

Investigating the Effect of Endurance Training and Supplementation of *Persia Rosa* Extract on Mitochondrial Apoptosis of Myocardium

Imani A¹, Siahkoughian M*¹, Karimi P², Asgharpour-Arshad M³, Seifi-Ski-shahr F¹

1. Department of Physical Education and Sport Sciences, Faculty of Education and Psychology, Mohaghegh Ardabili University, Ardabil, Iran

2. Faculty of Medicine, Neuroscience Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

3. Department of Physical Education and Sport Sciences, Basic Sciences Education Center, Amin Police University, Tehran, Iran

* *Corresponding author*: Tel: +984533512803, Fax: +984533512803, E-mail: m_siahkohian@uma.ac.ir

Received: Apr 24, 2020

Accepted: Aug 20, 2020

ABSTRACT

Background & objectives: Physical training and some supplements through different mechanisms could be effective in reducing apoptosis; the aim of this study was to investigate the effect of endurance training and supplementation of *Persia Rosa* extract on mitochondrial apoptosis of myocardium.

Methods: In this experimental study, 52 male rats were randomly assigned into five homogeneous groups, three-month control, six months control, *Persia Rosa* supplement, endurance training and endurance training+*Persia Rosa*. Training groups participated in endurance training protocol for 12 weeks. The *Persia Rosa* and endurance training+*Persia Rosa* groups received 1 gram *Persia Rosa* extract per kg body weight. After the implementation of the training protocol and consumption of the extract, the surgical and cardiac tissue extraction procedures were performed. The data were analyzed by ANOVA test and Bonferroni post hoc tests at the significant level of less than 5% using SPSS-22 software.

Results: The results showed that Bax/Bcl-2 ratio and Caspase-3 gene expression were significantly decreased in endurance training and endurance training+*Persia Rosa* groups to the control group ($p < 0.05$). Bax/Bcl-2 showed a significant decrease in the *Persia Rosa* supplement group ($p < 0.05$), but Caspase-3 was not significant in the *Persia Rosa* supplement group.

Conclusion: It is expected that the effect of endurance training with consumption of *Persia Rosa* extract on Bax/Bcl-2 ratio and Caspase-3 will provide a good platform for caspase mechanisms and apoptosis processes in the myocardium of rats.

Keywords: Myocardium; Bax to Bcl-2 Ratio; Caspase-3; *Persia Rosa*; Endurance Training

بررسی تاثیر تمرین استقامتی و مکمل عصاره گل محمدی بر آپوپتوزیس میتوکندریایی میوکاردا

آیلار ایمانی^۱، معرفت سیاه کوهیان^{۱*}، پوران کریمی^۲، مسعود اصغریور ارشد^۳، فرناز سیفی اسگ شهر^۱

۱. گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روانشناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۲. دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تبریز، تبریز، ایران

۳. گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، مرکز آموزش علوم پایه، دانشگاه علوم انتظامی امین، تهران، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۴۵۳۳۵۱۲۸۰۳ فاکس: ۰۴۵۳۳۵۱۲۸۰۳ پست الکترونیک: m_siahkohian@uma.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: تمرینات ورزشی و مصرف برخی مکمل‌ها می‌تواند در کاهش آپوپتوزیس مؤثر باشد. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر تمرین استقامتی و مکمل عصاره گل محمدی بر آپوپتوزیس میتوکندریایی میوکاردا بود.

روش کار: این مطالعه تجربی، روی ۵۲ سر موش نر ویستار انجام گردید که بصورت تصادفی در پنج گروه همگن کنترل سه ماهه، کنترل شش ماهه، گل محمدی، تمرین استقامتی و تمرین استقامتی + گل محمدی تقسیم شدند. گروه‌های تمرینی به مدت ۱۲ هفته در تمرین استقامتی شرکت نمودند. گروه عصاره گل محمدی و تمرین استقامتی + گل محمدی، به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، ۱ گرم عصاره گل محمدی دریافت کردند. پس از اجرای پروتکل تمرینی و مصرف عصاره، مراحل جراحی و استخراج بافت قلبی انجام شد. داده‌ها با استفاده از آزمون آنوا و تعقیبی بونفرونی در سطح معنی‌داری کمتر از ۵ درصد با نرم‌افزار SPSS-22 تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد نسبت Bax/Bcl-2 و Caspase-3 در گروه‌های تمرین استقامتی و تمرین استقامتی + گل محمدی کاهش معنی‌داری را در مقایسه با گروه کنترل داشته است ($p < 0.05$). Bax/Bcl-2 در گروه گل محمدی کاهش معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.05$)، اما Caspase-3 در گروه گل محمدی معنی‌دار نبود.

نتیجه‌گیری: انتظار می‌رود تمرین استقامتی با مکمل عصاره گل محمدی بر نسبت بیان ژن Bax به Bcl-2 و میزان بیان ژن Caspase-3، بستر مناسبی را بر سازوکارهای کاسپازی و فرآیند آپوپتوزیس در میوکاردا موش‌های صحرایی فراهم نماید.

واژه‌های کلیدی: میوکاردا، نسبت Bax به Bcl-2، Caspase-3، گل محمدی، تمرین استقامتی

پذیرش: ۱۳۹۹/۵/۳۰

دریافت: ۱۳۹۹/۲/۵

مقدمه

آپوپتوزیس باعث تغییر شکل مورفولوژیکی سلول، چروکیدگی حجم سلول و هسته آن و قطعه‌قطعه شدن DNA شده و در نهایت باعث تولید واکوئل‌های محتوی ذرات آپوپتوتیکی می‌شود [۳]. این فرآیند فیزیولوژیکی از طریق دو مسیر داخلی (از طریق میتوکندری) و خارجی (از طریق اتصال رسپتوری) رخ می‌دهد [۴]. رخدادهای مولکولی آپوپتوزیس اساساً

آپوپتوزیس یا مرگ فیزیولوژیک سلول یک فرآیند زیستی فعال و نوعی از مرگ برنامه‌ریزی شده سلول است [۱] که در تنظیم تعادل بین زایش و مرگ سلولی در بافت‌های مختلف بخصوص بافت‌های سوماتیک مانند مغز، عضله اسکلتی و میوکاردا نقش اساسی دارد و برای تکامل و همئوستاز بافتی ضروری است [۲].

به واسطه تعادل بین پروتئین‌های ویژه تنظیمی پیش و ضد آپوپتوزی مشخص می‌شود. در این بین پروتئین‌های Bcl-2 و Bax به عنوان پروتئین‌های اصلی در شکل‌گیری آپوپتوزیس و پیام‌های آپوپتوزیس میتو کندریایی درگیر می‌شوند [۵]. مطالعات نشان داده‌اند که پروتئین Bax با کاهش پایداری غشای بیرونی میتو کندری می‌تواند منتج به رهایش عوامل آپوپتوزی مانند سیتوکروم c از فضای بین غشایی شود [۶]. این در حالی است که پروتئین Bcl-2 با فعالیت پیش آپوپتوزی پروتئین Bax مخالفت کرده و موجب حفظ یکپارچگی غشای میتو کندری می‌شود [۷]. با توجه به این امر، افزایش نسبت Bax به Bcl-2 سلول را به سمت یک محیط آپوپتوزی تغییر می‌دهد. تمامی مسیرهای آپوپتوزیسی، نهایتاً منجر به فعال‌سازی کاسپاز-۳ [۸] و تجزیه پروتئین‌های حیاتی سلول می‌شود [۹، ۸، ۱]. علی‌رغم ضروری بودن آپوپتوزیس برای حفظ همئوستاز بافتی، هرگونه اختلال در روند آن منجر به بیماری می‌شود، با این حال پژوهشگران همواره به دنبال اتخاذ راهکارهای مناسب برای حمایت از میوکارد در مقابل آپوپتوزیس و آسیب‌های احتمالی مرتبط با آن هستند. نتایج مطالعات موجود حاکی است که میزان آپوپتوزیس اندک میوکارد (در حدود ۰/۰۰۱ الی ۰/۰۰۲) ممکن است در اثر عوامل درونی یا بیرونی مانند پرتوافکنی، ایسکمی/خون‌رسانی مجدد، داروهای مختلف، سالخورده‌گی و فشارهای جسمانی (مکانیکی- متابولیکی) تشدید پیدا کرده و از این طریق مقدمات بروز انواع بیماری‌های قلبی- عروقی را فراهم نماید [۱۱، ۱۰]. آپوپتوزیس پیش‌رونده در بافت پس‌میتوزی همچون قلب که قابلیت تکثیر سلولی ندارد، مهلک است چرا که از دست رفتن کاردیومیوسیت‌ها جایگزین نشدنی است [۱۱]. شواهد نشان می‌دهند که آپوپتوزیس میوکارد در نارسایی قلبی نقش دارد [۱۳، ۱۲]. قلب بافت انرژی‌خواهی است که نیازمند تولید مداوم ATP از طریق تنفس میتو کندریایی می‌باشد [۱۵، ۱۴].

در بافت‌های هوازی بالا همچون قلب، میتو کندری ۲۵ درصد حجم سلولی را در بر می‌گیرد [۱۶، ۱۴]. بنابراین روزانه حجم بیشتری از ROS بخصوص رادیکال‌های آزاد در حال تولید شدن هستند که باید از سلول رفع و تعدیل شوند. بطور طبیعی تعادل ظرفیتی میان تولید رادیکال‌های آزاد و مواد ضد اکسایشی در سیستم بیولوژیکی بدن وجود دارد، زیرا هر دوی این مواد برای تبدیل غذا به انرژی ضروری هستند؛ فعالیت ورزشی و بخصوص فعالیت ورزشی هوازی همانند برخی از بیماری‌ها می‌تواند این تعادل را در جهت تولید رادیکال‌های آزاد بیشتر متمایل کند [۱۷]. از طرفی تمرینات استقامتی منظم بلندمدت، توانایی سیستم‌های ضد اکسایشی بدن را افزایش داده و بدن را در مقابل خاصیت تخریب‌کنندگی گونه‌های فعال اکسیژن که در اثر فعالیت ورزشی افزایش می‌یابند، محافظت می‌کنند [۱۸]. در کنار آنتی‌اکسیدان‌های سلولی و فعالیت استقامتی منظم، احتمالاً بهره‌گرفتن از مکمل‌های گیاهی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا می‌تواند گزینه بهتری در کاهش استرس اکسیداتیو باشد. گل محمدی با نام علمی *Rosa damascene* Mill. از خانواده Rosaceae و از جنس *Rosa* بوده و عموماً به داماسک رز^۱ معروف می‌باشد [۱۹]. ترکیبات مختلفی از گل‌ها، گلبرگ‌ها و میوه‌های گل محمدی شامل گرانول، سیترنلول، فارینسول، نرول، لینالول، سیترال، ترپن‌ها، مایسرين، ویتامین C و بیوفلاونوئید (بزرگترین فنول‌های گیاهی) جدا شده است [۲۰]. این گیاه دارای خواص دارویی بوده که عمدتاً به ترکیبات فنولی آن‌ها نسبت داده می‌شود. ترکیبات فنولی این گیاه خواص دارویی زیادی مثل خاصیت آنتی‌اکسیدانی و از بین برنده رادیکال‌های آزاد (کاهنده آپوپتوزیس القاشده از طریق رادیکال‌های آزاد)، ضد التهاب و ضد افسردگی را دارند [۲۰]. همچنین گل محمدی حاوی مقادیر بالایی از ویتامین C که یک حمل‌کننده

¹ Damask Rose

در پژوهشی اثر تمرین منظم تناوبی پرشدت بر میزان سطوح مغزی Bax و Bcl-2 بررسی شد. آزمودنی‌ها ۱۰ دوره تمرین تناوبی پرشدت دویدن روی نوارگردان با سرعت ۲۰-۳۴ متر در دقیقه به مدت ۱ دقیقه و همراه با ۲ دقیقه استراحت بین دورها، ۳ روز در هفته و به مدت ۸ هفته اجرا نمودند. نتایج نشان داد که ۸ هفته تمرین تناوبی پرشدت موجب کاهش سطوح مغزی Bax در موش‌های صحرایی و باعث افزایش معنی‌دار سطوح مغزی Bcl-2 در موش‌های گروه تمرین می‌شود. ممکن است تمرینات تناوبی پرشدت بخشی از اثرات حفاظتی خود را در مقابل با آپوپتوزیس ناشی از پیری به واسطه افزایش پروتئین ضدآپوپتوتیک Bcl-2 و سرکوب پروتئین پروآپوپتوتیک Bax در مغز میانجی‌گری نماید [۲۱].

در پژوهشی با اثر ترکیبی تمرین هوازی منظم و مصرف عصاره سیر بر برخی از فاکتورهای تنظیمی آپوپتوزیس کلیوی در رت‌های پیر مبتلا به بیماری مزمن کلیوی عنوان شد که برنامه تمرینی شنا شامل ۳ روز در هفته، روزی ۳۰ دقیقه برای مدت ۸ هفته می‌تواند به تنهایی و با مداخله ترکیبی مصرف عصاره سیر سطوح کلیوی Bax و Bcl-2 را که در بیماری مزمن کلیوی به ترتیب افزایش و کاهش می‌یابند، معکوس نماید [۲۵].

در پژوهشی محققین اشاره کردند که فعالیت ورزشی روی نوارگردان، آپوپتوزیس میوکاردی موش‌ها را با افزایش پروتئین شوک گرمایی ۷۰ و متعاقب آن اثر کاهشی روی Bax و اثر افزایشی روی Bcl-2، فرآیند آپوپتوزیس را در پروسه پیری کاهش می‌دهد [۲۶].

در پژوهش دیگری با عنوان ۶ هفته تمرین ورزشی نوارگردان قطعه قطعه شدن DNA و سیگنالینگ آپوپتوزیس را در عضله نعلی رت‌های پرفشارخون کاهش می‌دهد، نشان داده شد که تمرین ورزشی استقامتی منظم (سرعت ۲۱ متر در دقیقه با شیب ۴/۵ درصد، ۴۵ دقیقه در روز، پنج روز در هفته، با

الکترون و آنتی‌اکسیدان قوی است، می‌باشد [۲۱]. ضداکسایش‌های بیولوژیکی غیرآنزیمی همچون ویتامین C، نقشی حیاتی در محافظت سلول‌ها از فشار اکسایشی ناشی از وضعیت‌های فعالیت ورزشی ایفا می‌کنند [۲۱].

در رابطه با آپوپتوزیس و فعالیت ورزشی، محققین اثر تمرین منظم تناوبی پرشدت را بر میزان سطوح مغزی Bax و Bcl-2 بررسی کردند. نتایج نشان داد که ۸ هفته تمرین تناوبی پرشدت موجب کاهش سطوح مغزی Bax در موش‌های صحرایی شد ($p < 0.05$) و باعث افزایش معنی‌دار سطوح مغزی Bcl-2 در موش‌های گروه تمرین می‌شود ($p < 0.05$) [۲۲]. در تحقیقی تأثیر تمرینات تناوبی فزاینده بر آپوپتوزیس قلب رت‌های جوان بررسی شد. نتایج ایمونوهیستوشیمی نشان داد ۶ هفته تمرین تناوبی فزاینده موجب افزایش ۲۰۰ و ۳۲۰ درصدی معنی‌دار ($p < 0.01$) آپوپتوز گروه تمرین در مقایسه با گروه کنترل شش هفته و گروه پایه شد [۲۳]. در پژوهشی با عنوان تأثیر تمرین ورزشی (۱۲ هفته تمرین هوازی؛ ۶۰ دقیقه در روز با سرعت ۲۷ متر در دقیقه) بر آپوپتوز میوکارد موش‌های صحرایی چاق گزارش کردند که میزان بیان و فعالیت پروتئین‌های کاسپاز-۹ و کاسپاز-۳ در موش‌های چاق تمرین کرده به‌طور معنی‌داری کمتر از موش‌های چاق تمرین نکرده بود [۱۴]. محققین پژوهشی را تحت عنوان، سیستم شبه‌افیونی قلبی ناشی از تمرین ورزشی آپوپتوزیس میتو‌کندریایی را در موش‌های چاق کاهش می‌دهد، بررسی کردند. نتایج نشان داد هر دو نوع تمرین باعث هایپرتروفی فیزیولوژیکی قلبی، بهبود فشارخون سیستولیک و شاخص‌های چاقی شده است؛ اما فقط تمرین با حجم ورزشی بالا باعث کم شدن افزایش توده بدنی شده است. همچنین گروه رژیم غذایی پرچرب، بیان پروانگفالین، ERK، PI3K و GSK-3 کمتر و بیان کاسپاز-۳ بیشتری نسبت به گروه کنترل نشان دادند [۲۴].

شدت ۶۰-۷۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی) شاخص‌های پیش‌آپوپتوزی (Bax, Caspase-3 و سیتوکروم c) را کاهش و آنتی‌آپوپتوزی (Bcl-2 و XL-I) را افزایش می‌دهد [۲۷]. محققان در پژوهشی تأثیر فعالیت ورزشی هوازی بر شاخص‌های آپوپتوزی و رشدی در قلب رت‌های پیر بررسی نمودند. براساس سرعت حداکثر به‌دست‌آمده، تمرین استقامتی به مدت شش هفته و پنج جلسه در هفته برای گروه‌های تمرینی طراحی شد. آن‌ها گزارش کردند که مقادیر بیان ژن Bax در گروه تمرین کم‌شدت نسبت به گروه کنترل افزایش غیرمعنی‌دار (۰/۲۶۱)، اما در گروه تمرین شدید افزایش معنی‌داری داشت (۰/۰۰۱). مقادیر بیان ژن Bcl-2 در گروه تمرین کم‌شدت (۰/۹۷۸) و شدید (۰/۲۷۸) نسبت به گروه کنترل افزایش غیرمعنی‌داری را نشان داد [۲۸].

در پژوهشی با هدف بررسی سازگاری درون‌عضلانی فعالیت ورزشی و برخی از مکمل‌ها (NAC^۱ و EGCG^۲) بر روی عضلات اسکلتی نمونه‌های انسانی گزارش کردند که فعالیت برون‌گرا باعث افزایش سطوح سیتوکروم c, Bax و کاسپاز-۳ در ۶ و ۸ ساعت بعد از فعالیت شده است [۲۹].

در پژوهشی دیگر، تأثیر دوازده هفته تمرین هوازی همراه با مکمل‌یاری عصاره گل سرخ بر بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹ عضله نعلی موش‌های صحرایی نر ارزیابی کردند. نتایج نشان داد که بیان ژن کاسپاز ۳ و ۹ در عضله نعلی گروه‌های تمرین هوازی و عصاره گل سرخ و گروه ترکیبی نسبت به گروه کنترل شش ماهه و سه ماهه بیان کمتری داشته‌اند. با توجه به نتایج، احتمالاً با استفاده از تمرینات هوازی و عصاره گل سرخ می‌توان میزان آپوپتوز سلولی را با کاهش بیان ژن کاسپاز ۳ و ۹ کاهش داده و روند ضعف عضلات بدن را نیز کند نمود [۳۰].

روش کار

حیوانات آزمایشگاهی

این مطالعه از نظر ماهیت از نوع کاربردی و از نظر شیوه از نوع مداخله‌ای در قالب یک طرح تجربی با گروه کنترل بود. با توجه به شرایط مناسب مدل حیوانی برای مطالعه حاضر، ۵۲ موش صحرایی نر دو ماهه ویستار ۱۴۸۴۸ از انستیتو پاستور ایران خریداری شد که پس از آشنایی با شرایط آزمایشگاه به پنج گروه (کنترل پایه سه ماهه، کنترل شش ماهه، مکمل

^۱ N-acetyl-Cysteine

^۲ Epigallocatechin Gallate

گل محمدی، تمرین استقامتی و ترکیبی (تمرین و مکمل) تقسیم شدند. در مراحل مختلف پژوهش، ضمن رعایت مسائل اخلاقی، مطابق دستورالعمل کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی مستخرج از دستورالعمل هلسینکی از هرگونه آزار جسمی و روش‌های غیرضروری کار با حیوانات اجتناب گردید (IR.ARUMS.REC.1397.205). جهت جلوگیری از استرس و تغییر شرایط فیزیولوژیکی، حیوانات مورد مطالعه به مدت دو هفته تحت شرایط استاندارد جدید با دمای (22 ± 2) درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی (50 ± 5) درصد و چرخه تاریکی به روشنایی ۱۲:۱۲ ساعته در حیوانخانه دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز نگهداری شدند. در طی این دوره، تمامی آزمودنی‌ها به صورت آزادانه از غذای استاندارد و آب استفاده می‌کردند و میزان غذای مصرفی روزانه آنها به صورت دقیق اندازه‌گیری و ثبت می‌شد. پس از دو هفته نگهداری آزمودنی‌ها در شرایط جدید، تعدادی از نمونه‌ها به مدت دو هفته تحت برنامه آشنایی با نحوه فعالیت روی نوارگردان الکترونیکی هوشمند حیوانی (ST008) ساخت دانشگاه تبریز قرار گرفتند. این نوارگردان دارای پنج کانال مجزا بود که همه آیت‌های مربوط به آن از قبیل مقدار شیب (مثبت و منفی)، سرعت و زمان توسط برنامه هوشمند کنترل می‌شد. در این دوره مقدار شوک الکتریکی به میزان ۰/۱ میلی‌ولت ثابت بود. در طی دوره آشنایی، شیب نوارگردان صفر درصد، سرعت ۱۰-۱۵ متر بر دقیقه و مدت تمرین ۵-۱۰ دقیقه در روز بود. در پایان این دوره، پس از مطابقت وزنی به طور تصادفی در پنج گروه همگن

کنترل پایه سه ماهه (۱۰ سر)، کنترل شش ماهه (۱۰ سر)، مکمل گل محمدی (۱۰ سر)، تمرین استقامتی (۱۱ سر) و تمرین استقامتی همراه با مصرف مکمل گل محمدی (۱۱ سر) تقسیم شدند.

پروتکل تمرین استقامتی

با توجه به همگن بودن وزن آزمودنی‌های دو گروه تمرین استقامتی و ترکیبی، کار فیزیکی انجام شده توسط آزمودنی‌های هر دو گروه در ابتدای جلسه تمرین، ۵ دقیقه با سرعت ۱۰-۱۵ متر در دقیقه و شیب صفر درجه، جهت گرم کردن می‌دویدند و شیب سرعت نوارگردان به صورت تدریجی افزایش می‌یافت تا به مقدار مورد نظر برسد. در انتهای برنامه تمرینی برای سرد کردن آزمودنی‌ها، شیب دستگاه به صفر درجه برگشته و سرعت نوارگردان نیز طی مدت ۵ دقیقه به آرامی به ۱۰-۱۵ متر در دقیقه می‌رسید. مدت مرحله سرد کردن در هفته‌های ابتدایی حدود ۵ دقیقه و در هفته‌های پایانی حدود ۱۰ دقیقه طول کشید. کل برنامه تمرینی روی نوارگردان با شیب ۱۵ درصد و در طی چرخه تاریکی به انجام رسید. پروتکل تمرینی پژوهش حاضر، بر اساس مطالعه نشیو و همکاران (۲۰۰۱) طراحی گردید [۳۴]. آنها با توجه به دسترسی به امکانات لازم، پس از برآورد حداکثر اکسیژن مصرفی موش‌های صحرائی، شدت فعالیت را بر اساس سرعت و شیب نوارگردان برای هر هفته تمرینی مشخص کردند. بر این اساس، سوپه، جنس، سن و وزن تقریبی آزمودنی‌های پژوهش حاضر نیز با مطالعه مذکور مطابقت داده شد. برنامه ۱۲ هفته تمرین استقامتی در جدول ۱ گزارش شده است.

جدول ۱. برنامه ۱۲ هفته تمرین استقامتی مورد استفاده در پژوهش با شدتی معادل ۸۰-۷۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی (۵ جلسه در هفته)

هفته‌های تمرین استقامتی											
اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم	هفتم	هشتم	نهم	دهم	یازدهم	دوازدهم
سرعت نوارگردان (متر در دقیقه)	۲۴	۲۴	۲۵	۲۶	۲۷	۲۸	۲۹	۳۰	۳۱	۳۲	۳۳
شیب نوارگردان (درصد)	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵
مدت زمان تمرین (دقیقه در روز)	۱۰	۲۰	۳۵	۴۵	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰

روش عصاره‌گیری بدین صورت بود که نمونه خشک‌شده گیاه گل محمدی توسط دستگاه خردکننده پودر شد. مقدار ۱۰۰ گرم از پودر گیاه گل محمدی درون ارلن یک لیتری ریخته شد و به آن الکل اتیلیک ۹۶ درصد و آب مقطر به نسبت ۱ به ۱ اضافه گردید، به گونه ای که به حجم برسد. بعد از ۲۴ ساعت محلول صاف شده و توسط دستگاه تقطیر در خلأ در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت چرخش ۷۰ دور در دقیقه تا ۱/۳ حجم اولیه تغلیظ گردید [۳۵]. گروه گل محمدی، به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن یک گرم (۰/۰۹) گرم گل محمدی + ۹ سی‌سی سالین) مکمل گل محمدی را هفته‌ای پنج روز از طریق گاوآژ دریافت نمودند. گروه تمرین استقامتی + گل محمدی نیز طبق روال گروه گل محمدی، مکمل را دریافت نموده و در برنامه تمرین استقامتی شرکت کردند.

تمامی موش‌های صحرایی، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه 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 سی‌سی) آن‌ها از قسمت سینوس چشمی و به وسیله لوله‌های موئینه هیپارینه جمع‌آوری شد. با توجه به هدف پژوهش حاضر، پس از جراحی بافت قلب آزمودنی‌ها برداشته و وزن کشی شد. سپس نمونه در کرایوتیوب در نیتروژن مایع قرار داده شده و برای بررسی‌های بعدی در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

برای استخراج RNA از نمونه‌ها، طبق روش پیشنهادی کیت (Thermo K0731, USA) و با اندکی تغییرات به شرح زیر عمل شد. حدود ۵۰ میلی‌گرم از بافت میوکاردا در حضور ۱ میلی‌لیتر محلول RNXTM-PLUS همورژنه شده و سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس به هر میکروتیوب ۰/۲ میلی‌لیتر کلروفورم افزوده شد و میکروتیوب به شدت با دست به مدت ۱۵ ثانیه تکان داده شده و ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه انکوبه گردید و در ادامه به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط ۴ درجه و ۱۳۷۰۰ g سانتریفیوژ شد. سپس به دقت و بدون تکان دادن تیوب، فاز روئی که حاوی RNA بود، جداسازی گردید و به میکروتیوب دیگر منتقل شده و به محلول جداشده حجم مساوی از ایزوپروپانول سرد اضافه گردید و برای ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه انکوبه شد. بعد از آن میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در شرایط ۴ درجه و ۱۳۷۰۰ g سانتریفیوژ شده، مایع روئی بیرون ریخته شده و سپس ۱ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد به میکروتیوب اضافه گردید. بلافاصله میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه در شرایط ۴ درجه و ۱۳۷۰۰ g سانتریفیوژ شده، مایع رویی بیرون ریخته شد و به دقت اتانول خالی شد و حدود ۲۰ دقیقه اجازه داده شد تا الکل تبخیر گردد. سپس مجدداً به هر میکروتیوب ۰/۰۲ میلی‌لیتر آب تیمارشده با دی‌اتیل‌پیروکربنات (DEPC) افزوده شد. RNA استخراج‌شده برای استفاده بعدی در دمای ۷۰- درجه نگهداری شد.

پایان پذیرفت و نمونه در فریزر ۷۰- درجه نگهداری شد.

Real-time PCR

برای اندازه گیری میزان بیان ژنی پروتئین‌های مورد نظر از دستگاه مربوطه Rotor Gene-6000 (Corbett., USA) استفاده شد. جفت پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از نرم‌افزار 3 Primer طراحی و توسط بایونیر (Bioneer., Germany) سنتز شده و برای کار با غلظت نهایی ۱۰۰nm مورد استفاده قرار گرفتند.

پرایمرها

واکنش‌ها بر مبنای استفاده از رنگ Syber Green انجام شد. رنگ Syber Green طی واکنش Real-time PCR به DNA دو رشته‌ای 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 گردید. 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^۱ بدست آمده از هر واکنش Real-time PCR بررسی شد تا پیک مربوط به ژن مورد نظر و فقدان پرایمر دایمر تایید شود. برای آنالیز داده‌ها ابتدا Ct ژن در هر نمونه از افتراق Ct ژن مربوطه و Ct ژن actin - به عنوان رفرنس محاسبه شد (جدول ۲). فرمول‌ها برای محاسبه به ترتیب زیر می‌باشد:

$$CT = CT_{\text{Target}} - CT_{\text{Reference}}$$

$$CT = CT_{\text{Test Sample}} - CT_{\text{Control Sample}}$$

^۱ Melting Curve

از کیت RevertAID TM First Standard cDNA Synthesis (Fermentas., Canada) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده بصورت زیر استفاده شد: ۱ میکرولیتر RNA و ۱ میکرولیتر از DNase I Reaction Buffer 10X در یک تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شده و توسط DEPC-Treated Water به حجم ۹ میکرولیتر رسید. ۱ میکرولیتر DNase به تیوب اضافه (برای از بین بردن آلودگی احتمالی با DNA) و پس از افزودن ۱ میلی‌لیتر از اتانول مطلق، تیوب مربوطه به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر ۷۰- درجه قرار گرفت. تیوب مربوطه به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط ۴ درجه و ۱۴۰۰g سانتریفیوژ شد و پس از آن، در زیر هود به دقت اتانول خالی شده و حدود ۱۰ دقیقه اجازه داده شد تا الکل تبخیر گردید. به تیوب مربوطه ۱۱ میکرولیتر DEPC-Treated Water و ۱ میکرولیتر Oligi (dt) Primer یا Random Hexamer Primer افزوده شد و ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه بر روی Dry Block انکوبه گردید. ۴ میکرولیتر Reaction Buffer 5X و ۲ میکرولیتر Ribolock dNTP 10mM mix و ۱ میکرولیتر Ribonuclease Transcription Inhibitor به تیوب افزوده شد و پس از سانتریفیوژ مختصر، به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه گردید. ۱ میکرولیتر RverertAID TM H Minus M-MuLV آنزیم Reverse به تیوب قبل افزوده شد. در ادامه در صورت استفاده از پرایمر Oligo (dt)، ۶ دقیقه در ۴۲ درجه و در صورت استفاده از Random Hexamer Primer، ابتدا ۵ دقیقه در ۲۵ درجه و به دنبال آن ۹۰ دقیقه در ۴۲ درجه انکوباسیون صورت گرفت. واکنش با قراردادن تیوب به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه

جدول ۲. توالی پرایمرها

Genes	Primer Sequence	Product length (bp)
Bcl2	F: 5'TATATGGCCCCAGCATGCGA3' R: 5'GGGCAGGTTTGTCTGACCTCA3	136
Bax	F:5'ATCCAAGACCAGGGTGGCTG3' R:5'CACAGTCCAAGGCAGTGGGA3'	150
Caspase3	F: 5'GGAGCTTGGAAACGGTACGCT3' R:5'AGTCCACTGACTTGCTCCCA3'	118
-actin	F: 5'CTCTGTGTGGATCGGTGGCT3' R:5'GCAGCTCAGTAACAGTCCGC3	138

آماري در سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ و با استفاده از نرم افزار SPSS-22 انجام شد.

یافته‌ها

میانگین ویژگی‌های فیزیکی موش‌های صحرایی شامل وزن بدن، وزن قلب و نسبت وزن قلب به وزن بدن آنها در جدول ۳ گزارش شده است.

ابتدا توزیع بهنجار توسط آزمون شاپیرو-ویلک مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین، برابری واریانس‌های گروه‌های مختلف در شاخص‌های اندازه‌گیری شده توسط آزمون لون بررسی شد. سپس داده‌های حاصله توسط آزمون آنوا و تعقیبی بونفرونی برای تعیین اختلاف میزان شاخص‌های مورد نظر بین گروه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفتند. تمامی محاسبات

جدول ۳. نتایج توصیفی مربوط به ویژگی‌های فیزیکی موش‌های صحرایی مورد مطالعه

ویژگی فیزیکی	گروه	تعداد	میانگین
وزن بدن (گرم)	کنترل شش ماهه	۱۰	۴۰۱/۱۸ ± ۱۴/۲۰
	تمرین استقامتی	۱۱	۳۳۹/۵۶ ± ۱۱/۴۸
	گل محمدی	۱۰	۳۹۳/۴۰ ± ۱۷/۳۰
	تمرین + گل محمدی	۱۱	۳۴۶/۶۸ ± ۷/۵۵
وزن قلب (گرم)	کنترل شش ماهه	۱۰	۱/۰۶ ± ۰/۰۷
	تمرین استقامتی	۱۱	۱/۰۸ ± ۰/۰۷
	گل محمدی	۱۰	۱/۱۲ ± ۰/۰۸
	تمرین + گل محمدی	۱۱	۱/۱۲ ± ۰/۰۶
نسبت وزن قلب به وزن بدن (گرم/کیلوگرم)	کنترل شش ماهه	۱۰	۲/۶۴ ± ۰/۱۷
	تمرین استقامتی	۱۱	۳/۱۸ ± ۰/۲۴
	گل محمدی	۱۰	۲/۸۶ ± ۰/۲۰
	تمرین + گل محمدی	۱۱	۳/۲۵ ± ۰/۲۱

نتایج آزمون آنوا نشان داد که اختلاف معنی داری بین نسبت بیان ژن Bax/Bcl-2 و Caspase-3 گروه‌های مختلف وجود دارد ($p=۰/۰۰۱$). میانگین و سطح معنی داری شاخص‌های مربوط به مسیر میتوکندریایی آپوپتوزیس میوکارد شامل نسبت بیان ژن Bax به Bcl-2 و میزان بیان ژن Caspase-3 در جدول ۴ گزارش شده است.

در این مطالعه، برای بررسی نرمال بودن داده‌ها، از آزمون شاپیرو-ویلک در گروه‌های مختلف استفاده گردید که با توجه به آن تفاوت معنی داری بین نمونه مورد مطالعه با جامعه تحقیق مربوطه دیده نشد. براساس نتایج مربوطه، داده‌ها از توزیع نرمال پیروی می‌کنند. همچنین در رابطه با بررسی واریانس‌ها، آزمون لون مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به نتایج این آزمون، واریانس‌ها در تمامی شاخص‌های مورد مطالعه برابر بود ($p=۰/۰۵$).

جدول ۴. نتایج آزمون آنوا مربوط به شاخص‌های آپوپتوزیس مورد مطالعه

شاخص	گروه	تعداد	میانگین	سطح معنی‌داری
Bax/Bcl-2	کنترل شش ماهه	۱۰	0.79 ± 0.24	/۰۰۱
	تمرین استقامتی	۱۱	0.19 ± 0.05	
	گل محمدی	۱۰	0.42 ± 0.08	
	تمرین + گل محمدی	۱۱	0.08 ± 0.02	
بیان ژن Caspase-3	کنترل شش ماهه	۱۰	1.75 ± 0.30	/۰۰۱
	تمرین استقامتی	۱۱	1.26 ± 0.24	
	گل محمدی	۱۰	1.53 ± 0.24	
	تمرین + گل محمدی	۱۱	0.93 ± 0.31	

تمرین استقامتی + مکمل گل محمدی ($p=0/001$) کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل شش‌ماهه داشته است که اختلاف میانگین این شاخص در گروه تمرین استقامتی + مکمل گل محمدی بیشتر از گروه تمرین استقامتی بوده است. همچنین بیان ژن Caspase-3 در میوکارد موش‌های صحرایی در گروه مکمل گل محمدی نسبت به گروه کنترل شش‌ماهه ($p=0/751$) کاهش داشته است، اما این کاهش از لحاظ آماری معنی‌دار نیست (جدول ۵).

آزمون تعقیبی بونفرونی حاکی از آن بود که نسبت بیان ژن Bax به Bcl-2 در میوکارد موش‌های صحرایی در سه گروه تمرین استقامتی ($p=0/001$)، مکمل گل محمدی ($p=0/004$) و تمرین استقامتی + مکمل گل محمدی ($p=0/001$) کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل شش‌ماهه داشته است. همچنین آزمون تعقیبی بونفرونی حاکی از آن است که بیان ژن Caspase-3 در میوکارد موش‌های صحرایی در گروه تمرین استقامتی ($p=0/002$) و

جدول ۵. نتایج آزمون بونفرونی مربوط به شاخص‌های آپوپتوزیس مورد مطالعه

شاخص	گروه‌ها	اختلاف میانگین	سطح معنی‌داری
تمرین استقامتی	کنترل شش‌ماهه	-۰/۵۹	/۰۰۱
	گل محمدی	-۰/۲۲	
	تمرین استقامتی + گل محمدی	۰/۱۰	
Bax/Bcl-2	کنترل شش‌ماهه	-۰/۳۷	/۰۰۴
	تمرین استقامتی	۰/۲۲	
	تمرین استقامتی + گل محمدی	۰/۳۳	
تمرین استقامتی + گل محمدی	کنترل شش‌ماهه	-۰/۷۰	/۰۰۱
	تمرین استقامتی	-۰/۱۰	
	گل محمدی	-۰/۳۳	
تمرین استقامتی	کنترل شش‌ماهه	-۰/۴۹	/۰۰۲
	گل محمدی	-۰/۲۶	
	تمرین استقامتی + گل محمدی	۰/۳۳	
بیان ژن Caspase-3	کنترل شش‌ماهه	-۰/۲۲	/۷۵۱
	تمرین استقامتی	۰/۲۶	
	تمرین استقامتی + گل محمدی	۰/۵۹	
تمرین استقامتی + گل محمدی	کنترل شش‌ماهه	-۰/۸۲	/۰۰۱
	تمرین استقامتی	-۰/۳۳	
	گل محمدی	-۰/۵۹	

بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین نسبت بیان ژن Bax به Bcl-2 و میزان بیان ژن Caspase-3 میوکارد موش‌های نر ویستار وجود دارد. در این راستا نتایج آزمون تعقیبی بونفرونی نشان داد که نسبت بیان ژن Bax به Bcl-2 در هر سه گروه تمرین استقامتی، گل محمدی و تمرین استقامتی+ گل محمدی دارای تفاوت معنی‌داری است. همچنین در رابطه با میزان بیان ژن Caspase-3، گروه تمرین استقامتی و گروه تمرین استقامتی+ گل محمدی کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل شش ماهه دارد. در رابطه با اثربخشی گل محمدی بر میزان بیان ژن Caspase-3 تأثیر معنی‌داری مشاهده نشد.

در تأیید نتایج پژوهش حاضر، در پژوهشی با عنوان ۶ هفته تمرین ورزشی نوارگردان قطعه قطعه شدن DNA و سیگنالینگ آپوپتوزیس را در عضله نعلی رت‌های پرفشارخون کاهش می‌دهد، نشان داده شد که تمرین استقامتی منظم (سرعت ۲۱ متر در دقیقه با شیب ۴/۵ درصد، ۴۵ دقیقه در روز، پنج روز در هفته، با شدت ۶۰-۷۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی) شاخص‌های پیش‌آپوپتوزی (Bax و سیتوکروم c) را کاهش و آنتی‌آپوپتوزی (Bcl-2 و XI-L) را افزایش می‌دهد [۲۷]. پروتئین‌های پیش‌آپوپتوزی مانند Bax با کاهش پایداری غشای بیرونی میتوکنندری می‌توانند منتج به رهائش عوامل آپوپتوزی از فضای بین غشایی شوند. این در حالی است که پروتئین‌های ضدآپوپتوزی خانواده Bcl-2 با فعالیت پیش‌آپوپتوزی پروتئین Bax مخالفت کرده و موجب حفظ یکپارچگی غشای میتوکنندری می‌شود. پروتئین Bcl-2، بر روی غشای داخلی میتوکنندری واقع شده و فعالیت Caspase-3 را مهار می‌کند. یکی از راه‌های توقف Caspase-3 توسط Bcl-2، مهار رهاسازی سیتوکروم c توسط میتوکنندری است که یک

کوفاکتور ضروری جهت فعال‌سازی Caspase-3 محسوب می‌شود و آپوپتوزیس نیازمند سنتز پروتئین تازه و RNA بوده و مهار سنتز آن توسط عواملی نظیر اکتینومايسين D انجام می‌شود. در پژوهشی دیگر، نشان داده شد که فعالیت ورزشی هوازی (۱۳ هفته، هر هفته ۶ جلسه، هر جلسه ۱ ساعت دویدن روی نوارگردان با سرعت تدریجی ۳-۱۸ متر بر دقیقه از روز اول تا آخر دوره تمرینی) بیان ژن و بیان پروتئین همه فاکتورهای ضدآپوپتوزی را در عضله قلبی افزایش می‌دهد [۳۶]. به نظر می‌رسد تمرین استقامتی باعث ایجاد سازگاری‌های آپوپتوتیکی در عضلات اسکلتی و قلبی می‌شود و از طریق تأثیر بر نفوذپذیری غشای میتوکنندری باعث کاهش آپوپتوزیس می‌گردد. همچنین به نظر می‌رسد تمرینات استقامتی بتوانند از طریق کنترل و بهبود فرآیند آپوپتوزیس، مانع از بین رفتن کاردیومیوسیت‌ها و نهایتاً مرگ سلولی سلول‌های قلبی شوند؛ چرا که جبران کاردیومیوسیت‌های از دست رفته تقریباً عملی نیست. محققین در پژوهشی، تعیین دو شیوه تمرینی تداومی و تناوبی هوازی بر آپوپتوزیس عضله نعلی موش‌های صحرائی نر را بررسی کردند. نتایج نشان داد که بین گروه‌های کنترل و تمرین در بیان ژن Bcl-2 و نسبت Bax به Bcl-2 تفاوت معنی‌داری وجود دارد. بیان ژن Bcl-2 گروه‌های تمرین بصورت معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود. نسبت Bax به Bcl-2 نیز در هر دو گروه تمرینی به صورت معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود. اما در بیان ژن Bax بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. به نظر می‌رسد ۱۲ هفته تمرین هوازی مخصوصاً از نوع تداومی تأثیر قابل توجهی بر افزایش پروتئین ضدآپوپتوزی میتوکندریایی عضله نعلی دارد. با این حال، با توجه به پایین بودن معنی‌داری نسبت Bax به Bcl-2 گروه‌های تمرین نسبت به گروه کنترل، اظهار نظر

قطعی در مورد تأیید تمرینات ورزشی بر شاخص‌های مربوط به آپوپتوز عضله اسکلتی، منوط به انجام مطالعات بیشتری می‌باشد [۳۷]. در تحقیقی، تأثیر فعالیت ورزشی هوازی بر شاخص‌های آپوپتوزی و رشدی در قلب رت‌های پیر بررسی شد. گزارش شد که مقادیر بیان ژن Bax در گروه تمرین کم‌شدت نسبت به گروه کنترل افزایش غیرمعنی‌دار (۰/۲۶۱)، اما در گروه تمرین شدید افزایش معنی‌داری داشت (۰/۰۰۱). مقادیر بیان ژن Bcl-2 در گروه تمرین کم‌شدت (۰/۹۷۸) و شدید (۰/۲۷۸) نسبت به گروه کنترل افزایش غیرمعنی‌داری را نشان داد. مقادیر IGF-1 در گروه تمرین کم‌شدت (۰/۱۷۵) و شدید (۰/۵۳۷) نسبت به گروه کنترل افزایش نشان داد، اما معنی‌دار نبود [۲۸]. در سال ۱۳۹۷، اثر تمرین منظم تناوبی پرشدت بر میزان سطوح مغزی Bax و Bcl-2 بررسی شد. نتایج نشان داد که ۸ هفته تمرین تناوبی پرشدت موجب کاهش سطوح مغزی Bax در موش‌های صحرایی شد (۰/۰۵) p و باعث افزایش معنی‌دار سطوح مغزی Bcl-2 در موش‌های گروه تمرین می‌شود (۰/۰۵) p [۲۱]. به نظر می‌رسد تمرینات تناوبی پرشدت بخشی از اثرات حفاظتی خود را در مقابل با آپوپتوزیس ناشی از پیری به واسطه افزایش پروتئین ضد آپوپتوتیک Bcl-2 و سرکوب پروتئین پرو آپوپتوتیک Bax در مغز میانجی‌گری نماید. در پژوهشی با عنوان تأثیر تمرین ورزشی (۱۲ هفته تمرین هوازی؛ ۶۰ دقیقه در روز با سرعت ۲۷ متر در دقیقه) بر آپوپتوز میوکارد موش‌های صحرایی چاق، گزارش شد که میزان بیان و فعالیت پروتئین‌های کاسپاز-۹ و کاسپاز-۳ در موش‌های چاق تمرین کرده به‌طور معنی‌داری کمتر از موش‌های چاق تمرین نکرده بود [۳۸]. در سال ۱۳۹۸، در پژوهشی تأثیر ۱۲ هفته تمرین هوازی همراه با مکمل‌یاری عصاره گل سرخ بر بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹ عضله نعلی موش‌های صحرایی نر ارزیابی شد. نتایج نشان داد، بیان ژن کاسپاز ۳ و ۹ در عضله نعلی گروه‌های

تمرین هوازی و عصاره گل سرخ و گروه ترکیبی (گل سرخ و تمرین هوازی) نسبت به گروه کنترل شش ماهه و سه ماهه کمتر بوده است. با توجه به نتایج، احتمالاً با استفاده از تمرینات هوازی و عصاره گل سرخ، می‌توان میزان آپوپتوز سلولی را با کاهش بیان ژن کاسپاز ۳ و ۹ کاهش داد و روند ضعف عضلات بدن را نیز کند نمود [۳۰].

در رابطه با اثرات گل محمدی نتایج برخی از مطالعات قبلی با پژوهش حاضر در تناقض بوده و برخی دیگر در راستای پژوهش حاضر می‌باشد. هرچند بیشتر مطالعات گذشته بدون اجرای فعالیت ورزشی بوده است. در تحقیقی اثر حفاظتی عصاره غنی از فلاونوئید گل محمدی بر آسیب ایسکمی-توزیع مجدد جریان خون مغزی ناشی از آپوپتوزیس و التهاب بررسی شد. نتایج نشان داد عصاره گل محمدی دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی بوده و بطور قابل توجهی قطعه‌قطعه‌شدن DNA را، در نتیجه تنظیم مثبت بیان Bcl-2 و تنظیم منفی بیان p53, Apaf-1, Fas, FasL, Bid, Bax و سیتوکروم c، کاهش می‌دهد [۳۹].

به نظر می‌رسد معنی‌دار بودن بیان ژن Bcl-2 در گروه گل محمدی و تمرین استقامتی+ گل محمدی، و معنی‌دار بودن بیان ژن Bax در گروه تمرین استقامتی+ گل محمدی در پژوهش حاضر، به دلیل ترکیبات فلاونوئیدی گل محمدی باشد؛ هرچند که جداسازی ترکیبات گل محمدی استفاده شده در پژوهش حاضر مقدور نبود. در سال ۲۰۱۹، در مطالعه‌ای ترکیبات شیمیایی روغن‌های استخراج‌شده از گل محمدی بررسی شد. نتایج حاکی از آن بود، روغن گل محمدی شامل اجزای اصلی لیمونن (۰/۴ الی ۱۲/۸ درصد)، الکل-۲-فنیل اتیل (۱ الی ۱/۳ درصد)، سیترونلول (۱۶/۲ الی ۵۷/۸ درصد)، ژرانیول (۰/۹ الی ۱۴/۱ درصد)، متیلوژنول (۰/۵ الی ۲/۵ درصد)، Heptadecane (۰/۸ الی ۳ درصد)، Nonadecene (۱۴/۹ الی ۳۰/۲ درصد)، ایکسوزان (۱ الی ۳/۳ درصد)، هزیسوزان (۵/۸ الی ۱۸/۶

پژوهش باشد؛ سیستم آنزیمی نظیر آنزیم‌های SOD، GPX و CAT نقش مهمی در مهار گونه‌های فعال اکسیژنی دارند. عوامل بسیاری وجود دارند که ممکن است تعیین کنند، آیا فعالیت ورزشی موجب افزایش اثر تخریبی گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود یا خیر. مهمترین این عوامل، شدت مطلق فعالیت ورزشی است. از دیگر عوامل تعیین کننده، درجه استرس اکسیداتیو (اثر تخریبی ROS)، درجه آمادگی آزمودنی‌ها، خستگی آزمودنی‌هایی که تمرین ورزشی را اجراء می‌کنند، و در نهایت برنامه غذایی آزمودنی است. از طرفی گل محمدی حاوی ترپن‌ها، گلیکوزیدها، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، کربوکسیلیک اسید، میرسن، ویتامین C، کامفرول و کوئرستین است. ترکیبات فنولی این گیاه، باعث خاصیت آنتی‌اکسیدانی و از بین بردگی گونه‌های فعال اکسیژن آن شده است. در پژوهشی، با هدف بررسی سازگاری درون‌عضلانی فعالیت ورزشی و برخی از مکمل‌ها (NAC^۱ و EGCG^۲) بر روی عضلات اسکلتی نمونه‌های انسانی گزارش شد که فعالیت برون‌گرا، باعث افزایش سطوح سیتوکروم c و Bax در ۶ و ۸ ساعت بعد از فعالیت شده است [۲۹]. به نظر می‌رسد نوع و محتوای فعالیت ورزشی عامل مهمی در کنترل آپوپتوزیس می‌باشد. همچنین در پژوهشی دیگر، تأثیر تمرین استقامتی بر ایجاد آپوپتوزس در عضله مخطط مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد، سطوح شاخص‌های AIF و Bax/Bcl-2 در هر دوی عضله قلبی و قلبی در حیوانات تمرین کرده، کاهش یافته بود. میزان پروتئین Bax میتوکندریایی و سیتوکروم c سیتوزولی تحت شرایط استرس اکسیداتیو تنها در عضله قلبی افزایش نشان داد. همچنین افزایش ناشی از H₂O₂ در P-JNK و Bax میتوکندریایی و AIF سیتوزولی نیز در عضله قلبی حیوانات تمرین کرده مشخص شد. پژوهشگران اشاره داشتند که استرس

درصد)، تریکوزان (۰/۹ الی ۵/۲ درصد) و پنتاکوزان (۰/۳ الی ۲/۱ درصد) می‌باشد. این عوامل باعث ایجاد پتانسیل قوی در گل محمدی از جهت آنتی‌اکسیدان بودن آن عمل کرده و در صنایع دارویی بهترین خواهد بود [۱۹]. در تحقیقی دیگر، میزان ترکیب‌های فلاونوئیدی گونه‌های گل محمدی مورد ارزیابی قرار گرفت. عنوان شد که ترکیب‌های فلاونوئیدی کامفرول و کوئرستین به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، رادیکال‌های آزاد در بدن را پاکسازی می‌نمایند [۴۰]. با توجه به اینکه گیاه گل محمدی دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی می‌باشد از نظر تئوری نقش این گیاه را در کاهش مرگ سلولی و آپوپتوزیس بیان می‌کند.

با این حال، برخلاف نتایج تحقیق حاضر، در مطالعه‌ای، در رابطه با تأثیر تمرینات تناوبی بر آپوپتوزیس، تأثیر فعالیت ورزشی تناوبی بر Bax و Bcl-2 در عضله اسکلتی موش‌های صحرایی بررسی گردید. نتایج حاکی از آن بود که فعالیت ورزشی تناوبی به‌صورت معنی‌داری نسبت Bax/Bcl-2 را در عضله اسکلتی تندانقباض افزایش می‌دهد. همچنین، بیان Bcl-2 به‌طور معنی‌داری در گروه فعالیت ورزشی کمتر از گروه تمرین تناوبی بود [۴۱]. به نظر می‌رسد، علت کاهش بیان ژن Bcl-2 و ناهمسو بودن این مطالعه با تحقیق حاضر، مربوط به متفاوت بودن پروتکل تمرینی باشد. فعالیت‌های حاد و کوتاه‌مدت باعث افزایش گونه‌های فعال اکسیژنی و در نتیجه باعث افزایش آپوپتوزیس می‌شوند. در پژوهشی دیگر نیز، نشان داده شد که ۶ ماه تمرین استقامتی موجب کاهش بیان پروتئین Bcl-2 و افزایش بیان پروتئین Bax در میوکارده موش‌های صحرایی می‌شود. محققان اشاره داشتند که تمرین استقامتی طولانی‌مدت به‌دلیل افزایش استرس اکسیداتیو، می‌تواند موجب بروز آپوپتوزیس در عضله قلبی شود [۴۲]. به نظر می‌رسد، علت ناهمسو بودن این مطالعه با پژوهش حاضر، سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن آزمودنی‌های

¹ N-acetyl-cysteine

² Epigallocatechin Gallate

اکسیداتیو کوتاه‌مدت در شرایط آزمایشگاهی، می‌تواند موجب القای پیام‌های آپوپتوزیسی در عضلات مختلط شود. بعلاوه، تمرین می‌تواند استرس اکسیداتیو ناشی از آپوپتوزیس را در بافت‌های ویژه‌ای کاهش دهد که اثر آن در عضله قلبی بیشتر برجسته است [۴۳]. همزمان با افزایش استرس اکسیداتیو، جابه‌جا شدن و قرارگیری پروتئین Bax در غشای بیرونی میتو‌کندری زیاد می‌شود. این بحث، تا حدودی می‌تواند به فعال شدن JNK¹ سیتوزولی بستگی داشته باشد؛ طوری که JNK با فسفریله شدن توسط محرک‌های استرس سلولی پروتئین Bcl-2 را مهار می‌نماید. JNK در داخل میتو‌کندری، نفوذپذیری غشای میتو‌کندری را افزایش داده و لذا رهایش عوامل پیش‌آپوپتوزی همچون AIF و سیتوکروم C را باعث می‌شود و از این طریق آبشار کاسپازی راه‌اندازی می‌شود. در پاسخ به تمرین ورزشی پژوهش حاضر، به نظر می‌رسد در سطوح مشابهی از درجه اکسیداتیو، JNK کمتری فسفریله شده است که متعاقب آن بیان ژن Bax کاهش و بیان ژن Bcl-2 افزایش یافته است. احتمال دیگر در رابطه با افزایش آپوپتوزیس، برخی از پروتئین‌های اسکلت سلولی می‌باشد که به‌نگام افزایش استرس اکسیداتیو، به داخل میتو‌کندری رفته و احتمالاً نفوذپذیری غشایی را افزایش می‌دهد. از آنجایی که بررسی این عوامل در پژوهش حاضر مقدور نبود، ولی شواهد موجود نشان‌دهنده این است که سطوح این پروتئین با تمرین ورزشی تغییر محسوسی نداشته است. در سال ۱۳۹۸، در تحقیقی تأثیر تمرینات تناوبی فزاینده بر آپوپتوزیس قلب رت‌های جوان بررسی شد. نتایج ایمونوهیستوشیمی نشان داد، ۶ هفته تمرین تناوبی فزاینده موجب افزایش ۲۰۰ و ۳۲۰ درصدی معنی‌دار (p < ۰/۰۰۱) آپوپتوز گروه تمرین در مقایسه با گروه کنترل شش هفته و گروه پایه شد [۲۲]. در سال

¹ c-Jun-N-terminal kinase

۲۰۱۹، پژوهشی تحت عنوان سیستم شبه افیونی قلبی ناشی از تمرین ورزشی آپوپتوزیس میتو‌کندریایی را در موش‌های چاق کاهش می‌دهد، انجام شد. نتایج نشان داد، هر دو نوع تمرین باعث هایپرتروفی فیزیولوژیکی قلبی، بهبود فشارخون سیستولیک و شاخص‌های چاقی شده است؛ اما فقط تمرین با حجم ورزشی بالا باعث کم شدن افزایش توده بدنی شده است. همچنین گروه رژیم غذایی پرچرب، بیان پروانکفالین، ERK، PI3K و GSK-3 کمتر و بیان کاسپاز-۳ بیشتری نسبت به گروه کنترل نشان دادند [۲۳].

اگرچه سازوکارهای متعددی، مانند تغییر مستقیم در بیان و وضعیت ROS ژن‌های مربوط به آپوپتوزیس، کاهش آزادسازی عوامل آپوپتوتیک میتو‌کندری، تغییرات تولید آنتی‌اکسیدانی برای اثرات محافظتی تمرینات ورزشی در مقابل آپوپتوز مطرح شده است، ولی هنوز ابهامات بسیاری در این زمینه وجود دارد. به نظر می‌رسد، میتو‌کندری نقش مهمی در تنظیم آپوپتوز سلول‌های عضله قلبی بازی می‌کند. در این راستا، اعضای خانواده Bcl-2 شامل پروتئین‌های Bax و Bcl-2 به عنوان پروتئین‌های اصلی، در شکل‌گیری کانال‌های آپوپتوزی، تنظیم نفوذپذیری میتو‌کندری و پیام‌های آپوپتوزی میتو‌کندریایی درگیر می‌شوند. نسبت Bax به Bcl2 شاخصی برای نشان دادن پتانسیل آپوپتوز میتو‌کندریایی می‌باشد که Bcl-2 بوسیله ممانعت از اگومری شدن Bax-Bax با فعالیت پیش‌آپوپتوزی پروتئین Bax مخالفت می‌کند. هنگامی که Bax به میتو‌کندری وارد می‌شود، منافذی را در غشای میتو‌کندری شکل می‌دهد که در نتیجه پروتئین‌هایی از جمله سیتوکروم C آزاد شده و وارد سیتوزول می‌شود و باعث شروع پیام‌رسانی آپوپتوتیک آبشارهای کاسپاز پایین دستی می‌شود [۴۴]. همچنین پروتئین Bcl-2 با ورود به غشای خارجی میتو‌کندری، یکپارچگی غشا را با خارج ساختن یون‌های H⁺، از طریق کانال‌های یونی حفظ کرده و

سیتوزول قرار دارد اما به محض اکسید شدن، به داخل میتوکندری جابه‌جا شده و احتمالاً باعث تسهیل در امر نفوذپذیری غشای میتوکندری می‌شود. با همه شواهد موجود، اگرچه بررسی تغییرات این شاخص در این پژوهش مقدور نبود، اما مشهود است که مقادیر این پروتئین با تمرین تغییر چندانی نمی‌کند که بیانگر سازگارنشدن آن با تمرین ورزشی است [۴۶]. روش دیگر مهار آپوپتوزیس و افزایش طول عمر سلول، رابطه فعالیت ورزشی و پروتئین‌های SIR1^۱ است که حین فعالیت ورزشی افزایش پیدا می‌کند. این پروتئین‌ها، موجب فعال شدن پروتئین‌های پایین دست از جمله PGC-1 می‌شود که متعاقب آن عملکرد میتوکندری بهبود یافته و از ایجاد آپوپتوزیس ممانعت به عمل می‌آورد [۴۷]. با این حال با توجه به محدودیت‌های پژوهش حاضر، بررسی تغییرات این شاخص و ارزیابی ارتباط بین آنها با فرآیند آپوپتوزیس مقدور نبود.

اگرچه مکانیسم‌های دقیق آپوپتوزیس ناشی از فعالیت ورزشی بطور دقیقی مشخص نیست، اما فرضیه‌های احتمالی زیادی وجود دارند که نیازمند بررسی‌های بیشتری هستند. یکی از فرضیه‌های مهم در این زمینه این است که، در حین فعالیت ورزشی، متابولیسم عضلانی افزایش می‌یابد که منجر به تولید ROS می‌شود [۴۴]. افزایش ROS، می‌تواند آسیب اکسیداتیو ایجاد کرده و بدین گونه منجر به آپوپتوزیس از طریق مسیر داخلی گردد [۴۸]. آپوپتوزیس در بافت‌های مختلف با انجام فعالیت ورزشی حاد، افزایش سن [۴۹]، دیستروفی عضلانی [۵۰]، قطع عصب [۵۱]، کاهش عضلانی [۵۲]، ایسکمی-رپرفیژیون [۵۳]، کاهش فاکتورهای رشدی [۵۴] و ناتوانی قلبی مزمن [۵۵] افزایش می‌یابد.

در مطالعه حاضر بیان ژن Caspase-3 در دو گروه تمرین استقامتی و تمرین استقامتی+عصاره گل محمدی بطور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل

با اتصال به Apaf-1 فعال سازی کاسپازی را مهار می‌کند [۴۵، ۴۴]. لذا نسبت Bax به Bcl-2، نشان‌گر پتانسیل آپوپتوز میتوکندریایی است. محققان، گزارش کردند که آپوپتوزیس میتوکندریایی اغلب با افزایش گونه‌های فعال اکسیژنی توأم بوده و تمرینات ورزشی، می‌توانند با کاهش تولید این گونه‌ها و افزایش دفاع ضد اکسایشی، روند آپوپتوزیس را کندتر نماید. بدنال افزایش فشار اکسایشی، جابجایی و فرارگیری پروتئین Bax در غشای خارجی میتوکندری زیاد می‌شود. این امر تا حدودی می‌تواند متعاقب فعال سازی JNK سیتوز باشد؛ به گونه‌ای که JNK در پاسخ به فشار اکسایشی فسفریله شده و باعث مهار پروتئین Bcl-2 می‌شود، بنابراین پروتئین Bax به طرف میتوکندری جابه‌جا می‌شود. پروتئین JNK در داخل میتوکندری، در افزایش نفوذپذیری نقش داشته و موجبات رهاسازی شاخص‌های پیش آپوپتوزی AIF و سیتوکروم C به داخل سیتوزول را فراهم می‌سازد. بدنال این اتفاق، AIF و سیتوکروم C باعث قطعه قطعه شدن DNA به طور مستقیم یا به روش آبشار کاسپازی می‌شوند [۴۳]. متعاقب تمرین ورزشی-مشابه با اثر تمرین استقامتی پژوهش حاضر- و مصرف گل محمدی به دلیل نظری خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن، مقدار مشابهی از فشار استرس اکسیداتیو با فسفوریلاسیون اندک JNK همراه است. این امر همراه با کاهش مقادیر بیان ژن Bax و جابه‌جاشدن آن به طرف میتوکندری و همچنین افزایش بیان ژن پروتئین Bcl-2 می‌باشد. علاوه بر این، جابه‌جایی و انتقال AIF که در شرایط استرس اکسیداتیو زیاد شده بود، در عضله قلبی تمرین کرده کاهش می‌یابد که نشانگر مهار سیگنال آپوپتوزی است. در رابطه با نفوذپذیری غشای میتوکندری، موارد دیگری نیز مورد بحث و بررسی قرار گرفته است؛ در برخی مطالعات گزارش شده است که پروتئین‌های اسکلت سلولی از جمله کافیلین-۲ با آپوپتوزیس-استرس اکسیداتیو در ارتباط است. کافیلین-۲، در

¹ Silent Information Regulator 1

شش ماهه کاهش یافته است. گزارش شده است، کاهش قابل توجه بیان ژن پروتئین Caspase-3 متعاقب تمرین هوازی با کاهش عوامل پیش آپوپتوزی مانند بیان پروتئین Bax و نسبت بیان پروتئین Bax به Bcl2 و نیز افزایش معنی دار پروتئین ضد آپوپتوزی Bcl-2 همراه است. این کاهش پتانسیل آپوپتوزی میتو کندریایی متعاقب تمرین هوازی احتمالاً با کاهش رهایش عوامل آپوپتوتیک مانند سیتوکروم c و Apaf1 در عضله اسکلتی همراه شده و موجب کاهش معنی دار بیان ژن Caspase-3 شده است [۵۶]. هرچند برای گزارش قطعی این امر در بافت هدفی چون قلب، انجام مطالعاتی که همزمان شاخص‌های مرتبط به آپوپتوزیس را در دو مسیر داخلی و خارجی اندازه‌گیری می‌کند، واجب می‌سازد. در مسیر درونی، میتو کندری و رتیکلوم اندوپلاسمیک محوری فرایند را دارند که در این مسیر محوری میتو کندری در ایجاد آپوپتوزیس بیشترین اهمیت را داشته و بسیاری از مطالعات بر نقش آن تمرکز کرده اند. در شرایط استرس‌زا، عواملی مثل گلوکوکورتیکوئیدها، ROS، مونوکسید نیتروژن، داروهای شیمی درمانی، پرتوافکنی، کاهش محرک‌های رشدی و سایتوکین‌ها با ایجاد استرس به میتو کندری موجب تغییراتی در نفوذ پذیری آن می‌گردند و سیتوکروم c، که در غشای داخلی میتو کندری و فضای بین غشایی قرار دارد، بداخل سیتوزول آزاد شده، به Apaf-1 متصل شده و ترکیبی بنام dATP تشکیل می‌دهد. سپس این ترکیب، از طریق فعالسازی پروکاسپاز ۹، کاسپاز ۹ و کاسپاز ۳ موجب آپوپتوزیس می‌شود [۵۷]. مهمترین مرحله کنترل این مسیر، آزاد سازی سیتوکروم c است. پروتئین‌های مهارکننده مسیر مرگ سلولی مانند Bcl-2 و Bcl-XL مانع آزاد سازی سیتوکروم c شده و به این ترتیب نقش خود را ایفا می‌کنند [۵۸]. از طرفی در پژوهش حاضر بیان ژن Caspase-3 در گروه عصاره گل محمدی تفاوت معنی‌داری را نشان

نداده است. با توجه به مطالعات قبلی در رابطه با گل محمدی، از آنجایی که گل محمدی خاصیت آنتی‌اکسیدانی داشته و از طرفی چون در گروه تمرین استقامتی + گل محمدی کاهش بیان ژن Caspase-3 خیلی بیشتر از گروه تمرین استقامتی بوده است (یعنی ترکیب تمرین استقامتی و مصرف عصاره گل محمدی اثر بیشتری را در کاهش بیان ژن Caspase-3 نشان داده است)، لذا انتظار بر این بود که بیان ژن Caspase-3 در گروه عصاره گل محمدی نیز کاهش یابد، اما واقعیت امر خلاف این گفته را ثابت کرد. احتمال می‌رود زمان برداشت بافت در پژوهش حاضر، محدودیت‌های ارزیابی شاخص‌های التهابی درگیر در فعالیت کاسپازی همچون TNF- α و IL-6، محدودیت‌های ارزیابی شاخص‌های آپوپتوزی مربوط به مسیر خارجی آپوپتوزیس و مسیر آزادسازی کلسیم و سایر عوامل دخیل در فرآیند آپوپتوزیس و همچنین عدم تفکیک جز به جز ترکیبات تشکیل‌دهنده عصاره گل محمدی در پژوهش حاضر در این امر نقش داشته باشد. گزارش شده است حفظ فعالیت Caspase-3 بعد از اجرای فعالیت ورزشی ممکن است در تغییر حالت سلول ناشی از فعالیت ورزشی و تفکیک‌سازی سلول‌های ماهواره‌ای نقش داشته باشد [۲۷]. لذا انتظار می‌رود درجه پایینی از Caspase-3 برای تحریک نمودن بعضی از فعالیت‌های سلولی (که در بند قبل گفته شد) و ترمیم با رشد بافت متعاقب تمرین ورزشی مناسب باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که نسبت بیان ژن Bax به Bcl-2 در هر سه گروه تمرین استقامتی، گل محمدی و تمرین استقامتی + گل محمدی دارای تفاوت معنی‌داری است. همچنین در رابطه با میزان بیان ژن Caspase-3، گروه تمرین استقامتی و گروه تمرین استقامتی + گل محمدی کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل شش ماهه دارد. در رابطه با

انجام آن نویسندگان را یاری رسانده‌اند، اعلام می‌دارند.

ثبوت کارآزمایی بالینی

پروئکل این پژوهش در کمیته پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، به شماره مرجع IR.ARUMS.REC.1397.205 به تایید رسیده است.

تضاد منافع

مؤلفان پژوهش حاضر اظهار می‌دارند که منافع متقابلی از تالیف و یا انتشار این مقاله ندارند. همچنین این پایان نامه هیچ حامی مالی نداشته است.

مشارکت مؤلفان

آیلار ایمانی، معرفت سیاه‌کوهیان، پوران کریمی، مسعود اصغرپور ارشد، فرناز سیفی اسگ‌شهر طراحی، اجرا و تحلیل نتایج پژوهش را بر عهده داشتند. همچنین مؤلفان، مقاله را تالیف نموده و نسخه نهایی آن را خوانده و تایید نموده‌اند.

اثربخشی گل محمدی بر میزان بیان ژن Caspase-3 تأثیر معنی‌داری مشاهده نشد. با توجه به این نتایج، در حالت کلی چنین انتظار می‌رود که تمرینات استقامتی منظم دارای حجم، مدت و شدت مناسب توأم با مکمل‌سازی عصاره گل محمدی، بعنوان یک مداخله بتوانند در کاهش آپوپتوزیس عضله قلبی مؤثر واقع شوند. با این وجود، اظهار نظر مطلق در مورد اثربخشی تمرینات ورزشی مختلف بر فاکتورهای مرتبط با آپوپتوزیس میوکاردا، نیازمند انجام پژوهش‌های متعددی بخصوص در حیطة بافت قلبی می‌باشد. پیشنهاد می‌شود در رابطه با تاثیر تمرینات استقامتی بر آپوپتوزیس میوکاردا، پژوهش‌هایی اجرا شوند که در آنها امکان اندازه‌گیری تمامی شاخص‌های مرتبط با آپوپتوزیس که جزو محدودیت‌های این پژوهش بود، وجود داشته باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب سپاس و قدردانی خود را از تمامی عزیزانی که در تحقیق حاضر شرکت داشته و یا در

References

- 1- Aryamloo P, Asgarian-Omran H, Aslani N, Hossein-Nataj H, Shokohi T, Badali H, et al. Cellular apoptosis: an alternative mechanism of action for caspofungin against candida glabrata. *Curr Med Mycol*. 2019 Jun; 5(2): 9–15.
- 2- Kile BT. The role of apoptosis in megakaryocytes and platelets. *Br J Haematol*. 2014 Jan; (2):217-26.
- 3- Mirzaei H, Keighobadi M, Emami S. An overview of anticancer chalcones with apoptosis inducing activity. *J Mazandaran Univ Med Sci*. 2017 Jan; 26(146):254-68. [Full Text in Persian]
- 4- Nagata S, Tanaka M. Programmed cell death and the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2017 Jan; 17(5):333-40.
- 5- Westphal D, Kluck R, Dewson G. Building blocks of the apoptotic pore: how Bax and Bak are activated and oligomerize during apoptosis. *Cell Death Differ*. 2014 Feb; 21(2):196.
- 6- Iurlaro R, MunozPinedo C. Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. *FEBS J*. 2016 Jul; 283(14):2640-52.
- 7- Roberts AW, Huang D. Targeting BCL2 with BH3 mimetics: basic science and clinical application of venetoclax in CLL and related B cell malignancies. *Clin Pharmacol Ther*. 2016 Nov; 101(1):89-98.
- 8- Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ*. 2015 Apr; 22(4):526-39.
- 9- Galluzzi L, Lopez-Soto A, Kumar S, Kroemer G. Caspases connect cell-death signaling to organismal homeostasis. *Immunity*. 2016 Feb; 44(2):221-31.
- 10- Berghe TV, Hulpiu P, Martens L, Vandenbroucke RE, Van Wonterghem E, Perry SW, et al. Passenger mutations confound interpretation of all genetically modified congenic mice. *Immunity*. 2015 Jul; 43(1):200-9.

- 11- Roh J, Rhee J, Chaudhari V, Rosenzweig A. The role of exercise in cardiac aging. *Circ Res*. 2016 Jan; 118(2):279-95.
- 12- Kwak H-B. Effects of aging and exercise training on apoptosis in the heart. *J Exerc Rehabil*. 2013 Dec; 9(2):212-9.
- 13- Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Heikkila P, Laine P, Mattila S, et al. Cardiomyocyte apoptosis and progression of heart failure to transplantation. *Eur J Clin Invest*. 1999 May; 29(5):380-6.
- 14- Li Q, Zhou L-Y, Gao G-F, Jiao J-Q, Li P-F. Mitochondrial network in the heart. *Protein Cell*. 2012 Jun; 3(6):410-8.
- 15- Primeau AJ, Adhietty PJ, Hood DA. Apoptosis in heart and skeletal muscle. *Can J Appl Physiol*. 2002 Aug. 27(4):349-95.
- 16- Lemasters JJ, Qian T, Bradham CA, Brenner DA, Cascio WE, Trost LC, et al. Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death. *J Bioenerg Biomembr*. 1999 Aug; 31(4):305-19.
- 17- Pillon Barcelos R, Freire Royes LF, Gonzalez-Gallego J, Bresciani G. Oxidative stress and inflammation: liver responses and adaptations to acute and regular exercise. *Free Radic Res*. 2017 Feb; 51(2):222-36.
- 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.
- 19- Toluei Z, Hosseini Tafreshi S A, Arefi Torkabadi M. Comparative chemical composition analysis of essential oils in different populations of damask rose from iran. *JAST*. 2019 Mar; 21(2): 423-437.
- 20- Boskabady MH, Shafei MN, Saberi Z, Amini S. Pharmacological effects of *Rosa damascena*. *Iran J Basic Med Sci*. 2011 Jul; 14(4): 295.
- 21- Hasani S, Habibian M. The effect of regular high-intensity interval exercise on some apoptotic factors in the brain tissue of old female rats. *Kashan Univ Med Sciences J*. 2018 Aug; 22(2):128-133. (Full Text in Persian)
- 22- Mirdar Sh, Moghadasi N, Hamidian Gh. The effect of increasing interval training on the apoptosis of the heart of young rats. *J Sports Biolog Sci*. 2020; 11(1): 49-61. (Full Text in Persian)
- 23- Santos BA, Machado MV, Menezes AC, Velasco LL, Fragoso VS, Vieira AB, et al. Exercise-induced cardiac opioid system activation attenuates apoptosis pathway in obese rats. *Life Sci*. 2019 Aug; 231: 116542.
- 24- Evans LW, Omaye ST. Use of saliva biomarkers to monitor efficacy of vitamin C in exercise-induced oxidative stress. *Antioxidants*. 2017 Jan; 6(1):5.
- 25- Farzanegi P, Habibian M, Alinegad H. The combined effect of regular aerobic exercise with garlic extract on renal apoptosis regulatory factors in aged rats with chronic kidney disease. *Arak Med Sci Univ J*. 2016 Jan; 19(108): 62-70 (Full text in Persian)
- 26- Ko IG, Kim SE, Kim CJ, Jee YS. Treadmill exercise alleviates aging-induced apoptosis in rat cardiac myocytes. *Internation J Geronto*. 2013 Sep; 7(3):152-157.
- 27- McMillan EM, Graham DA, Rush JW, Quadrilatero J. Decreased DNA fragmentation and apoptotic signaling in soleus muscle of hypertensive rats following 6 weeks of treadmill training. *J Appl Physiol*. 2012 Oct; 113(7):1048-57.
- 28- Soury R, Yar A, Shabkhiz F; Eskandari A. The effect of aerobic exercise on apoptosis and growth indices in the heart of old rats. *Tehran Univ Biolog Sci J*. 2019; 10(4):435-47. (Full Text in Persian)
- 29- Kerksick CM, Kreider RB, Willoughby DS. Intramuscular adaptations to eccentric exercise and antioxidant supplementation. *Amino Acids*. 2010 Jun; 39(1):219-32.
- 30- Ghased F, Bashiri J. The effect of twelve weeks aerobic training with Rose damascene supplementation on expression of Caspase 3 and 9 genes of soleus muscle in male rats. *Pars Medical Sciences Magazine*. 2020; 17(1): 42-51. (Full Text in Persian)
- 31- Moure A, Cruz JM, Franco D, Dominguez JM, Sineiro J, Dominguez H, et al. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*. 2001 Feb; 72(2):145-71.

- 32- Veskokoukis AS, Goutianos G, Paschalis V, Margaritelis NV, Tzioura A, Dipla K, et al. The rat closely mimics oxidative stress and inflammation in humans after exercise but not after exercise combined with vitamin C administration. *Eur J Appl Physiol*. 2016 Apr; 116(4):791-804.
- 33- Langan-Evans C, Close GL, Morton JP. Making weight in combat sports. *Strength Condition J*. 2011 Dec; 33(6): 235-39.
- 34- Naito H, Powers SK, Demirel HA, Aoki J. Exercise training increases heat shock protein in skeletal muscles of old rats. *Med Sci Sports Exer*. 2001 May; 33(5):729-34.
- 35- Kaul VK, Virendra S, Bikram, S. Damask rose and marigold: prospective industrial crops. *J Med Aromatic Plant Sci*. 2000 Jul; 22(1B):313-318.
- 36- Santana ET, Serra AJ, Silva Junior JA, Bocalini DS, Barauna VG, Krieger JE, et al. Aerobic exercise training induces an anti-apoptotic milieu in myocardial tissue. *Rev Edu Fis*. 2014 Jun; 20(2):233-238.
- 37- 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. *J Tabriz Univ Med Sci Health Ser*. 2018 Feb; 39(6):35-43 (Full Text in Persian)
- 38- 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 Jun; 23(6):566-573.
- 39- Zhang S, Qi Y, Xu Y, Han X, Peng J, Liu K, et al. Protective effect of flavonoid-rich extract from *Rosa laevigata Michx* on cerebral ischemia-reperfusion injury through suppression of apoptosis and inflammation. *Neurochemistry International*. 2013 Nov; 63(5):522-532.
- 40- Jaymand K, Rezayi MB, Osareh MH, Tabayi SR, Mashkizadeh S. Evaluation of flavonoid composition of *Rosa damascena Mill*. *J Med Plants*. 2010; 4(36): 161-168 (Full Text in Persian)
- 41- Chen DQ, Deng SX, Peng FL. Effects of interval exercise on Bax, Bcl-2 and correlated factors in rats' skeletal muscles. *J Beijing Sport Univ*. 2008; 7-19.
- 42- Li X, Lu J, Wu W. Effect of long-term endurance exercise on cardiac apoptosis. *J Mainyang Normal Univ*. 2009; 71(11):031.
- 43- Vainshtein A, Kazak L, Hood DA. Effects of endurance training on apoptotic susceptibility in striated muscle. *J Appl Physiol*. 2011 Jun; 110(6):1638-45.
- 44- Peterson JM, Bryner RW, Sindler A, Frisbee JC, Always 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 Dec; 105(6):1934-43.
- 45- Garcia-Saez AJ. The secrets of the Bcl-2 family. *Cell Death Differ*. 2012 Nov; 19(11): 1733-1740.
- 46- Klamt F, Zdanov S, Levine RL, Pariser A, Zhang Y, Zhang B, et al. Oxidant-induced apoptosis is mediated by oxidation of the actin-regulatory protein cofilin. *Nat Cell Biol*. 2009 Oct; 11(10):1241-1246.
- 47- Lai C, Ho H, Kuo T J, Day W, Pai CH. Exercise training enhanced SIRT1 longevity signaling replaces the IGF1 survival pathway to attenuate aging-induced rat heart apoptosis. *Age*. 2014 Aug; 36(5): 1-13.
- 48- Rastogi RP, Sinha RP. Apoptosis: molecular mechanisms and pathogenicity. *Excli J*. 2009 Feb; 8:155-181.
- 49- Muradian K, Schachtschabel D. The role of apoptosis in aging and age-related disease. *Z Gerontol Geriatr*. 2001 Dec; 34(2):441-446.
- 50- Dupont-Versteegden EE. Apoptosis in skeletal muscle and its relevance to atrophy. *World J Gastroenterol*. 2006 Dec; 12(46): 7463-7466.
- 51- Bredesen DE, Rao RV, Mehlen P. Cell death in the nervous system. *Nature*. 2006 Oct; 443(4):796-802.
- 52- Quadriatero J, Alway SE, Dupont-Versteegden EE. Skeletal muscle apoptotic response to physical activity: potential mechanisms for protection. *Appl Physiol Nutrition Metabol*. 2011 Sep; 36(7):608-617.
- 53- Soti C, Sreedhar AS, Csermely P. Apoptosis, necrosis and cellular senescence: chaperone occupancy as a potential switch. *Aging Cell*. 2003 Feb; 2:39-45.

- 54- Saini A, Al-Shanti N, Faulkner SH, Stewart CE. Pro-and anti-apoptotic roles for IGF-I in TNF- α -induced apoptosis: a MAP kinase mediated mechanism. *Growth Factors*. 2008 Oct; 26: 239-253.
- 55- Siu PM, Bryner RW, Martyn JK, Always SE. Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles. *FASEB J*. 2004 Jul; 18(10):1150-2.
- 56- Song W, Kwak HB, Lawler JM. Exercise training attenuates age-induced changes in apoptotic signaling in rat skeletal muscle. *Antioxid Redox Signal*. 2006 Mar-Apr; 8:517-528.
- 57- Wang QD, Pernow J, Sjoquist PO, Ryden L. Pharmacological possibilities for protection against myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 2002 Jul; 55:25-37.
- 58- Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Jan; 9:47-59.