Researches in Sport Sciences and Medical Plants

Spring 2021. Vol 1. Issue 3

Research Paper

The Effect of Eight Weeks of Interval Training with Grape Seed Nanoparticles Supplementation on Bax and Bcl2 Gene Expression in the Heart Tissue of Myocardial Infarction Rats

Hamid Mohammadi Hosseinabadi [1], Khosro Jalali Dehkordi [1 *], Gholamreza Sharifi [1], Zohreh Mazaheri Tirani [2]

1. Department of Physical Education and Sport Sciences, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
2. Basic Medical Science Research Center, Histogenotech Company, Tehran, Iran

Received: 17 April 2021
Revised: 5 May 2021
Accepted: 7 June 2021

Use your device to scan and read the article online

Keywords:
Aerobic Training, Grape Seed, Bax, Bcl2, Myocardial Infarction

Abstract

Introduction: The use of exercise training and herbal supplements to treat diseases and metabolic disorders has become common among people. Considering the health-improving effects of aerobic training and grape seed nanoparticles extract, the present study was performed to investigate the effect of eight weeks of aerobic training with grape seed extract supplementation on Bax and Bcl2 gene expression in the heart tissue of rats with myocardial infarction.

Materials and methods: In this experimental study, 20 rats were divided into four groups of five animals, including: 1) control, 2) aerobic training, 3) grape extract, and 4) training + grape extract. To investigate the effects of myocardial infarction on the study variables, five healthy rats were placed in the healthy control group. For eight weeks, groups 3 and 4 consumed 150 mg of grape extract daily by gavage. Also, groups 2 and 4 performed aerobic interval training, with 7 interval alternations, each including 4 minutes with an intensity of 80-90% VO_{2max} and 3 minutes with an intensity of 65-75% VO_{2max}. The Kolmogorov- Smirnov and one-way ANOVA with Tukey's *post- hoc* tests were used to analyze the findings ($P \leq 0.05$).

Findings: Induction of myocardial infarction had a significant effect on increasing Bax gene expression and decreasing Bcl2 gene expression in heart tissue ($P \leq 0.001$). However, aerobic training along with grape seed nanoparticle extract consumption had a significant effect on reducing Bax gene expression and increasing Bcl2 gene expression in the heart tissue of rats with myocardial infarction ($P \leq 0.01$).

Conclusion: It seems that aerobic training along with grape extract consumption has more favorable effects on improving Bax and Bcl2 gene levels in myocardial infarction than either alone.

Citation: Mohammadi Hosseinabadi H, Jalali Dehkordi Kh, Sharifi Gh, Mazaheri Tirani Z. The effect of eight weeks of interval training with grape seed nanoparticles supplementation on Bax and Bcl2 gene expression in the heart tissue of myocardial infarction rats. Res Sport Sci Med Plants. 2021; 1 (3): 23- 33.

***Corresponding author:** Khosro Jalali Dehkordi
Address: Department of Physical Education and Sport Sciences, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
Tell: 00989131854997
Email: khosrojalali@gmail.com

Extended Abstract

Introduction

Myocardial infarction (MI) occurs as a result of insufficient blood flow as well as hypoxia and reduced glucose availability to the heart tissue, which can lead to cell damage (1). During ischemia and reperfusion, the production of free radicals increases, causing cell damage due to the oxidation of proteins and fats, as well as changes in the structure of the genome. Neutralization of oxygen free radicals by superoxide dismutase (SOD) and catalase can prevent cardiac apoptosis and at the same time diminish damage / reperfusion (2). MI can also induce apoptosis (3). Cardiac myocyte apoptosis is a process that leads to the loss of a percentage of heart cells after MI (4). Researchers are constantly looking for appropriate methods to prevent apoptosis and various heart diseases related to it. Some studies have shown that moderate intensity continuous exercise may reduce apoptosis in various tissues (10, 11). The polyphenols in grape seed extract comprise flavonoids, gallic acid, as well as dimeric, monomeric and polymeric proanthocyanidins. Proanthocyanidin dimer in grape seed is the most effective antioxidant compound (13). Studies show that grape seed extract has a high potential for scavenging free radicals and inhibiting oxidative stress, and in cases of myocardial infarction and tissue ischemic reperfusion, its inhibitory role against oxidative stress has been proven (13, 14). Given the increasing prevalence of myocardial infarction and its detrimental effects on health as well as its complications, and the effect of antioxidant supplements and type of physical activity on its control, also considering that few studies has been conducted on the effect of interval training and grape seed supplementation on the apoptotic status of cardiomyocytes in rats following isoproterenol-induced myocardial infarction, the present study attempts to provide clarification to the uncertainties in this regard.

Materials and Methods

In this experimental study, 25 Wistar rats were prepared from the Pasteur Institute of Iran. To induce myocardial infarction, subcutaneous injection of 85 mg/kg isoproterenol dissolved in normal saline was used. Also, histochemical hematoxylin-eosin staining technique was used to ensure induction of myocardial infarction. Then, the rats were randomly divided into 5 groups, including: 1) healthy control, 2) myocardial infarction, 3) myocardial infarction + aerobic interval training, 4) myocardial infarction + grape seed nanoparticles, and 5) myocardial infarction + aerobic interval training + grape seed nanoparticles. Groups 3 and 5 trained on treadmill for eight weeks and 5 sessions per week, while groups 1, 2 and 4 did not take part in any exercise training. Groups 4 and 5 received 150 mg of grape seed nanoparticles daily. Before performing the training protocol, the rats in the training group were familiar with how to work on the treadmill for two weeks (15). Aerobic training protocol consisted of warm-up for 10 minutes (50-55% VO_{2max}), 7 bouts of training (each comprising 4 minutes with intensity of 80-90% VO_{2max} and 3 minutes with intensity of 65-75% VO_{2max}), and cooling for one minute (16). 72 hours after the last training session and in the fasting state, the rats were anesthetized with a combination of ketamine (70 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and their heart tissue was removed and immediately after washing with normal saline was placed in special tubes and frozen in liquid nitrogen to be transferred to a laboratory. The Kolmogorov-Smirnov test, as well as one-way analysis of variance with Tukey's *post-hoc* test were used to analyze the findings ($P \leq 0.05$).

Findings

The results of one-way analysis of variance showed that there was a significant difference in the levels of BAX and Bcl2

gene expression in the heart tissue of rats in different research groups (P≤0.05). The results of Tukey's *post hoc* test showed that in the MI group, the BAX mRNA levels increased significantly compared to the control group (P = 0.001), while the levels in the MI + training intervention and MI + grape nanoparticles did not show significant changes compared to the control MI group (P> 0.05). However, Bax levels in the training + grape seed group showed a significant decrease compared to the myocardial infarction group (P=0.01). Also, Bcl2 mRNA levels in the myocardial infarction group was significantly reduced compared to the control group (P=0.001), while the levels in the MI + training intervention and MI + grape nanoparticles did not show significant changes compared to the control MI group (P>0.05). However, Bcl2 levels in the training + grape seed group showed a significant increase compared to the myocardial infarction group (P = 0.01).

Discussion

The results of this study showed that 8 weeks of aerobic interval training along with grape seed nanoparticles significantly increased Bcl2 anti-apoptotic protein and significantly decreased Bax protein. Normally, there is a balance between inhibitory factors and apoptosis stimuli, but in physiological and pathological situations, this balance is permanently disturbed, and one of these situations is physical activity. Exercise is likely to prevent cell death by influencing the most important factors affecting the process of apoptosis (21). Regular exercise increases myocardial Bcl2 protein and changes Bax to Bcl2 ratio to an anti-apoptotic environment. Several mechanisms have been proposed for the protective effects of endurance training on myocardial apoptosis, such as increased coronary artery circulation, expression of endoplasmic reticulum stress proteins, increased cyclooxygenase 2 activity, induction of heat shock proteins (Hsp70, Hsp72, Hsp9o), increased myocardial cytosolic antioxidant activity, increased nitric oxide messaging, mitochondrial phenotype change, altered and increased sarcolemma ATP-sensitive potassium channels and mitochondrial membrane (22). Studies show that grape seed extract has a high potential for scavenging free radicals and inhibiting oxidative stress, and in cases of myocardial infarction and tissue ischemic reperfusion, its inhibitory role against oxidative stress has been proven (26). However, the mechanisms underlying these effects are unclear and hence further research is required in this regard.

Conclusion

In general, the results of the present study showed that 8 weeks of aerobic interval training along with grape seed nanoparticles supplementation significantly increased anti-apoptotic protein Bcl2 and significantly decreased apoptotic protein Bax, which indorses a decrease in apoptosis and an increase in the survival of healthy cells in the heart tissue of rats following aerobic training intervention and grape seed nanoparticles supplementation.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

The present study has been approved by the Research Ethical Committee of the Islamic Azad University, Isfahan Branch (Khorasgan) with the ethics code IR.IAU.KHUISF.REC.1399.045.

Funding

Islamic Azad University, Isfahan Branch (Khorasgan)

Authors' contributions

Design and topic development: Khosro Jalali Dehkordi, Gholamreza Sharifi; Methodology and data analysis: Hamid Mohammadi Hosseinabadi; supervision and proofreading of the final draft, Khosro Jalali Dehkordi, Gholamreza Sharifi and Hamid Mohammadi Hosseinabadi

Conflicts of interest

According to the authors of the present article, there is no conflict of interest.

مقاله پژوهشی

اثر هشت هفته تمرین تناوبی همراه با نانوذره هسته انگور بر بیان ژنی Bax و Bcl2 بافت قلب موش صحرائی مدل سکته قلبی

حمید محمدی حسین آبادی [۱]، خسرو جلالی دهکردی [۱*]، غلامرضا شریفی [۱]، زهره مظاهری تیرانی [۲]

۱. گروه فیزیولوژی ورزش، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

۲. مرکز تحقیقات فن آوران بافت و ژن پا سارگارد، شرکت هیستولوژیک، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۲۸ فروردین ۱۴۰۰
تاریخ داوری: ۱۵ اردیبهشت ۱۴۰۰
تاریخ پذیرش: ۱۷ خرداد ۱۴۰۰

از دستگاه خود برای اسکن و خواندن مقاله به صورت آنلاین استفاده کنید

واژه‌های کلیدی:
تمرین هوازی، هسته انگور، Bax، Bcl2، سکته قلبی

چکیده

مقدمه و هدف: استفاده از تمرینات ورزشی و مکمل‌های گیاهی برای درمان بیماری‌ها و اختلالات سوخت و سازی در بین مردم رواج یافته است. با توجه به اثرات بهبود دهنده سلامتی تمرین هوازی و عصاره هسته انگور مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر هشت هفته تمرین هوازی همراه با عصاره هسته انگور بر بیان ژنی Bax و Bcl2 بافت قلب موش-های صحرایی مبتلا به سکته قلبی انجام شد.

مواد و روش ها: در این پژوهش تجربی ۲۰ سر موش صحرایی در چهار گروه پنج سری شامل ۱) کنترل، ۲) تمرین هوازی، ۳) عصاره انگور، و ۴) تمرین + عصاره انگور تقسیم شدند. جهت بررسی اثرات القای سکته قلبی بر متغیرهای تحقیق پنج سر موش صحرایی سالم در گروه کنترل سالم قرار گرفتند. در مدت هشت هفته گروه های ۳ و ۴ روزانه ۱۵۰ میلی گرم عصاره انگور به صورت گاواژ مصرف کردند همچنین تمرین تناوبی هوازی در گروه های ۲ و ۴ با ۷ تناوب اینتروال و هر تناوب شامل ۴ دقیقه با شدت ۸۰ تا ۹۰ حداکثر اکسیژن مصرفی و ۳ دقیقه با شدت ۶۵ تا ۷۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی انجام گرفت. جهت تجزیه و تحلیل یافته ها، از آزمون های کالموگروف -اسمیرنوف، تحلیل واریانس یک راهه همراه با آزمون تعقیبی توکی استفاده شد ($P\leq ۰/۰۵$).

یافته‌ها: القای سکته قلبی اثر معنی داری بر افزایش بیان ژنی Bax و کاهش بیان ژنی Bcl2 بافت قلب داشت ($P\leq ۰/۰۰۱$).با این وجود تمرین هوازی همراه با مصرف عصاره نانو ذره هسته انگور اثر معنی داری بر کاهش بیان ژنی Bax و افزایش بیان ژنی Bcl2 بافت قلب موش های صحرایی مبتلا به سکته قلبی داشت ($P\leq ۰/۰۱$).

بحث و نتیجه گیری: به نظر می رسد تمرین هوازی همراه با مصرف عصاره انگور نسبت به هر کدام به تنهایی اثرات مطلوب تری بر بهبود سطوح ژنیBax و Bcl2 در وضعیت ابتلا به سکته قلبی دارد.

مقدمه

سکتهٔ قلبی (MI) در نتیجهٔ جریان ناکافی خون و نیز هیپوکسی و کاهش گلوکز در دسترس بافت‌های قلبی پدید می‌آید که میتواند به آسیب سلولی منجر شود (۱).

در طول دوره‌های ایسکمی و برقراری مجدد جریان خون، تولید رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد که موجب آسیب سلولی در اثر اکسیداسیون پروتئین‌ها و چربی‌ها و نیز تغییر ساختار ژنوم می‌شود.

* **نویسنده مسئول:** خسرو جلالی دهکردی
نشانی: گروه فیزیولوژی ورزش، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران
تلفن: ۰۹۱۳۱۸۵۴۹۹۷
پست الکترونیکی: khosrojalali@gmail.com

خنثی شدن رادیکال‌های آزاد اکسیژن توسط سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز می‌تواند از آپوپتوز قلبی جلوگیری کند و به طور همزمان آسیب/خون رسانی مجدد را کاهش دهند (۲). MI می‌تواند آپوپتوز را نیز القا کند (۳). آپوپتوز میوسیت‌های قلبی فرآیندی است که پس از MI به از دست رفتن درصدی از سلول‌های قلبی منجر می‌شود (۴). گزارش شده است که استرس اکسیداتیو و آپوپتوز نقش مهمی در پیشرفت سکته قلبی، ایسکمی/ برقراری مجدد جریان خون، پرفشاری خون، آسیب عضلانی قلبی و گرفتگی عروق قلبی دارد. این برنامه به طور مشخص از طریق گروهی از خانواده (Bcl2) B-cell Lymphoms کنترل می‌شود که شامل پروتئین های خانواده ضد آپوپتوز است و در مقابل خانواده پیش آپوپتوز Bcl2 قرار می‌گیرند و می‌توانند تولید دایمر همسان Homodimerise یا غیرهمسان Hetrosideh نمایند (۵). مطالعات نشان داده‌اند افزایش تعداد اعضای خانواده Bcl2 پیش آپوتوزی یا کاهش اعضای ضد آپوپتیکی خانواده Bcl2 کنترل کننده‌های مسیر آپوپتوزی می‌باشند (۶). علاوه بر Bcl2، Bax (Bcl-2like protein4) نیز از پروتئین‌های اصلی و مهم در تنظیم آپوپتوز می‌باشند (۵). Bcl2 پروتئین ضد آپوپتوزی است که افزایش بیان این پروتئین، سلول قلبی را در مقابل مرگ سلولی محافظت می‌کند. در حالی که Bax یک پروتئین پیش آپوپتوزی بوده و به مقدار زیادی طی آپوپتوز بیان می‌شود. افزایش نسبت Bax به Bcl2 معمولا برای تعیین القای آپوپتوز در بافت-های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد (۷). Bax پروتئینی است که با خنثی کردن عمل Bcl2 آپوپتوز را فعال نموده و تغییراتی در بافت‌ها ایجاد می‌نماید که شامل کاهش shrinkage یا مهار چسبندگی سلول آپوپتوزی به سلول‌های دیگر و ماتریکس خارج سلولی، ایجاد تاول‌های غشای پلاسمایی Blebbing و تراکم condensation هسته‌ای، قطعه قطعه کردن DNA cleavge ژنومی، افزایش اندازه رتیکولم آندوپلاسمیک، آزاد سازی ریبوزوم‌ها و تجزیه سلول به اجسام آپوپتوزی سلول در حال مرگ می‌باشد (۸). به طور کلی Bax محرک بسیار قوی مرگ سلولی است؛ در صورتی که عملکرد Bcl2 در راستای افزایش بقای سلولی است. بیشتر پژوهش‌ها نشان داده‌اند که جابه جایی پروتئین Bax به طرف میتوکندری و قرار گرفتن آن در داخل غشای بیرونی سبب رهایش سایر عومل آپوپتوزی (مانند سیتوکروم C) از فضای بین غشای میتوکندری می‌شود (۸ و ۹). این در حالی است که پروتئین Bcl2 با فعالیت پیش آپوپتوزی پروتئین Bax مخالفت می‌نماید و موجب حفظ یکپارچگی غشای میتوکندری می‌شود. در نهایت پیام-های آپوپتوزی در فعال سازی کاسپازهای مثل کاسپاز -۳ هم راستا شده باعث تخریب احتمالی سلول می‌شوند (۶). بنابراین پژوهشگران همواره به دنبال روش‌های مناسب برای پیشگیری از آپوپتوز و بیماری‌های مختلف قلبی مرتبط با آن هستند. برخی مطالعات نشان دادند انجام تمرینات ورزشی با شدت متوسط و مداوم احتمالا موجب کاهش آپوپتوز در بافت‌های مختلف می‌شود (۱۰ و ۱۱). در این راستا مک میلان و همکاران[1] گزارش کردند که شش هفته تمرین استقامتی موجب کاهش قطعه قطعه شدن DNA، رهایش سیتوکروم C و پروتئین Bax می‌شود (۱۲). هسته انگور از فراورده‌های زائد کارخانه‌های آب میوه می‌باشد که ترکیبی از چربی، پروتئین، کربوهیدرات و ۵ الی ۸ درصد پلی فنل[2] بوده که مقادیر آن بستگی به گونه و جنس انگور دارد. پلی فنل‌های موجود در عصاره هسته انگور شامل فلاوینوئیدها[3]، اسید گالیک[4] و دیمریک[5]، مونومریک[6] و پلی مریک پروآنتوسیانیدین[7] می‌باشند. پروآنتوسیانیدین دیمر[8] موجود در هسته انگور موثرترین ترکیب آنتی اکسیدان می‌باشد (۱۳). مطالعات نشان می‌دهد که عصاره هسته انگور دارای پتانسیل بالایی در از بین بردن رادیکال‌های آزاد و مهار استرس اکسیداتیو بوده و در موارد انفارکتوس قلبی و ایسکمی برقرار مجدد گردش خون بافتی[9]، نقش مهاری آن در برابر استرس اکسیداتیو به اثبات رسیده است (۱۳ و ۱۴). با توجه به شیوع روزافزون بیماری سکته قلبی و اثرات مضر آن بر سلامتی و بروز عوارض ناشی از آن و تاثیر مصرف مکمل‌های آنتی اکسیدانی و نوع خاص فعالیت بدنی بر کنترل آن و با توجه به اینکه مطالعات اندکی در رابطه با اثر تمرین تناوبی و مصرف مکمل هسته انگور بر وضعیت آپوپتوز کاردیومیوسیت‌های موش‌های صحرایی بعد از انفاراکتوس قلبی میوکاردی القا شده با ایزوپروترنول[10] انجام شده است، در تحقیق حاضر محقق برآن است تا به ابهامات این زمینه پاسخ دهد.

مواد و روش ها

حیوانات: در این پژوهش تجربی ۲۵ سر موش صحرایی نژاد ویستار از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. پس از انتقال موش‌های صحرایی به محیط آزمایشگاه، هر ۵ سر موش در یک قفس پلی کربنات شفاف در محیطی با دمای ۲۰ تا ۲۴ در جه سانتی گراد و رطوبت ۳۵ تا ۴۰ درصد و همچنین چرخه روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند. حیوانات با غذای مخصوص جوندگان تغذیه می‌شدند و آب مورد نیاز حیوانات نیز به صورت آزاد در دسترس آنها قرار می‌گرفت و تمام ملاحظات اخلاقی بر اساس نسخه انتشار یافته انجمن ملی سلامتی در مورد کار با حیوانات آزمایشگاهی مد نظر قرار گرفت. برای القای سکته قلبی از تزریق زیر جلدی ایزوپروترنول به مقدار ۸۵ میلی گرم/کیلوگرم به صورت محلول در نرمال سالین استفاده شد. همچنین برای اطمینان از القای سکته قلبی از تکنیک هیستوشیمیایی رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین استفاده شد.

---

1 McMillan et al
2 Polyphenol
3 Flavinoids
4 Gallicacid
5 Dimmer
6 Monomeric
7 Polyacrylate Panthocyanidine
8 Dimmer Panthocyanidine
9 Ischemic reperfusion
10 Isoproterenol

نحوه گروه بندی و اعمال مداخلات: موش‌های صحرایی به طور تصادفی به ۵ گروه شامل ۱)کنترل سالم، ۲) سکته قلبی، ۳) سکته قلبی + تمرین ورزشی تناوبی هوازی، ۴) سکته قلبی + نانوذره هسته انگور و ۵) سکته قلبی + تمرین ورزشی تناوبی هوازی + نانوذره هسته انگور تقسیم شدند. گروه‌های ۳ و ۵ به مدت هشت هفته و ۵ جلسه در هفته روی نوارگردان مخصوص جوندگان به تمرین پرداختند در حالی که گروهای ۱، ۲ و ۴ در هیچ گونه فعالیت ورزشی شرکت نداشتند. گروه‌های ۴ و ۵ روزانه به میزان ۱۵۰ میلی گرم نانوذره هسته انگور دریافت کردند. قبل از اجرای برنامه تمرینی موش‌های صحرایی گروه تمرینی، به مدت دو هفته با نحوه انجام فعالیت روی نوارگردان آشنا شدند (۱۵). برنامه تمرین تناوبی هوازی شامل گرم کردن به مدت ۱۰ دقیقه (۵۰ تا ۵۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی) و ۷ وهله (هر وهله شامل ۴ دقیقه با شدت ۸۰ تا ۹۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی و ۳ دقیقه با شدت ۶۵ تا ۷۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی) و یک دقیقه سرد کردن انجام شد (۱۶).

هسته انگور با نانوذره کتوزان: هسته انگور از شرکت سیگما به صورت خالص شده تهیه گردید و در DMSO حل شد. پس از تهیه مکمل به صورت نانوذره، به میزان ۱۵۰ میلی گرم روزانه به گروه‌های مکمل گاواژ شد (۱۷).

بافت برداری: ۷۲ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و در وضعیت ناشتایی موش‌های صحرایی به وسیله ترکیبی از کتامین (۷۰ میلی گرم/کیلوگرم) و زایلوزین (۱۰ میلی گرم/کیلوگرم) بیهوش شدند و بافت قلب آن‌ها برداشته شد و بلافاصله پس از شستشو با محلول سالین در تیوپ‌های مخصوص قرار گرفت و در درنیتروژن مایع منجمد شدند تا به آزمایشگاه منتقل شوند.

اندازه گیری بیان ژن: برای بررسی مولکولی در سطح بیان ژن، ابتدا RNA مطابق با برنامه شرکت کیان ژن آلمان صورت پذیرفت. ابتدا ۲۰۰ لاندا کیازول به نمونه‌ها اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۸۰- انکوبه شد. پلاک در کرایوتیوب در حالت نیمه انجماد خرد شد و به منظور لیز کردن نمونه‌ها میزان ۱۰۰ لاندا کلروفرم به مدت ۱ دقیقه اضافه شد. محلول دست آماده با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع شفاف بالای لوله که حاوی RNA بود به آرامی برداشته شد و در یک میکروتیوب DEPC قرار داده شد. ۱ سی سی ایزوپروپانول بر RNA شفاف ریخته شد و به مدت ۱ دقیقه با دست مخلوط شد. نمونه‌ها در سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. مایع رویی دور ریخته شد و بر روی رسوب آن ۱ سی سی الکل ۷۰ درصد اضافه شد. پس از Vortex شدن، مخلوط در سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۷۵۰۰ قرار داده شد. مایع رویی خارج شد و پلاک داخل میکروتیوب خشک شد. میزان ۲۰ لاندا آب مقطر ۶۰ درجه بر روی پلاک اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه بر روی صفحه‌ی ۶۰ درجه قرار گرفت. پس از استخراج RNA با میزان خلوص و غلظت بالا از تمامی نمونه‌های مورد مطالعه، مراحل سنتز cDNA مطاق با شرکت سازنده (فرمنتاز آمریکا) صورت گرفت و سپس cDNA سنتز شد و جهت انجام واکنش رونویسی معکوس مورد استفاده قرار گرفت. سطوح بیان Bax و Bcl2 بافت قلب از روش کمی Real time-Pcr صورت گرفت. طراحی پرایمرها بر اساس اطلاعات ژن های Bax و Bcl2 در بانک ژنی NCBI و توسط شرکت ماکروژن صورت گرفت. ژن گلیسرآلدهید-۳-فسفات دهیدروژناز (GAPDH) به عنوان ژن کنترل مورد استفاده قرار گرفت و برای تعیین اندازه بیان ژنی از فرمول 2 -ΔΔCT استفاده شد. توالی پرایمرهای ژن‌های مورد استفاده درجدول ۱ نشان داده شده است.

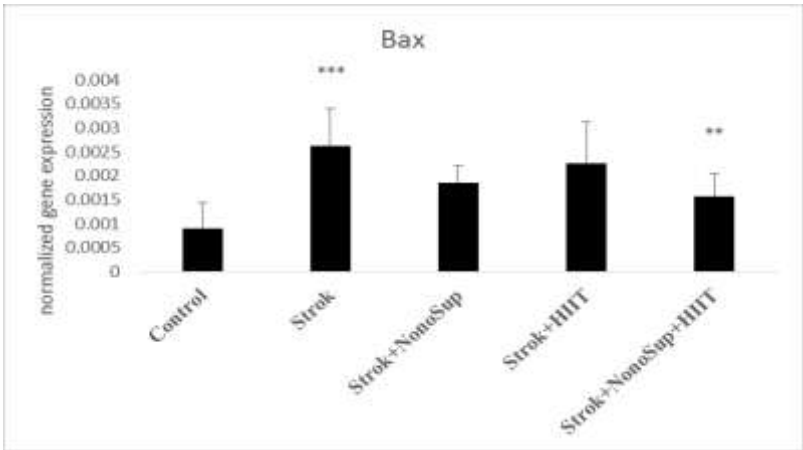
آنالیز آماری: داده با استفاده از آمار توصیفی (میانگین و انحراف استاندارد) بیان شدند. باتوجه به اینکه آزمون شاپیروویلک نشان داد داده ها از توزیع طبیعی برخوردارند، بنابراین برای بررسی تفاوت بین گروه‌ها از آمار پارامتریک استفاده شد از اینرو تفاوت بین گروه‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی مشخص شد (P≤۰/۰۵).

یافته ها

سطوح بیان ژنی BAX و Bcl2 بافت قلبی در شکل ۱ ارائه داده شده است. نتایج آزمون آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد تفاوت معنی داری در سطوح بیان ژنی BAX و Bcl2 بافت قلبی موش های صحرایی گروه های مختلف تحقیق وجود دارد (P≤۰/۰۵). نتایج آزمون تعقیبی توکی حاضر نشان داد که در گروه سکته قلبی میزان mRNA BAX نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌دار داشت (P=۰/۰۰۱) در حالی که سایر گروه‌های سکته‌ای با مداخله ورزش و نانو هسته انگور (به صورت جداگانه) نسبت به گروه کنترل سکته تغییرات معنی‌داری نشان ندادند (P>۰/۰۵) با این وجود میزان Bax در گروه تمرین همراه با هسته انگور نسبت به گروه سکته قلبی کاهش معنی‌داری نشان داد (P=۰/۰۱) (شکل ۱). همچنین میزان mRNA Bcl2 در گروه سکته قلبی نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار داشت (P=۰/۰۰۱) در حالی که سایر گروه‌های سکته‌ای با مداخله ورزش و نانو هسته انگور (به صورت جداگانه) نسبت به گروه کنترل سکته تغییرات معنی‌داری نشان ندادند (P>۰/۰۵) با این وجود میزان Bcl2 در گروه تمرین همراه با هسته انگور نسبت به گروه سکته قلبی افزایش معنی داری نشان داد (P=۰/۰۱) (شکل ۲).

جدول ۱. توالی پرایمرهای تحقیق حاضر

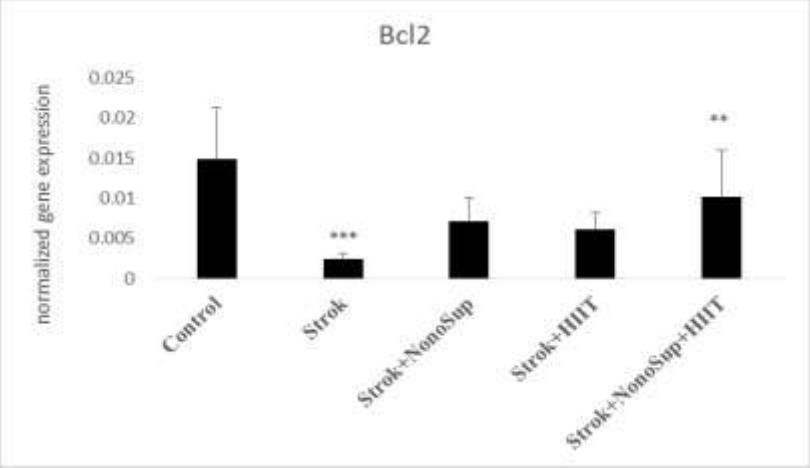
Gene name	Oligo sequence 5'-3'
Bax	F 5' AAGTGATGGAGATGAAGGAGT 3' R 5' CAGGCGTGAATGATGAAGAGT 3'
Bcl2	F 5' AGC CAG ATG CTG TCC CAT AC 3' R 5' CAG GAG ACA AAA CCT GGG AA3'
GAPDH	F 5' AAG TTCAACGGCACAGTC AAGGCAC C 3' R 5' CAT ACTCAGCACCAGCATCACCAAG G 3'



***P≤۰/۰۰۱ افزایش معنی دار نسبت به گروه Control

** P≤۰/۰۱ کاهش معنی دار نسبت به گروه Strok

شکل ۱. سطوح بیان ژنی Bax در گروه‌های مختلف پژوهش (داده ها به صورت میانگین± انحراف استاندارد نشان داده شده است)



***p≤۰/۰۰۱ ، کاهش معنی دار نسبت به گروه Control

** p≤۰/۰۱ ، افزایش معنی دار نسبت به گروه Strok

شکل ۲. سطوح بیان ژنی Bcl2 در گروه‌های مختلف پژوهش (داده ها به صورت میانگین± انحراف استاندارد نشان داده شده است)

بحث و بررسی

نتایج پژوهش نشان داد که ۸ هفته تمرین هوازی تناوبی به همراه نانو ذره هسته انگور باعث افزایش معنی‌دار پروتئین ضد آپوپتوزی Bcl2 شد و همچنین پروتئین Bax نیز به طور معنی‌داری کاهش یافت. هم راستا با پژوهش حاضر قجری و همکاران نشان دادند که هشت هفته تمرین استقامتی باعث افزایش معنی‌دار Bcl2 بافت قلبی موش‌های صحرایی شده و همچنین بیان Bax کاهش یافت (۱۸).

همچنین هم و همکاران[1] بیان کردند که تمرین هوازی به طور معنی-داری بیان ژن ضد آپوپتوزی (Bcl2) را افزایش داده، سبب کاهش بیان پروتئین آپوپتوزی (Bax) می‌شود. گزارش لی و همکاران[2] نیز نشان داد که شش هفته تمرین هوازی روی نوارگردان باعث کاهش مقادیر Bax بافت قلبی در موش‌های صحرایی می‌شود (۶). بر اساس پژوهش‌های موجود دو پروتئین Bax و Bcl2 نقش موثرتری در تعدیل فرآیندهای مرگ سلولی بازی می‌کنند. اعضای خانواده‌ی Bcl2 مسیرهای درگیر در تحریک فرایندهای آپوپتوز را کنترل می-کنند. بنابراین هر عاملی که سبب تغییر نسبتBax به Bcl2 و یا بالعکس شود، محیط را به سمت آپوپتوز و یا ضد آپوپتوز سوق می‌دهد (۱۹ و ۲۰). در حالت طبیعی بین عوامل مهاری و محرک‌های آپوپتوز تعادل برقرار است اما همواره در موقعیت‌های فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی این تعادل بهم می‌خورد که یکی از این موقیت‌ها فعالیت بدنی می‌باشد. احتمال می‌رود فعالیت‌های ورزشی با تاثیر بر مهم‌ترین عوامل موثر برفرآیند آپوپتوز بتواند باعث جلوگیری از مرگ سلولی شود (۲۱). فعالیت ورزشی منظم باعث افزایش پروتئین Bcl2 عضله قلبی شده و نسبت Bax به Bcl2 را به سوی یک محیط ضد آپوپتوزی تغییر می‌دهد. چندین سازوکار برای اثرات محافظتی تمرینات استقامتی بر آپوپتوز عضله قلبی مطرح شده است، مانند افزایش گردش خون شریان کرونری، بیان پروتئین‌های استرس شبکه آندوپلاسمی، افزایش فعالیت سیکلو اکسیژناز ۲، القای پروتئین‌های شوک گرمایی (Hsp70، Hsp72 ، Hsp9o،) افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی سیتوزولی میوکارد، افزایش پیام رسانی نیتریک اکساید، تغییر فنوتیپ میتوکندریایی، تغییر و افزایش کانال‌های پتاسیم حساس به ATP سارکولمایی و غشای میتوکندریایی (۲۲). علاوه بر این، فعالسازی پروتئین Bax سبب افزایش قابلیت نفوذ غشای میتوکندریایی می‌شود. یکی از جنبه‌های مهم زیستی میتوکندری، نقشی است که این ارگان در آپوپتوز ایفا می‌کند (۶ و ۲۲). میتوکندری جزء لاینفک مسیر داخلی آپوپتوز و محلّ استقرار بسیاری از پروتئین-های درگیر در مراحل اولیه این فرآیند از جمله اعضای خانواده Bcl2 می‌باشد. به نظر می‌رسد در این پژوهش عملکرد میتوکندری با افزایش مقادیر Bcl2 به عنوان مهمترین عامل مهاری آپوپتوز بهبود یافته است (۲۳). عمده ترین نقش میتوکندری در مسیر آپوپتوز، مهار رهاسازی سیتوکروم C به درون سیتوزول می‌باشد که منجر به افزایش پتانسیل غشای میتوکندری شده است. این پتانسیل برای تولید انرژی ATP و حفظ هومئوستاز سلولی ضروری است (۲۱). علاوه بر مهار رهاسازی سیتوکروم- C، فعالیت‌های بدنی با کاهش ROSدر میتوکندری‌ها در کاهش آپوپتوز قلب نقش دارند و نسبت پروتئین‌های پرو و ضدآپوپتوزی (نسبت Bax به Bcl2(، کنترل یکپارچگی سلول‌های چند هسته ای Myonuclei و بقای سلول را کنترل و نفوذپذیری غشای میتوکندری و فعالسازی کاسپازها را تنظیم می‌کنند (۲۲). نسبت Bax به Bcl2 شاخصی برای نشان دادن پتانسیل آپوپتوز میتوکندریایی می‌باشد که Bcl2 با فعالیت پیش آپوپتوزی Bax به وسیله‌ی جلوگیری از جابه جایی آن در میتوکندری مخالفت می‌کند (۲۱). ورود Bax به میتوکندری و رهایش سیتوکروم Cباعث شروع پیام رسانی آپوپتوتیک آبشارهای کاسپاز پایین دستی می‌شود. همراستا با این نتایج کواک و همکاران[3] در پژوهشی نشان دادند که تمرینات ورزشی باعث کاهش نسبت Bax به Bcl2 در بطن چپ می‌شود (۲۴). با این وجود لیو و همکاران[4] نشان دادند که ۹ هفته تمرین استقامتی موجب افزایش معنی‌دار نسبت Bax به Bcl2 در عضلات اسکلتی موش‌های صحرایی می‌شود (۲۵). شاید تفاوت در پارامترهای تمرینی مثل شدت، مدت، نوع تمرین و همچنین بافت مورد بررسی باعث مغایرت در نتایج شود. نتایج مطالعات چنین بیان نموده اند که عصاره هسته انگور به عنوان یک ماده آنتی اکسیدان می‌تواند با کاهش میزان استرس اکسیداتیو و بالا بردن دفاع آنتی اکسیدانی به طور معنی‌داری از آسیب سلول‌های قلبی در کاردیومیوپاتی دیابتی پیشگیری نماید (۱۳). پلی فنل‌های موجود در عصاره هسته انگور شامل فلاوینوئیدها، اسید گالیک و دیمریک، مونومریک و پلی مریک پروآنتوسیانیدین می‌باشند. پروآنتوسیانیدین دیمر موجود در هسته انگور موثرترین ترکیب آنتی اکسیدان می‌باشد. مطالعات نشان می‌دهد که عصاره هسته انگور دارای پتانسیل بالایی در از بین بردن رادیکال‌های آزاد و مهار استرس اکسیداتیو بوده و در موارد انفارکتوس قلبی و ایسکمی برقرار مجدد گردش خون بافتی[5]، نقش مهاری آن در برابر استرس اکسیداتیو به اثبات رسیده است (۲۶). توانایی پروسیانیدین درالقای آپوپتوز از طریق افزایش بیان فاکتور پروآپوپتوزی Bax و مهار کننده‌های پروتئین دخیل در چرخه سلولی و همچنین کاهش بیان فاکتورهای ضد آپوپتوزی Bcl2 و Bcl-xl در آپوپتوز مورد تایید قرار گرفته است (۲۳). نتایج مطالعه‌ای نشان داد پروآنتوسیانیدین باعث بهبود عملکرد قلبی- عروقی در مدل موش ایسکمی شد (۲۷). در سطح سلولی برای بروز بیماری‌های قلبی- عروقی عوامل متعددی مورد بررسی قرار گرفته‌اند که از جمله آن‌ها می‌توان به مسیرهای پیام رسانی استرس اکسایشی و اختلالات میتوکندریایی، عوامل التهابی- ایمنی و آپوپتوز اشاره کرد. با این حال مکانیسم‌های زمینه ساز این تاثیرات نامشخص بوده و نیازمند تحقیقات بیشتری است. بهبود عملکرد میتوکندری در اثر سازگاری با تمرین تناوبی و مصرف عصاره هسته انگوز باعث القاء عوامل بالا دستی در افزایش تولید Bcl-2 شده که در نتیجه آن کاهش بیان ژن محرک آپوپتوز از جمله Bax، کاسپاز ۹ و ۳ و در نتیجه کاهش آسیب به بافت قلب و حفظ بهتر عملکرد سلول‌های قلبی و افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی می‌باشد (۶ و ۲۷).

[1] Ham et al
[2] Li et al
[3] Kwak et al
[4] Liu et al
[5] Ischemic reperfusion

نتیجه گیری

به طور کلی نتایج پژوهش حاضر نشان دادند که ۸ هفته تمرین هوازی تناوبی همراه با استفاده از مکمل هسته انگور با نانوذره کتوزان باعث افزایش معنی‌دار پروتئین ضد آپوپتوزی Bcl2 شده و پروتئین آپوپتوزی Bax کاهش معنی‌دار داشت که تایید دیگری بر کاهش میزان آپوپتوز و افزایش بقای سلول‌های سالم در بافت قلب موش‌های صحرایی به دنبال تمرین هوازی و مکمل نانو ذره هسته انگور می-باشد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

مطالعه حاضر در کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان) با کد اخلاق (IR.IAU.KHUISF.REC.1399.045) مصوب شده است.

حامی مالی

دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان).

مشارکت نویسندگان

طراحی و ایده پردازی: خسرو جلالی دهکردی، غلامرضا شریفی؛ روش شناسی و تحلیل داده ها: حمید محمدی حسین آبادی؛ نظارت و نگارش نهایی: خسرو جلالی دهکردی، غلامرضا شریفی و حمید محمدی حسین آبادی.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان مقاله حاضر فاقد هرگونه تعارض منافع بوده است.

References

1. Iemitsu M, Maeda S, Jesmin S, Otsuki T, Kasuya Y, Miyauchi T. Activation pattern of MAPK signaling in the hearts of trained and untrained rats following a single bout of exercise. J Appl Physiol. 2006; 101 (1): 151-63. [DOI:10.1152/japplphysiol.00392.2005] [PMID:16484365]

2. Galang N, Sasaki H, Maulik N. Apoptotic cell death during ischemia/reperfusion and its attenuation by antioxidant therapy. Toxicology. 2000; 148 (2-3): 111- 8. [DOI:10.1016/s0300-483x(00)00201-8] [PMID:10962129]

3. Pendergrass KD, Varghese ST, Maiellaro-Rafferty K, Brown ME, Taylor WR, Davis ME. Temporal effects of catalase overexpression on healing after myocardial infarction. Circulation. 2011; 4 (1): 98- 106. [DOI:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.110.957712] [PMCID:PMC3076122]

4. Takemura G, Kanoh M, Minatoguchi S, Fujiwara H. Cardiomyocyte apoptosis in the failing heart—a critical review from definition and classification of cell death. Int J Cardiol. 2013; 167 (6): 2373- 86. [DOI:10.1016/j.ijcard.2013.01.163] [PMID:23498286]

5. Gross A. BCL-2 family proteins as regulators of mitochondria metabolism. Biochimica et Biophysica Acta. 2016; 1857 (8): 1243- 6. [DOI:10.1016/j.bbabio.2016.01.017] [PMID:26827940]

6. Lee S-D, Kuo W-W, Wu C-H, Lin Y-M, Lin JA, Lu M-C, et al. Effects of short-and long-term hypobaric hypoxia on Bcl2 family in rat heart. Int J Cardiol. 2006; 108 (3): 376-84. [DOI:10.1016/j.ijcard.2005.05.046] [PMID:16005992]

7. 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. 2008; 105 (6): 1934- 43. [DOI:10.1152/japplphysiol.00037.2008] [PMCID:PMC2612474]

8. Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. Aging. 2012; 4 (5): 330. [DOI:10.18632/aging.100459] [PMCID:PMC3384434]

9. Tekin D, Xi L, Kukreja RC. Genetic deletion of fas receptors or Fas ligands does not reduce infarct size after acute global ischemia-reperfusion in isolated mouse heart. Cell Biochem Biophys. 2006; 44 (1): 111-7. [DOI:10.1385/CBB:44:1:111] [PMID:16456239]

10. Jafari A, Pourrazi H, Nikookheslat S, Baradaran B. Effect of exercise training on Bcl-2 and bax gene expression in the rat heart. Gene Cell Tissue. 2015; 2 (4): e60174. [DOI:10.17795/gct-32833]

11. Cury-Boaventura MF, Levada-Pires AC, Folador A, Gorjão R, Alba-Loureiro TC, Hirabara SM, et al. Effects of exercise on leukocyte death: prevention by hydrolyzed whey protein enriched with glutamine dipeptide. Eur J Appl Physiol. 2008; 103 (3):

289- 94. [DOI:10.1007/s00421-008-0702-1] [PMID:18320208]
12. McMillan EM, Graham DA, Rush JW, Quadrilatero J. Decreased DNA fragmentation and apoptotic signaling in soleus muscle of hypertensive rats following 6 weeks of treadmill training. J Appl Physiol. 2012; 113 (7): 1048- 57. [DOI:10.1152/japplphysiol.00290.2012] [PMID:22858629]
13. Du Y, Guo H, Lou H. Grape seed polyphenols protect cardiac cells from apoptosis via induction of endogenous antioxidant enzymes. J Agricul Food Chem. 2007; 55 (5): 1695- 701. [DOI:10.1021/jf063071b] [PMID:17295515]
14. Zhang F-l, Gao H-q, Wu J-m, Ma Y-b, You B-a, Li B-y, et al. Selective inhibition by grape seed proanthocyanidin extracts of cell adhesion molecule expression induced by advanced glycation end products in endothelial cells. J Cardiovas Pharmacol. 2006; 48 (2): 47- 53. [DOI:10.1097/01.fjc.0000242058.72471.0c] [PMID:16954821]
15. Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen Ø. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. Eur J Cardiovas Prev Rehabil. 2007; 14 (6): 753-60. [DOI:10.1097/HJR.0b013e3281eacef1] [PMID:18043295]
16. Jiang H-K, Wang Y-H, Sun L, He X, Zhao M, Feng Z-H, et al. Aerobic interval training attenuates mitochondrial dysfunction in rats post-myocardial infarction: roles of mitochondrial network dynamics. Int J Mol Sci. 2014; 15 (4): 5304- 22. [DOI:10.3390/ijms15045304] [PMCID:PMC4013565]
17. Llópiz N, Puiggròs F, Céspedes E, Arola L, Ardévol A, Bladé C, et al. Antigenotoxic effect of grape seed procyanidin extract in Fao cells submitted to oxidative stress. J Agricul Food Chem. 2004; 52 (5): 1083- 7. [DOI:10.1021/jf0350313] [PMID:14995102]
18. Ghajari H, Hosseini SA, Farsi S. The effect of endurance training along with cadmium consumption on Bcl-2 and Bax gene expressions in heart tissue of rats. Ann Mil Health Sci Res. 2019; 17 (1): e86795. [DOI:10.5812/amh.86795]
19. Kazior Z, Willis SJ, Moberg M, Apró W, Calbet JA, Holmberg H-C, et al. Endurance exercise enhances the effect of strength training on muscle fiber size and protein expression of Akt and mTOR. PloS One. 2016; 11 (2): e0149082. [DOI:10.1371/journal.pone.0149082] [PMCID:PMC4757413]
20. Marzetti E, Calvani R, Bernabei R, Leeuwenburgh C. Apoptosis in skeletal myocytes: a potential target for interventions against sarcopenia and physical frailty–a mini-review. Gerontol. 2012; 58 (2): 99- 106. [DOI:10.1159/000330064] [PMCID:PMC7077073]
21. Koçtürk S, Kayatekin B, Resmi H, Açıkgöz O, Kaynak C, Özer E. The apoptotic response to strenuous exercise of the gastrocnemius and solues muscle fibers in rats. Eur J Appl Physiol. 2008; 102 (5): 515-24. [DOI:10.1007/s00421-007-0612-7] [PMID:18030491]
22. Soberanes S, Panduri V, Mutlu GM, Ghio A, Bundinger GS, Kamp DW. p53 mediates particulate matter–induced alveolar epithelial cell mitochondria-regulated apoptosis. Am J Respiratory Critical Care Med. 2006; 174 (11): 1229- 38. [DOI:10.1164/rccm.200602-203OC] [PMCID:PMC2648105]
23. Razavi M, Matin H, Azarbayjani MA. Effects of concurrent regular aerobic training and garlic extract on cardiac tissue apoptosis markers in aged rats with chronic kidney disease. J Med Plant. 2017. 16 (62): 46- 54. http://jmp.ir/article-1-1344-en.html
24. Kwak H-B. Effects of aging and exercise training on apoptosis in the heart. J Exer Rehabil. 2013; 9 (2): 212. [DOI:10.12965/jer.130002] [PMCID:PMC3836520]
25. Li F, Shi W, Zhao EY, Geng X, Li X, Peng C, et al. Enhanced apoptosis from early physical exercise rehabilitation following ischemic stroke. J Neurosci Rese. 2017; 95 (4): 1017- 24. [DOI:10.1002/jnr.23890] [PMID:27571707]
26. Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray SD, Kuszynski CA, et al. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. Toxicol. 2000; 148 (2-3): 187-

97. [DOI:10.1016/s0300-483x(00)00210-9] [PMID:10962138]
27. Pataki T, Bak I, Kovacs P, Bagchi D, Das DK, Tosaki A. Grape seed proanthocyanidins improved cardiac recovery during reperfusion after ischemia in isolated rat hearts. Am J Clin Nutr. 2002; 75 (5): 894- 9. [DOI:10.1093/ajcn/75.5.894] [PMID:11976164]