفاع بین هر پله) بود. گروه‌های تمرینی هشت هفته تمرین مقاومتی نردبان را در ۸۰ درصد از MVCC ، نُه تا ده بار بالارفتن در هر جلسه و پنج روز در هفته انجام دادند. برای تعیین حداکثر ظرفیت حمل ارادی، وزنه ای با ۷۵ درصد وزن بدن حیوان به دم آنها متصل و حیوان شروع به بالارفتن از نردبان با حمل این بار کرد. سپس، به‌ازای هر تکرار موفق ۳۰ گرم به بار تمرینی تکرارشدهٔ قبلی اضافه شد. در بالای نردبان دو دقیقه استراحت بین هر صعود وجود داشت. این روش تا زمانی تکرار شد که موش به صعود کل طول نردبان در سه تلاش متوالی موفق شد (۲۲).

مکمل BCAA نانولیپوزوم: موش‌های صحرایی در گروه مکمل و گروه مکمل + تمرین مقاومتی، در زمان های مشابه با تمرین (۵ روز در هفته به مدت ۸ هفته)، مکمل BCAA نانولیپوزوم ساخت شرکت داروسازی کارن دریافت نمودند. این مکمل همزمان با تمرین به میزان (600 mg/kg body weight/day, consist of 46% leucine, 28% valine, and 23% isoleucine) به گروه تمرین + مکمل و در همین زمان به گروه مکمل گاواژ شد (۱۳ و ۱۴). فناوری نانولیپوزومال روش جدیدی برای ارائه کارآمدتر و نتیجه بخش تر دارو به بدن است. لیپوزوم یک وزیکول کروی است که حداقل یک لایه لیپیدی دارد. لیپوزومها مدت بیشتری در خون گردش می کنند و در انتقال درون سلولی ترکیبات کپسوله شده کارآمد هستند(۲).

نحوه ایجاد آنفارکتوس: جهت ایجاد آنفارکتوس تجربی میوکارد از تزریق درون صفاقی ایزوپروترنول به میزان ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن به صورت محلول در نرمال سالین (به ازای هر یک میلی گرم داروی ایزوپروترنول، یک میلی لیتر نرمال سالین) در دو روز متوالی و با فاصله ۲۴ ساعت استفاده شد. برای اطمینان از القای آنفارکتوس میوکارد تجربی، از اندازه‌گیری تروپونین اقلبی (cTnI) که شاخصی طلایی برای آسیب قلبی محسوب می‌شود استفاده شد. برای سنجش این عامل از کیت تروپونین I استفاده شد که با ریختن مستقیم نمونه خونی با قطره چکان روی نوار اندازه‌گیری و مثبت شدن جواب، از القای آنفارکتوس میوکارد تجربی اطمینان حاصل گردید و موش‌های صحرایی واجد شرایط وارد تحقیق شدند. پس از اطمینان از القای آنفارکتوس میوکارد، ۶ سر از موش‌های صحرایی جهت کنترل پارامترهای پایه و لحاظ شدن به عنوان گروه مرجع در روش RT-PCR از بقیه جدا شده و مابقی ۲۶ سر موش صحرایی جهت آشنایی با نحوه فعالیت روی نوارگردان الکترونیکی هوشمند حیوانی در برنامه آشنایی شرکت داده شدند. که در این تحقیق یک سر رت تلف شد.

جراحی حیوانات آزمایشگاهی و استخراج نمونه: همه آزمودنی ها طبق برنامه از پیش تعیین شده و با استفاده از شیوه مناسب، بیهوش، کشته و جراحی شدند. تمامی موش‌های صحرایی، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه‌ی تمرین، توسط تزریق درون صفاقی کتامین (۹۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) بیهوش و پس از آن بخش اعظم خون (حدود ۵-۴ سی سی) آن‌ها از قسمت سینوس چشمی و بوسیله لوله‌های موئینه‌ی هپارینه جمع‌آوری شد. برای تعیین مقادیر شاخص‌های مربوط به CBC، خون جمع‌آوری شده به لوله‌های دارای مواد ضدانعقادی انتقال و جهت جداسازی سرم و سایر موارد به آزمایشگاه مربوطه منتقل شد.

ساخت cDNA: طبق دستورالعمل کیت (Fermentas, Canada) یک میکرولیتر RNA و یک میکرولیتر از DNase I reaction buffer 10X در یک تیوب ۱/۵ میلی لیتری ریخته شد و توسط DEPC-traeted water به حجم ۹ میکرولیتر رسید.

برای از بین بردن آلودگی احتمالی با DNA، یک میکرولیتر DNase به تیوب اضافه و پس از افزودن یک میلی‌لیتر از اتانول مطلق، تیوب مربوطه به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر ۷۰ درجه قرار گرفت. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط ۴ درجه و ۱۴۰۰۰ برابر شتاب جاذبه سانتریفیوژ شد و پس از آن، در زیر هود به‌دقت اتانول آن خالی شد و حدود ۱۰ دقیقه اجازه داده شد تا الکل تبخیر شود. به تیوب یک میکرولیتر DEPC-treated water و یک میکرولیتر پرایمر "dt" oligi یا پرایمر Random hexamer 5x افزوده شد و ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه روی Dry block انکوبه شد. چهار میکرولیتر reaction buffer 5X و دو میکرولیتر dNTP mix 10mM و یک میکرولیتر Ribo lock Ribo nuclease Transcription Inhibitor به تیوب افزوده شد و پس از سانتریفیوژ مختصر، به مدت پنج دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه شد. یک میکرولیتر آنزیم .Rverert AidTM H Minus M-MuLV Reverse به تیوب قبل افزوده شد. در ادامه در صورت استفاده از پرایمر oligo (dt)، 6 دقیقه در ۴۲ درجه و در صورت استفاده از پرایمر Random hexamer، ابتدا 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 با دمای منهای ۷۰ درجه نگهداری شد.

Real-time PCR: برای اندازه‌گیری میزان بیان ژنی پروتئین‌های موردنظر، از دستگاه " Rotor gene- 6000 Corbett" USA استفاده شد. جفت پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از نرم‌افزار Primer 3 طراحی و توسط بایونیر (Bioneer, Germany) سنتز شد و برای کار با غلظت نهایی ۱۰۰ نانو متر مورد استفاده قرار خواهندگرفت.

پرایمرها: واکنش‌ها بر مبنای استفاده از رنگ Syber green انجام شد. رنگ Syber green طی واکنش Real-time PC**r** به DNA دورشته‌ای متصل شده و نور فلورسنت ساطع می‌کند. 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 شد. پس از اتمام واکنش تکثیر، برای هر واکنش یک نمودار رسم و سپس بر این اساس CT تعیین شد. در پایان قبل از آنالیز داده‌ها، منحنی ذوب به‌دست‌آمده از هر واکنش Real-time PCR بررسی شد تا پیک مربوط به ژن موردنظر و فقدان پرایمر دایمر تأیید شود. برای آنالیز داده‌ها ابتدا ΔCt ژن در هر نمونه از افتراق Ct ژن مربوطه و Ct ژن β-actin بر اساس طرح پوزش جدیدی و همکاران (۱۴۰۱) به عنوان رفرنس محاسبه شد. فرمول‌ها برای محاسبه به ترتیب زیر است (فرمول شماره ۱ و ۲):

۱.ΔCT= CT target – CT reference

۲.ΔΔCT = ΔCT test sample – ΔCT control sample

توالی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش:

Gene	Forward/ Reverse	Primer(5 to3)	Tm	Product length	Accession Number
Hsp60	Forward	TATATGGCCCCAGCATGCGA	60.45	96	XM_007764288.2
	Reverse	AACGAGTGGGAGTCGACCTCA	61.21		
Hsp70	Forward	ATCCAAGACCACATGGGCTG	60.59	178	XM_018597844.1
	Reverse	AGCAGTCCAAGGCAGTGGGA	59.14		

روش آماری: ابتدا برخی از ویژگی‌های موش‌های صحرایی و داده‌های تحقیق با استفاده از آمار توصیفی به‌صورت شکل، جدول و نمودار خلاصه و جمع‌بندی شد و سپس فرضیه‌های تحقیق به کمک روش‌های استنباطی مورد بررسی قرار گرفتند. توزیع توأم و بهنجار توسط آزمون شاپیرو – ویلک مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس داده‌های حاصله توسط آزمون آنالیز واریانس دوطرفه برای تعیین

اختلاف میزان شاخص‌های مورد نظر بین گروه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفتند. تمامی محاسبات آماری در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ انجام شد.

یافته ها

میانگین شاخص‌های مربوط به بیوژنز میتوکندریایی کاردیومیوسیت‌های موش‌های صحرایی نر مدل سکته‌ی قلبی شامل میزان بیان ژن HSP60 و HSP70 متعاقب هشت هفته تمرین مقاومتی و مصرف مکمل BCAA در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول۱. شاخص‌های مربوط به بیوژنز میتوکندریایی کاردیو میوسیت‌های موش‌های صحرایی مورد مطالعه

شاخص	گروه	تعداد	میانگین	انحراف استاندارد
بیان ژن HSP60 (HSP60/actin)	کنترل	۸	۲/۵۱	۰/۵۲
	تمرین	۸	۵/۱۴	۰/۱۴
	مصرف مکمل (BCAA)	۸	۲/۵۷	۰/۱۲
	تمرین+ مصرف مکمل	۸	۵/۵۱	۰/۶۶
بیان ژن HSP70 (HSP70/actin)	کنترل	۸	۲/۶۵	۰/۲۵
	تمرین	۸	۵/۸۱	۰/۴۱
	مصرف مکمل (BCAA)	۸	۲/۷۴	۰/۱۰
	تمرین+ مصرف مکمل	۸	۵/۹۹	۰/۷۴

میزان بیان ژن‌های HSP60 و HSP70 در دو گروه تمرین مقاومتی با و بدون مکمل BCAA بیشتر از گروه کنترل و مکمل بود. همچنین، بیشترین میزان بیان این ژن‌ها در گروه تمرین+ مکمل مشاهده شد.

از آزمون شاپیرو- ویلک برای بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌ها در حالت پایه استفاده شد. با توجه به جدول ۲ اختلاف معنی‌داری بین نمونه‌ی در دسترس با جامعه‌ی مورد نظر مشاهده نشد؛ بنابراین داده‌های جمع‌آوری شده همگن بوده و منحنی مربوط به این نمونه طبیعی فرض می‌شود. بنابراین برای تجزیه و تحلیل داده‌ها می‌توانیم از آزمون‌های پارامتریک استفاده نماییم.

جدول ۲. آزمون شاپیرو- ویلک جهت بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌ها

	شاخص	آماره	P
کنترل	HSP60بیان ژن	۰/۸۵۴	۰/۷۴۵
	HSP70بیان ژن	۰/۸۷۴	۰/۸۴۲
تمرین	HSP60بیان ژن	۰/۹۳۹	۰/۶۴۹
	HSP70بیان ژن	۰/۸۵۹	۰/۶۹۵
مصرف مکمل	HSP60بیان ژن	۰/۸۵۲	۰/۲۳۳
	HSP70بیان ژن	۰/۹۱۸	۰/۳۲۹
تمرین+ مصرف مکمل	HSP60بیان ژن	۰/۹۲۱	۰/۵۴۷
	HSP70بیان ژن	۰/۹۶۵	۰/۳۶۹

نتایج مربوط به برخی از شاخص‌های فیزیکی موش‌های صحرایی گروه‌های کنترل، تمرین ، مکمل و تمرین+ مکمل در جدول ۳ ارائه شده است.

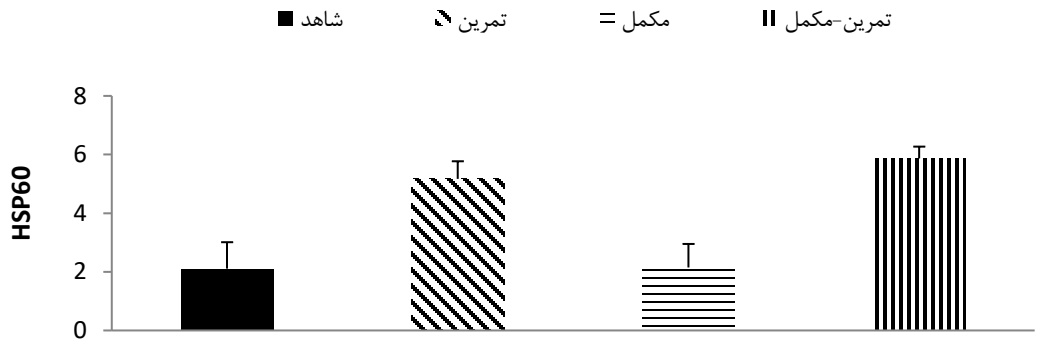
جدول ۳ برخی ویژگی‌های فیزیکی موش‌های صحرایی مورد مطالعه

شاخص‌های اندازه‌گیری‌شده	گروه	تعداد	میانگین	انحراف استاندارد
وزن بدن (گرم)	کنترل	۸	۳۴۵	۱۴/۷۲
	تمرین	۸	۳۲۴/۸۳	۱۷/۱۵
	مکمل (BCAA)	۸	۳۳۲/۷۵	۱۳/۰۵
	تمرین+ مکمل	۸	۳۱۹/۷۱	۱۹/۴۶
وزن قلب (گرم)	کنترل	۸	۰/۸۷	۰/۰۸
	تمرین	۸	۰/۹۱	۰/۰۸
	مکمل (BCAA)	۸	۰/۹۰	۰/۰۵
	تمرین+ مکمل	۸	۰/۸۷	۰/۰۹

نتایج آزمون تحلیل واریانس دو طرفه نشان داد که هر دو عامل تمرین مقاومتی و مصرف مکمل BCAA به تنهایی و در تعامل با هم بر میزان بیان ژن HSP60 کاردیومیوسیت موش‌های صحرایی تاثیر معنی‌داری دارد (P<۰/۰۰۱) . هر دو عامل تمرین و مصرف مکمل BCAA به تنهایی و در تعامل با هم بر میزان بیان ژن HSP70 در کاردیومیوسیت‌های موش‌های صحرایی تاثیر معنی‌داری دارد (P<۰/۰۰۱)(جدول ۴).

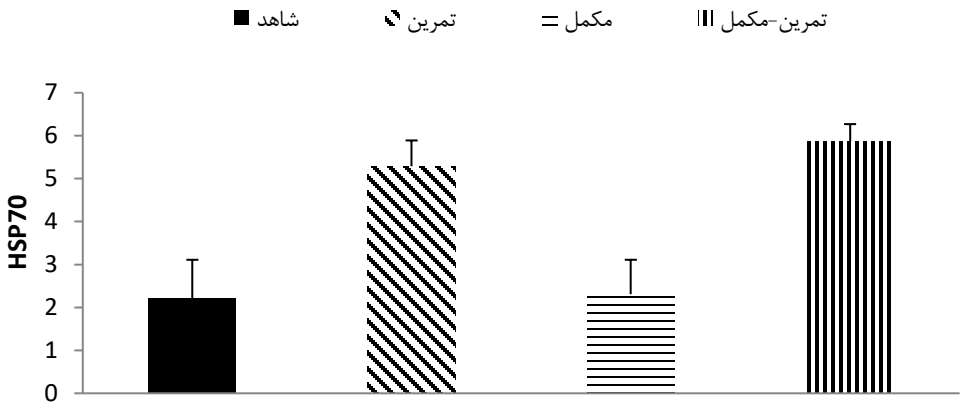
جدول ۴. تحلیل واریانس دو طرفه میزان بیان ژن HSP60 و HSP70 کاردیومیوسیت‌های موش‌های صحرایی

شاخص		جمع مجذورات	درجه آزادی	میانگین مجذورات	F	P	مجذور اتا
HSP60	تمرین مقاومتی	۵۵/۸	۱	۵۵/۸۷۰	۱۸۲۶/۲۷۰	۰/۰۰۲	۰/۹۸۹
	مصرف مکمل BCAA	۲۸/۸	۱	۲۸/۸۴۳	۹۴۲/۸۰۸	۰/۳۵۲	۰/۹۷۸
	تمرین مقاومتی× مصرف مکمل	۱/۳۶	۱	۱/۳۹۰	۴۵/۴۲۲	۰/۰۰۳	۰/۷۵۴
	خطا	۰/۶۴۲	۲۱	۰/۰۳۱			
	کل	۱۲۵/۰۸	۲۵				
HSP70	تمرین مقاومتی	۶۲/۵۰۹	۱	۶۲/۵۰۹	۷۰۶۴/۰۴۱	۰/۰۰۲	۰/۹۹۷
	مصرف مکمل BCAA	۳۰/۸۱۸	۱	۳۰/۸۱۸	۳۴۸۲/۶۶۹	۰/۳۲۵	۰/۹۸۱
	تمرین مقاومتی × مصرف مکمل	۰/۲۰۲	۱	۰/۲۰۲	۲۲/۸۴۹	۰/۰۰۱	۰/۸۹۵
	خطا	۰/۱۸۶	۲۱	۰/۰۰۹			
	کل	۱۴۳/۶۱۳	۲۵				



نمودار ۱: اثر تمرین مقاومتی و مکمل BCAA نانولیپوزوم بر بیان ژن HSP60

بین دو گروه تمرین و تمرین مکمل هم تفاوت معنی داری نشد (P<۰/۱۵۴). گروه مکمل و کنترل هم بدون تفاوت معنی دار بودند که نشاندهنده بی تاثیر بودن مصرف مکمل به تنهایی است (P<۰/۱۰۱).



نمودار ۲: اثر تمرین مقاومتی و مکمل BCAA نانولیپوزوم بر بیان ژن HSP70

بین دو گروه تمرین و تمرین مکمل هم تفاوت معنی داری نشد (P<۰/۱۵۴).

گروه مکمل و کنترل هم بدون تفاوت معنی دار بودند که نشاندهنده بی تاثیر بودن مصرف مکمل به تنهایی است (P<۰/۱۰۱).

بحث

بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر، هشت هفته تمرین مقاومتی فزاینده و مکمل BCAA نانولیپوزوم موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های HSP60 و HSP70 در گروه تمرین و گروه تمرین+مکمل شده است که این افزایش در گروه مکمل و کنترل مشاهده نشد. این نتایج با نتایج پژوهش سانگ[1] و همکاران (۱۷) و مورر[2] و همکاران (۲۱) همسو بود. در طی آسیب ایسکمی که در وضعیت متعاقب سارکوپنیا روی می‌دهد، تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد و افزایش HSP60 گردش خون، افزایش کلسیم درون سلولی، نشت H

[1] Song
[2] - Moriwaki

در سطوح میتوکندری و التهاب، به بازشدن منافذ نفوذپذیر میتوکندری منجر می‌شوند که این امر می‌تواند به کاهش ATP ، اکسیداسیون برگشت ناپذیر پروتئین، چربی و DNA منجر شود و فرایند آپوپتوز را شروع کند (۳۰). بدین ترتیب بیشتر پژوهشگران، افزایش HSP60 را عامل خطر و تشدیدکنندهٔ آسیب قلمداد کرده‌اند. این نتایج که هر دو عامل تمرین مقاومتی و مصرف مکمل BCAA به تنهایی و در تعامل با هم بر میزان بیان ژن HSP60 و HSP70 کاردیومیوسیت موش‌های صحرایی تاثیر معنی‌داری دارد (P<۰/۰۰۱) با نتایج پیترسون و همکاران (۱۴)، لی و همکاران (۲۳) و سیاهکویان و همکاران (۲۰) همخوانی دارد. اما در پژوهشی جدید، هم از فواید درمانی واکنش‌های پروتئین-پروتئینی بین انواع پروتئین‌های شوک گرمایی از جمله HSP60 در درمان سکتهٔ قلبی و هم از آسیب ناشی از ایسکمی-تزریق مجدد حمایت کرده‌اند، ولی چون در این زمینه قطعیت وجود ندارد و همچنین در پژوهش حاضر عملکرد و فراساختار عضله سولئوس بررسی نشده است، امکان تفسیر شفاف پیامد حاصل از افزایش بیان ژن HSP60 عضله موش‌ها به دنبال تمرین مقاومتی امکان‌پذیر نیست. این نتایج با نتایج پیکارد[1] و همکاران (۲۰۱۳) که پس از ۲۰ دقیقه ایسکمی و به دنبال ۳۰ دقیقه خونرسانی مجدد سطح mRNA HSP60 در قلب موش صحرایی بدون تغییر باقی ماند ناهمسوست. به نظر می‌رسد دلیل اصلی تناقض مطالعه حاضر با برخی دیگر از مطالعات، سن موش‌های صحرایی باشد و در این راستا، استرس اکسایشی، سایتوکین‌های التهابی و اختلال در محافظت از استرس سلول سازوکارهای احتمالی هستند که در افزایش آپوپتوز بافت‌های پیر مشارکت می‌کنند(۸). به عبارتی، افزایش سن و پیری با افزایش قابل توجه آپوپتوز همراه است که در این صورت احتمال تأثیر تمرینات ورزشی بر شاخص‌های آپوپتوزی بیشتر و بارزتر می‌شود (۱۸). همچنین، تفاوت در نوع بافت مورد مطالعه و زمان برداشت بافت نیز می تواند بر بیان و بروز متغیرهای درگیر موثر باشد.

HSP60 در سلولهای طبیعی و عمدتا در میتوکندری وجود دارد؛ اما در بخشهای خارج از میتوکندری، مانند سیتوزول و غشای سلولی نیز یافت می‌شود. HSP60 سیتوزولی (cHSP60) به دو شکل، یعنی، با یا بدون توالی سیگنال میتوکندری وجود دارد، نوعی "دم" که مولکول در سیتوزول ترجمه می‌کند و با ورود به این اندامک از دست می‌رود (۲۸). مشخص نیست اگرcHSP60 همان ساختار هپتامریک، یعنی "بشکه" موجود در آن را تشکیل می‌دهد در داخل میتوکندری ایجاد می‌شود ، یا اگر همانطور که با HSP10 تعامل دارد در داخل میتوکندری اتفاق می‌افتد (۲۵). cHSP60 عملکردهای متمایزی از همتایان درون میتوکندری (که مخصوص کمک به تا شدن پروتئین است) دارد. مثلا، cHSP60 با سایر پروتئین های درگیر در آپوپتوز، مانند Bak و Bax مجموعه ای را تشکیل می‌دهد. کاهش HSP60 در کاردیومیوسیتها (CMC) منجر به تجزیه کمپلکس های بین چاپرونی، Bak و Bax می‌شود که به نوبه خود باعث آپوپتوز می‌شود و با انتشار و رها سازی سیتوکروم C ، فعال سازی کاسپاز ۳ و قطعه قطعه شدن DNA اتفاق می‌افتد (۲۸). همچنین، هیپوکسی موجب تجزیه کمپلکس HSP60-Bax در کاردیومیوسیت‌های موش می‌شود که با انتقال cHSP60 به غشای پلاسما و Bax به میتوکندری همراه است، که این عوامل به نوبه خود باعث شروع آپوپتوز می‌شوند. در مقابل، در همان مدل سطوح HSP60 میتوکندری بدون تغییر بود (۳۰). از این رو، به نظر می‌رسد توزیع مجدد cHSP60 به غشا پلاسما در طول هیپوکسی، به آغاز آبشار آپوپتوتیک کمک می‌کند. حضورHSP60 در غشای پلاسما فی‌نفسه مکانیسم بیماری زایی نارسایی قلب (HF) به شمار می‌رود. همچنین افزایش سطح سرمیHSP70 در بیماران مبتلا به انفارکتوس حاد میوکارد گزارش شده است و با کسر جهشی بطن چپ (LV) همبستگی منفی دارد (۸). در واقع،HSP70 درون سلولی و خارج سلولی نقشهای متفاوتی در تنظیم بازسازی قلب ایفا می کند.HSP70 خارج سلولی که از قلب آسیب دیده آزاد می شود، می تواند به عنوان یک الگوی مولکولی

1- Picard

مرتبط با آسیب (DAMP) برای تحریک التهاب میوکارد عمل کند، بنابراین، یک هدف درمانی بالقوه در درمان هیپرتروفی و فیبروز قلب می باشد .همچنین، گزارش شده است افزایش بیان آن می تواند مانع مرگ سلولی آپوپتوزی شود(۲۴). با اینحال، نقش و مکانیسم دقیق HSP70 در این خصوص بحث برانگیز و تا حد زیادی ناشناخته است.

ورزش یک مداخله مهم در حفظ سلامت قلب و عروق است یکی از مکانیسمهایی که ممکن است تا حدی تأثیر پیشگیرانه ورزش را توضیح دهد، افزایش HSPs میوکارد است (۸) به عنوان مثال، به دنبال ورزش شدید، افزایش HSP70 برای محافظت از میوکارد در برابر آسیب I/R گزارش شده است. از سویی، افزایش قابل توجهی در سطوح HSP70 میوکارد حیوانات تمرین کرده مشاهده شده است (۲۴) در این راستا، سیگنالینگ گیرنده β-آدرنرژیک یک تنظیم کننده مهم القای HSP70 پس از یک دوره تمرین شدید است. به ویژه، کاهش پروتئین کیناز PKA به واسطه گیرنده β-آدرنرژیک، افزایش ناشی از ورزش را در mRNA Hsp70 از طریق فعالسازی HSF1 و فعال سازی HSF1 را از طریق مهار ERK۱/۲ تنظیم میکند. پس از تمرین ورزشی، کاهش برون ده سمپاتیک به میوکارد، که با که با برادی کاردی ناشی از تمرین در حالت استراحت و در حین تمرین زیربیشینه مشاهده می شود، همراه است (۶). تصور می شود افزایش بیانHSP70 متعاقب تمرین تناوبی شدید کاهش برونده سمپاتیک به میوکارد باشد. همچنین، افزایش میل ترکیبی HSF1 DNA به ژنHSP70 پس از تمرین ورزشی از دیگر مکانیسمهای افزایشHSP70 می باشد .در این راستا، گزارش شده است حیوانات تمرین کرده افزایش قابل توجهی در تعاملات اتصال DNA HSF1-HSE در مقایسه با حیوانات کم تحرک پس از ورزش شدید نشان دادند .افزایش سطح پایه رونویسی ژن HSP70 در نتیجه افزایش اتصال به-DNA HSF1 HSEمی تواند افزایش طبیعی mRNA Hsp70 را پس از ورزش شدید توجیه کند(۸). از سویی نشان داده شده است که بیان بیش از حد HSP70 باعث افزایش فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانی میتوکندری در میوکارد می شود(۱۵ و ۲۴). در مدلهای حیوانی، افزایش بیان HSP70 از قلب در برابر اثرات مخرب ایسکمی محافظت میکند. HSP70 علاوه بر شرایط حاد، در وضعیت ایسکمی و خونرسانی مجدد به دنبال پیوند بای پس کرونر نقش محافظتی دارد. از سویی، در بیماران مبتلا به" استرس"مزمن، مانند CHF ، کاهش تولید HSP70 ممکن است نقش مهمی در کاهش عملکرد انقباضی در طول نارسایی قلبی داشته باشد .افزایش بیان HSP70 می تواند نشان دهنده یک مکانیسم حفاظتی ذاتی باشد که به بازیابی شرایط فیزیولوژیکی کمک می کند (۶)

افزایش محتوای پروتئین شوک گرمایی که روی نمونه های عضلانی متجانس بررسی شده است، قبلاً در پاسخ به ورزش های در برگیرنده انقباض های نیروی بالا (۲۱) و نه به دنبال ورزش های استقامتی، نشان داده شده است. ورزش های استقامتی، محرک های تنش زای فیزیولوژیکی ورزش(دما، تخلیه گلیکوژن، استرس اکسایشی) را افزایش می دهد که به نوبه خود ممکن است، پاسخ mRNAیا HSP اولیه مشاهده شده در حیوان و انسان را تسریع کند(۱۸). وهله های کوتاه مدت انقباضات برون گرا به طور کلی با این تغییرات فیزیولوژیکی همراه نیستند، اگر چه حاکی از آن هستند که محرک های تنش زای دیگری ممکن است در پاسخ HSPبه چنین ورزش مقاومتی، درگیر باشند .برای مثال، بار زیاد کلسیم با انقباضات عضلانی مکرر مرتبط است و ممکن است در کاهش پروتئین های استرس موثر باشد(۳).

علاوه بر آن، مرنت و همکاران (۲۵) بیان کرده است که هر گونه شرایط محیطی که ماهیت پروتئین را تغییر می دهد، انتظار می رود نوعی پاسخ استرسی را القا کند. سرانجام، ژانگ و همکاران(۱۵) نشان دادند شرایطی که با شکل گیری مجدد یا بزرگ شدن عضله همراه هستند، به نوعی پاسخ HSP را القا می کنند. نتایج این پژوهش نشان داد که تمرینات استقامتی باعث افزایش سطوح پروتئین شوک گرمایی پلاسما در موش ها می گردد .سازوکارهای مربوط به تغییرات ناشی از تمرین در مقادیر پروتئین شوک گرمایی ناشناخته است .پژوهش های انجام گرفته(۱۰ و ۲۱) نشان دادند که تمرینات هوازی، باعث افزایش پروتئین شوک گرمایی در عضلات

اسکلتی، قلب و همچنین بافت های دیگر می شود. همچنین نشان داده شده که با وهله های کوتاه مدت تمرینات مقاومتی نیز پروتئین شوک گرمایی افزایش یافته است (۱۱ و ۲۴). بر اساس این نتایج، احتمالا تمرین های با شدت و مدت متوسط، می توانند سبب افزایش بیان پروتئین شوک گرمایی در بدن شوند. همانگونه که نتایج پژوهش حاضر نیز گویای همین واقعیت است کهHSP ها در پاسخ به تمرین های مقاومتی در گروه های تمرین و مکمل+تمرین، افزایش می یابد.

با این وجود، با توجه به تازگی موضوع پژوهش حاضر، هنوز سوالات متعددی وجود دارد که شایسته بررسی بیشتر در مطالعات آینده می باشد. سازوکارهای القایی و استرس که رهایشHSP پلاسما را هنگام انقباض گروه های عضلانی کوچک به راه می اندازد، کدامند؟ در واقع، ساده است بفهمیم که شرایط هایپوکسی یا هایپروکسی، تولید گونه های اکسیژن واکنشی بیش از اندازه ای را در بافت های مختلف و متعدد از جمله عضله را افزایش می دهد و یک پاسخHSP به وجود می آورد .به عبارت دیگر، درک این که چگونه استرس اکسایشی موضعی القاء شده به وسیله انقباض یک عضله کوچک ممکن است افزایشی را در سطح HSPپلاسما ایجاد کند، مشکل است .سیگنال های عصبی به وجود آمدها ز عضله فعال ممکن است دفاع سلولی را در مقابل تولید فزآینده گونه های اکسیژن واکنشی نه تنها در عضلات منقبض شده، بلکه در بافت های دیگر، به راه بیاندازد .مشاهدات اخیر نشان می دهند که فسفوریلاسیونHSP با رهایش استیل کولین در شریان های ریوی و کولون رابطه دارد .فسفوریلاسیونHSP تعدیل شده به وسیله استیل کولین در عضله اسکلتی، اثبات نشده است، اما احتمالا بازتاب کولینرژیک به فعال سازی آوران های عضله پاسخ می دهد. درگیری احتمالی عصبی نشان می دهد که القاء فعال سازیHSP موردی است که به مطالعات بیشتر نیاز دارد (۷ و ۲۰). شواهد سلولی در مورد نقشHSP در تنظیم دینامیک اکتین طی فشار، حاکی از آن است کهHSP انسان ممکن است در فرآیندهای مهم برای ترمیم سلولی بعد از محرک های ورزشی، درگیر باشد (۱۵). علاوه بر آن نشان داده شده کهHSP به وسیله سایتوکاین ها، القاء می شود (۴). افزایش سطحHSP خون بعد از ورزش ممکن است از لوکوسیت ها و همچنین از عضلات منقبض شده، ناشی شود . در واقع در مقایسه باHSP که به سختی هنگام و بعد از ورزش، از غشای میوسیت عبور می کند، افزایش معنی دارHSP در خون بلافاصله بعد از وهله ورزش در انسان، اندازه گیری شده است (۶ و ۸). نقش آپوپتوزیس در آسیب عضلانی ناشی از ورزش به خوبی در بافت عضله اسکلتی توصیف نشده، اما بیان زیادHSP در سلول ها می تواند مانع آپوپتوز شده، یا آن را به طور منفی تنظیم کند، با این حال تواناییHSP را برای کم کردن مرگ سلولی برنامه ریزی شده، نشان می دهد (۲ و ۸). مشخص است که ورزش مقاومتی نسبت به ورزش استقامتی به طور مشخص تر به آسیب 48ساعته بعد از ورزش، منجر می شود(۷) .این افزایش سطح آسیب و ترمیم تارچه های عضلانی، مستلزم افزایش شکل گیری مجدد سلول است و ممکن است منجر به افزایش سنتز پروتئین های استرسی شود. تمرینات قدرتی مستقل از حجم تمرینات، به افزایش سطوحHSP در بخش سیتوزولی عضله پهن جانبی منجر می شوند .همچنین در عضله ذوزنقه ای، سطوحHSP با تمرینات افزایش یافتند (۲۴). در ارتباط با ورزش، از آنجایی پروتکل های ورزشی مقاومتی، برای القاء افزایش در تغییر تولید HSP کافی هستند، تغییرات در بیان پروتئین های استرس می توانند درون تارهای عضله که مستقیماً مسئول انقباض عضله هستند، رخ دهند و یا در پلاسما یا بافت های دیگر مانند ساختارهای عروقی و عصبی یا دربافت های پیوندی، اتفاق بیفتند (۲۱).

تصور می‌شود این چاپرون ها در پاتوژنز نارسایی قلبی (HF) شرکت می‌کند. این وضعیت اساساً حالت التهاب مزمن و آسیب پیشرونده کشنده عضله قلب است. این بیماری به عنوان عارضه تعدادی از اختلالات ژنتیکی یا اکتسابی می‌باشد که منجر به مرگ سلول و در نتیجه کاهش عملکرد پمپاژ قلب می‌شود. از جمله عواملی که باعث HF می‌شوند، کاردیومیوپاتی گشاد شده و سکته قلبی است. در این شرایط ، سطح پروتئین HSP60 و mRNA ۵-۲ برابر افزایش می‌یابد (۲۴). این نتایج در مطالعه دیگری که نشان دادند

cHSP60 (سیتوزولی) در نارسایی قلبی کاهش می‌یابد، در حالی که HSP60 میتوکندری در کاردیومیوسیت‌های نمونه‌های کاردیومیوپاتی و قلب‌های ایسکمیک افزایش می‌یابد، تایید شد. این نتایج در مطالعه دیگری که نشان دادند cHSP60 (سیتوزولی) در نارسایی قلبی کاهش می‌یابد، در حالی که HSP60 میتوکندری در کاردیومیوسیت‌های (CMC) نمونه‌های کاردیومیوپاتی و قلب های ایسکمیک افزایش می‌یابد، تایید شد (۸). در بیماران مبتلا به کاردیومیوپاتی گشاد شده HSP60 نه تنها در CMC، در بافت پیوندی نیز یافت شد (۶). مشاهدات اخیر موافق با داده های دیگر نشان می‌دهد که کاهش cHSP60 در CMC در طی هیپوکسی با قرارگیری HSP60 در غشا سلول همراه است (۵) و به نوبه خود ترشح آن از طریق مسیر اگزوزومی می‌باشد. قرارگیری HSP60 در غشای سلولی با افزایش آپوپتوز میوکارد در ارتباط است، همچنان که HSP60 به فضای خارج سلولی آزاد و به نوبه خود به جریان خون و سیستم لنفاوی منتقل می‌شود، می‌تواند سیستم ایمنی ذاتی را فعال و یک حالت پیش التهابی (از جمله افزایش TNF-alpha) ایجاد کند (۴).

در طی آسیب ایسکمی ریپرفیوژن قلبی، تولید بیش از حد رادیکالهای آزاد و افزایش HSP60 گردش خون، افزایش کلسیم درون سلولی، نشت H در سطوح میتوکندری و التهاب منجر به بازشدن منافذ نفوذپذیر میتوکندری می‌شوند که این می‌تواند به کاهش ATP، اکسیداسیون غیرقابل برگشت پروتئین، چربی و DNA در کاردیومیوسیت‌ها منجر شده و فرآیند آپوپتوز را شروع کنند(۸۱). فعال‌سازی آپوپتوز از طریق کاهش بیان پروتئین‌های شوک گرمایی HSP60 و HSP70 اتفاق می افتد که از مشخص‌ترین پاسخ‌های سلولی به استرس ناشی از سارکوپنی در عضلات اسکلتی هستند (۱۱). علاوه بر این در شرایط استرس عواملی مثل گلوکوکورتیکوئیدها و سایتوکین‌ها با ایجاد استرس در میتوکندری، موجب تغییراتی در نفوذپذیری آن می‌شوند و سیتوکروم c که در غشای داخلی میتوکندری قرار دارد، به داخل سیتوزول آزاد و به فاکتور ۱ پروتئاز فعال‌کننده آپوپتوزیس (Apaf-1) متصل و ترکیبی به نام dATPتشکیل می‌دهد. سپس این ترکیب، از طریق فعال‌سازی پروکاسپاز ۹، کاسپاز ۹ و کاسپاز ۳ موجب آپوپتوزیس می‌شود (۱۸). HSP70و HSP27 مهم ترین پروتئینهای درگیر در آپوپتوز هستند که نقش مهمی در محافظت از آسیب ایسکمی تزریق مجدد بر عهده دارند، زیرا HSP70 و HSP27 مسدودکننده‌های Apaf-1 و سیتوکروم c و متعاقباً مهارکننده کاسپاز ۹ می‌باشند. در مقابل HSP60 به تنهایی یا همراه با HSP10 از طریق فعال‌سازی کاسپاز ۳ آپوپتوز را به طور مستقیم تحریک می‌کند(۸۲). با اینحال، اطلاعاتی وجود دارد که miR-1 و miR-133 ویژه عضله هم از طریق هدف قرار دادن HSP60، HSP70 و همچنین کاسپاز ۹، سبب جلوگیری از آپوپتوز کاردیومیوسیت ها می‌شوند(۸۳). این نتایج با نتایج مطالعه کیائو و همکاران[1] (۲۰۲۳)، سوسی و همکاران (۲۰۲۰) و فتحی و همکاران (۲۰۲۰) همخوانی دارد. به علاوه، لازم به ذکر است که تاثیر ورزش بر تغییرات HSP60 و HSP70 بر قلب موش‌های مدل ایسکمی تزریق مجدد ناشی از ایزوپرترنول هم تایید شده است(۸۴). همچنین اطلاعاتی وجود دارد که تمرین ورزشی کوتاه مدت می‌تواند بدون افزایش پروتئین‌های شوک گرمایی هم، سبب افزایش تحمل میوکارد به آسیب ناشی از ایسکمی تزریق مجدد شود (۸۵). این نتایج با نتایج کیم[2] و همکاران (۲۰۱۶) همسو است و همخوانی دارد. بنابراین این نکته حداقل می‌تواند حاکی از آن باشد که تمام اثرات مفید مشاهده شده در قلب موش‌های مدل سکته قلبی ما شاید فقط به مسیر HSP60 و HSP70 و همچنین در فرادست هر دوی آنها وابسته نبوده است. بااینحال، با وجود اطلاعات نسبتا زیاد در مورد تاثیر مفید BCAA بر پروتئینهای HSP60 و HSP70 در سلولهای سرطانی عصبی و خونی، اما در مورد سلولهای قلبی دچار سکته تاکنون شواهد مستقیم در این زمینه فراهم نشده است و بنابراین یافته‌های تحقیق حاضر از این نظر بسیار نوآوری دارد. در کل در این تحقیق با وجود

1. Xiao et al
2. Kim

محدودیتهای زیاد از قبیل عدم بررسی مستقیم شاخص‌های عملکرد قلبی موشها، عدم تایید مستقیم بروز سکته، عدم بررسی تفکیکی سلولهای دچار سکته و غیر سکته کرده قلب، عدم بررسی سرنوشت جذب BCAA، و همچنین عدم تفکیک نوع دقیق مرگ سلولی و بسیاری از محدودیت‌های دیگر، تاثیر مثبت هر دو مداخله تمرین و تمرین+مکمل را نشان داده شد.

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد که اثر فزاینده دو ماه تمرین مقاومتی و مکمل BCAA بر تغییرات HSP60 و HSP70 بافت قلبی، محیط مناسبی را برای افزایش یکپارچگی غشای میتوکندریایی سلول‌های عضله قلبی و احتمالاً توقف آپوپتوز فراهم نماید. در کل می توان نتیجه گرفت که تمرین مقاومتی و مکمل BCAA تا اندازه ای احتمالا می‌تواند آپوپتوز را کمتر کند. این نتایج اثر مثبت مقاومتی و مکمل BCAA در حفظ حیات سلول و تعدیل آپوپتوز و ضرورت گنجاندن آن در برنامه‌های ورزشی را نشان می‌دهد. با وجود این، با توجه به پژوهش های اندک انجام شده در این رابطه، درک اثرات فعالیت ورزشی بر بیان ژن فاکتورهای درگیر در آپوپتوز در عضله قلبی نیاز به پژوهش‌های بیشتری دارد. با وجود کمبود شواهد تحقیقی مشابه و با وجود محدودیتهای زیاد، این تحقیق نشان داد که تقریبا هر ۲ مداخله با اثرات نسبتا مفیدی بر افزایش HSP60 و HSP70 درگیر در آپوپتوز کاردیومیوسیت ها به دنبال القای سکته قلبی حاد ناشی از تزریق درون صفاقی ایزوپرترنول (بازتاب دهنده شرایط آسیب قلبی مدل ایسکمی-تزریق مجدد) همراه هستند. ولی عموما مقدار اثرات مشاهده شده پس از مداخله توام (تمرین مقاومتی همراه با مکمل BCAA) بیشتر بود. به نظر می‌رسد با توجه به اینکه اطلاعات این تحقیق می‌تواند زمینه ساز تجویز مکمل BCAA در کنار برنامه‌های تمرین مقاومتی برای بازتوانی بیماران سکته قلبی فراهم کند. بدین ترتیب، با توجه به پژوهش های اندک انجام شده در این رابطه، درک اثرات فعالیت ورزشی بر بیان ژن فاکتورهای درگیر در آپوپتوز در عضله قلبی نیاز به پژوهش‌های بیشتری دارد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از تمامی عزیزانی که در انجام هرچه بهتر این پژوهش، ما را همراهی نمودند قدردانی به عمل می‌آوریم.

حامی مالی

این مقاله حامی مالی ندارد.

تعارض منافع

در این مقاله، هیچ گونه تعارض منافعی برای نویسندگان وجود ندارد.

منابع

۱. تامپسون پل. قلب شناسی ورزشی و فعالیت بدنی. ترجمه: دبیدی روشن ولی‌اله، پوراصغر مهدی، عبدی هدی. انتشارات دانشگاه مازندران. ۱۳۸۹. چاپ اول.

۲. سموات طاهره، حجت زاده علی. برنامه‌های پیشگیری و کنترل بیماری‌های قلبی-عروقی. وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی. معاونت بهداشت. مرکز مدیریت بیماری‌های غیرواگیر. اداره قلب و عروق. ۱۳۹۰.

۳. قراخانلو رضا، ملانوری مهدیه. نگاهی به سازگاری‌های سلولی و مولکولی به تمرینات ورزشی. انتشارات حتمی. ۱۳۹۴. چاپ اول.

۴. کبودانیان سوسن، غضنفری طوبی، شاکری راحله. بیوشیمی مرگ سلولی. انتشارات دانشگاه شاهد. ۱۳۹۳. چاپ اول.

۵. لودیش هاروی، برک آرنولد، کیسر کریس و همکاران. زیست شناسی سلولی و مولکولی. ترجمه: ستوده نیا عبدالحسین، پروانه لیلا، قربانی محمدحسین، آموزگار افسانه. انتشارات کتاب ارجمند. ۱۳۹۰. چاپ اول.

6. Gjovaag TF, Vikne H, Dahl HA. Effect of concentric or eccentric weight training on the expression of heat shock proteins in m. biceps brachii of very well-trained males. Eur J Appl Physiol 2006; 96: 355–362. DOI 10.1007/s00421-005-0084-6

۷. منتظری فاطمه، رهگذر سهیلا، قائدی کامران. آپوپتوز و ارگانل‌های سیتوپلاسمی. ژنتیک در هزاره سوم. ۱۳۹۰. سال نهم، شماره اول، ص:۲۳۱۲-۲۳۰۰.

8. Chichester L, Wylie AT, Craft S, Kavanagh K. Muscle Heat Shock Protein 70 Predicts Insulin Resistance with Aging. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2015; 70 (2):155-162. https://doi.org/10.1093/gerona/glu015
9. Amin H, Vachris J, Hamilton A, Steuerwald N, Howden R, Arthur ST. GSK3β inhibition and LEF1 upregulation in skeletal muscle following a bout of downhill running. J Physiol Sci.2014. 64(1):1-11. https://doi.org/10.1007/s12576-013-0284-5
10. Javid Tabrizi N, Bashiri J, Narimani Rad M. [Effect of 12 weeks of treadmill aerobic training on cytochrome C and Caspase-9 gene expression in cardiac muscle of male rats (Persian)]. Qom Univ Med Sci J. 2017; 11(6):1-9.
11. Kwak HB. Effects of aging and exercise training on apoptosis in the heart. J of Exer Rehabi. 2016; 9(2):219-22. doi: 10.12965/jer.130002
12. Lee Y, Min K, Talbert EE, Kavazis AN, Smuder AJ, Willis WT, et al. Exercise protects cardiac mitochondria against ischemia reperfusion injury. MedSci Sports Exerc. 2018; 44(3):397-405. https://doi.org/10.1249/mss.0b013e318231c037
13. Phaneuf S, Leeuwenburgh C. Apoptosis and exercise. Med Sci Sports Exerc. 2014; 33(3):393-6.
14. 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. J Appl Physiol. 2014; 105(6):1934-43. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00037.2008
15. Zhong N, Chen H, Zhao Q, Wang H, Yu X, Eaves AM, et al. Effects of griseofulvin on apoptosis through caspase-3- and caspase-9-dependent pathways in K562 leukemia cells: An in vitro study. Curr Ther Res Clin Exp. 2017; 71(16):384-97. doi: 10.1016/j.curtheres.2010.12.004
16. Rodríguez-Berriguete G, Galvis L, Fraile B, de Bethencourt FR, Martínez-Onsurbe P, Olmedilla G, et al. Immunoreactivity to caspase-3, caspase-7, caspase-8, and caspase-9 forms is frequently lost in human prostate tumors. Hum Pathol. 2016; 43(2):229-37. https://doi.org/10.1016/j.humpath.2011.04.024
17. Song W, Kwak HB, Lawler JM. Exercise training attenuates age-induced changes in apoptotic signaling in rat skeletal muscle. Antioxid Redox Signal. 2013; 8(3-4):517-28. https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.517
18. Harada H, Hiraoka M, Kizaka-Kondoh S. Antitumor effect of TAT-oxygendependent degradation-caspase-3 fusion protein specifically stabilized and activated in hypoxic tumor cells. Cancer Res. 2002; 62(7):2013-
19. Javid Tabrizi N, Bashiri J, Narimani Rad M. [Effect of 12 weeks of treadmill aerobic training on cytochrome C and Caspase-9 gene expression in cardiac muscle of male rats (Persian)]. Qom Univ Med Sci J. 2017; 11(6):1-9. http://journal.muq.ac.ir/article-1-869-en.html
20. Siahkohian M, Asgharpour-arshad M, Bolboli L, Jafari A, Sheikhzadeh hesari F. [Effect of 12- weeks aerobic training on some indices of skeletal muscle apoptosis in male rats (Persian)]. Med J Tabriz Univ Med Sci Health Serv. 2018; 39(6):35-43. https://www.sid.ir/fa/journal/ViewPaper.aspx?id=359071
21. Murlastis Z, Cultip RG, Geronilla KB., et al. Resistance training increases heat shock protein levels in skeletal muscle of young and old rats. Experimental Gerontology 2006; 41:398–406. https://doi.org/10.1016/j.exger.2006.01.005

22. Maurer U, Charvet C, Wagman AS, Dejardin E, Green DR. Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane per-meabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. Mol Cell. 2006. 21:749–760. DOI: 10.1016/j.molcel.2006.02.009
23. Lee SD, Shyu WC, Cheng IS, Kuo CH, Chan YS, Lin YM, et al. Effects of exercise training on cardiac apoptosis in obese rats. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2013; 23(6):566-73. https://doi.org/10.1016/j.numecd.2011.11.002
24. Suzuki K, Peake J, Nosaka K, Okutsu M, Abbiss CR, Surriano R, Bishop D, Quod MJ, Lee H, Martin DT, Laursen PB. Changes in markers of muscle damage, inflammation and HSP70 after an Ironman triathlon race. Eur J Appl Physiol 2006; 98:525–534. https://doi.org/10.1007/s00421-006-0296-4
25. Mernet S, Kayatekin BM, Resmi H, Açıkgöz O, Kaynak C, Özer E. The apoptotic response to strenuous exercise of the gastrocnemius and solues muscle fibers in rats. Eur. J. Appl. Physiol: 2018:102(5), 515-524. https://doi.org/10.1007/s00421-007-0612-7
26. Huang Ch, Lin TJ, Chen ChCh, Lin WT. Endurance training accelerates exhaustive exercise-induced mitochondrial DNA deletion and apoptosis of left ventricle myocardium in rats. Eur J Appl Physiol. 2012; 107(6):697. 706. https://doi.org/10.1007/s00421-009-1177-4
27. Rastogi RP, Rajeshwar R, Sinha RP. Apoptosis: Molecular mechanisms and pathogenicity. EXCLI J. 2016; 8:155-88.
28. Marzetti E, Privitera G, Simili V, Wohlgemuth SE, Aulisa L, Pahor M, et al. Multiple pathways to the same end: mechanisms of myonuclear apoptosis in sarcopenia of aging. Sci. World J. 2014; 10:340-9. https://doi.org/10.1100/tsw.2010.27
29. Viña J, Gomez-Cabrera MC, Borras C, Froio T, Sanchis-Gomar F, Martinez-Bello VE et al. Mitochondrial biogenesis in exercise and in ageing. Adv Drug Deliv Rev. 2009; 61(14):1369-14. https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.06.006
30. Picard 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. J ApplPhysiol. 2008. 105: 1934 –19. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00037.2008