

علوم زیستی ورزشی - تابستان ۱۳۹۷
دوره ۱۰، شماره ۲، ص: ۲۳۵ - ۲۲۱
تاریخ دریافت: ۲۳ / ۰۸ / ۹۶
تاریخ پذیرش: ۰۲ / ۱۲ / ۹۶

تأثیر ۱۲ هفته تمرین هوازی و مصرف عصاره چای سبز بر بیان کاسپاز-۳ بافت قلبی رت‌های نر مسن

میرزا احسین نوروزی کمره^۱ - محمدرضا ذوالفقاری^{۲*} - فیروز قادری پاکدل^۳ - جواد طلوعی آذر^۴
۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران ۲ و ۴. استادیار
فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران ۳. دانشیار فیزیولوژی، دانشکده
پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

چکیده

بروز نارسایی قلبی در اثر پیری افزایش می‌یابد. آپوپتوز سلول قلبی در پاتوژنز نارسایی قلبی نقش دارد. هدف پژوهش حاضر بررسی تأثیر ۱۲ هفته تمرین هوازی و مصرف عصاره چای سبز بر بیان کاسپاز-۳ بافت قلبی رت‌های نر مسن بود. بدین منظور ۳۲ سر رت نر مسن به‌طور تصادفی به چهار گروه هشت‌تایی کنترل، تمرین، مکمل و تمرین+ مکمل تقسیم شدند. گروه‌های تمرینی ۱۲ هفته و ۵ روز در هفته فعالیت هوازی با شدت ۶۰ تا ۷۵ درصد اوج اکسیژن مصرفی انجام دادند. در همین مدت گروه‌های دریافت‌کننده مکمل، مکمل عصاره چای سبز دریافت کردند. برای اندازه‌گیری بیان کاسپاز-۳ از روش ایمنوهیستوشیمی استفاده شد. داده‌ها با استفاده از آزمون آماری ANOVA و آزمون تعقیبی توکی آنالیز شدند. نتایج نشان داد که بیان کاسپاز-۳ به‌صورت معناداری در گروه‌های تمرین (۱۸ درصد)، مکمل (۱۳ درصد) و تمرین+ تمرین (۴۳ درصد) نسبت به گروه کنترل کاهش داشت ($P \leq 0/05$). همچنین، بیان کاسپاز-۳ به‌صورت معناداری در گروه تمرین + مکمل نسبت به گروه‌های تمرین (۳۰ درصد) و مکمل (۳۴ درصد) کاهش داشت ($P \leq 0/05$). براساس نتایج مطالعه حاضر می‌توان گفت که ترکیب ۱۲ هفته تمرین هوازی با شدت متوسط با مصرف مکمل عصاره چای سبز نسبت به تمرین هوازی و مصرف مکمل چای سبز به تنهایی می‌تواند بیان کاسپاز-۳ در بافت قلب رت‌های نر مسن را کاهش دهد.

واژه‌های کلیدی

پیری، تمرین هوازی، چای سبز، کاسپاز-۳.

مقدمه

پیری فرایند فیزیولوژیک پیچیده ناشی از کاهش پیش‌رونده عملکردهای بیولوژیک متعدد و اختلال هومئوستاز است (۱). این تغییرات هومئوستاز به بیماری‌های مختلف از جمله سکته مغزی، زوال عقل و بیماری‌های قلبی - عروقی منجر می‌شود (۲). با افزایش سن بروز و شیوع سکته‌های قلبی از جمله انفارکتوس قلبی افزایش می‌یابد. این در حالی است که در کشورهای در حال توسعه جمعیت افراد مسن به‌طور فزاینده‌ای افزایش می‌یابد (۳). بروز بیماری‌های قلبی در اثر پیری به‌صورت فزاینده‌ای افزایش می‌یابد، به‌طوری‌که نارسایی قلبی در افراد بالای ۸۵ سال چهار برابر بیشتر از افراد ۶۵-۷۵ ساله است (۲). در پیری طبیعی تعداد سلول‌های بافت قلب به‌طور چشمگیری کاهش می‌یابد. بنابراین کاهش کل سلول‌های زنده بافت قلب ممکن است به کاهش عملکرد قلب منجر شود (۴). نشان داده شده است که آپوپتوز قلبی در پاتوزن نارسایی قلبی مشارکت می‌کند. در مرحله پایانی نارسایی قلبی آپوپتوز سلول‌های قلبی مشاهده شده است (۵).

آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول، در سال ۱۹۷۲ توسط کر^۱ و همکاران تعریف و از نکروز سلولی جدا شد (۶). آپوپتوز به‌طور کلی از دو مسیر خارجی و داخلی سلول را تحت تأثیر قرار می‌دهد و از بین می‌برد. در مسیر خارجی پیام‌های مرگ ($\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$)، یا FasL به گیرنده‌های مرگ غشای سلول (Fas, TNFR1, TNFR2) متصل می‌شوند و موجب فعال‌سازی کاسپاز ۸، ۲، ۱۰ و بعد کاسپاز-۳ و در نهایت آپوپتوز سلولی می‌شوند (۷). در مسیر داخل سلولی، ایجاد استرس به میتوکندری سبب تغییر در نفوذپذیری آن به سیتوکروم c می‌شود. سیتوکروم c به فاکتور ۱ پروتئاز فعال‌کننده آپوپتوز (Apaf-1) متصل می‌شود و سبب فعال شدن کاسپاز ۹ و بعد کاسپاز-۳ و در نهایت آپوپتوز می‌گردد (۸). کاسپازها (سیستئین آسپارتاز- پروتئازهای خاص) خانواده‌ای از پروتئین‌های درون سلولی‌اند که در شروع و اجرای فرایند آپوپتوز درگیرند. القای آپوپتوز از طریق مکانیسم مرگ درون سلولی و برون سلولی به‌وسیله فعالیت کاسپازها رخ می‌دهد (۹). کاسپازهای تأثیرگذار^۲ هم در مسیر داخل سلولی و هم مسیر برون سلولی سبب آپوپتوز می‌شوند و به نوع القای آپوپتوز مرتبط نیستند (۷). ژن کاسپاز-۳ انسان با وزن ۳۲ کیلو دالتونی اولین بار در سال ۱۹۹۴ از لئوسیت‌های T شناسایی شد (۱۰). مطالعات نشان داده‌اند که کاسپاز-۳، کاسپاز اولیه تأثیرگذار در فرایند آپوپتوز در بیشتر سلول‌های پستانداران از جمله بافت

1. Kerr

2. Effector caspases

قلب است. به‌تازگی نشان داده شده که کاسپاز-۳ نقش بسیار مهمی در حساسیت سلول به فرایند آپوپتوز بازی می‌کند (۱۱).

فعالیت ورزشی منظم عامل مهمی در پیشگیری به ابتلا به بیماری‌های قلبی - عروقی و مرگ‌ومیر در بزرگسالان و افراد مسن است (۱۲). فعالیت ورزشی منظم کاهش تراکم مویرگی قلب بر اثر پیری را بهبود می‌بخشد. افزایش تراکم مویرگی در اثر فعالیت ورزشی در قلب مسن می‌تواند یک سازگاری مفید باشد، زیرا شبکه‌ی مویرگی می‌تواند اکسیژن و انرژی مورد نیاز قلب را فراهم کند (۳). فعالیت ورزشی یک درمان غیردارویی برای نارسایی قلبی و بهبود عملکرد ورزشی و کیفیت زندگی در بیماران مبتلا به نارسایی قلبی - عروقی است (۱۳). در دهه‌ی گذشته مطالعات نشان داده‌اند که فعالیت ورزشی منظم آپوپتوز سلولی را کاهش می‌دهد. کواک^۱ و همکاران (۲۰۰۶) اثر محافظتی ۱۲ هفته تمرین هوازی با شدت متوسط در برابر آپوپتوز را با کاهش سطوح کاسپاز ۹، کاسپاز-۳ و نسبت Bax به Bcl-2 را در بافت قلب رت‌ها نشان دادند (۱۴). کو^۲ و همکاران (۲۰۱۳) گزارش دادند که ۶ هفته فعالیت هوازی با شدت پایین موجب کاهش سلول‌های آپوپتوز شده در بافت قلب رت‌های مسن شد (۳).

از طرفی، چای سبز نوشیدنی مورد علاقه در تغذیه‌ی انسان است که به‌دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضد تومورزایی و ضدحساسیت توجه بسیاری را جذب کرده است (۱۵). اپی‌گالوکتشین گالات^۳ (EGCG) بیشترین پلی‌فنول موجود در چای سبز است (۱۶). مطالعات اخیر تأثیرات محافظتی چای سبز و EGCG را در بیماری‌های قلب و عروقی نشان داده‌اند (۱۷). لی^۴ و همکاران (۲۰۰۵) بیان کردند که EGCG سبب از بین رفتن سلول‌های سرطانی می‌شود، ولی تأثیری بر سلول‌های نرمال ندارد (۱۸). شنگ^۵ و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که EGCG آپوپتوز و استرس اکسیداتیو سلول‌های قلبی هنگام بار اضافی ناشی از هایپرتروفی را مهار می‌کند (۱۹). به‌علاوه، EGCG استرس اکسیداتیو ناشی از سلول‌های آپوپتوز را از طریق مهار تغییر تلومر وابسته به مسیر آپوپتوز سرکوب می‌کند (۲۰). با توجه به نتایج مطالعات می‌توان گفت که چای سبز تأثیر مثبتی بر جلوگیری از پیری سلولی دارد، حال این سؤال مطرح می‌شود که آیا چای سبز تأثیری بر بیان کاسپاز-۳ دارد؟

-
1. Kwak
 2. Ko
 3. Epigallocatechin gallate
 4. Li
 5. Sheng

با توجه به آثار سودمند فعالیت ورزشی بر جلوگیری از آپوتوز در بافت قلب سالخورده و تأثیرات مثبت و آنتی‌اکسیدانی چای سبز بر آپوتوز، این پرسش مطرح می‌شود که آیا ترکیب فعالیت بدنی و مصرف چای سبز می‌تواند تأثیر بیشتری را نسبت به هر کدام از آنها بر فرایند آپوتوز در دوران سالمندی داشته باشد؟، تا جایی که بررسی کردیم، مطالعه‌ای در زمینه بررسی این بحث یافت نشد. از این رو، در این پژوهش بر آن شدیم که تأثیر ۱۲ هفته تمرین هوازی و مصرف عصاره چای سبز بر بیان کاسپاز-۳ بافت قلبی رت‌های نر مسن را بررسی کنیم.

روش تحقیق

این پژوهش در کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی ارومیه با شناسه IR.umsu.rec.1396.57 به تصویب رسید. این پژوهش به روش آزمایشگاهی و کنترل شده انجام گرفت. تعداد ۳۲ سر رت نر ویستار ۲۴ هفته‌ای با وزن ۲۷۰ تا ۳۰۰ گرم که از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند، نمونه آماری این تحقیق را تشکیل دادند. ابتدا رت‌ها را در چهار گروه هشت‌تایی شامل گروه تمرین، گروه مکمل، گروه تمرین به اضافه مکمل و گروه کنترل قرار دادیم. مدت زمان دو هفته برای آشنایی با محیط آزمایشگاه و نوار گردان برای آزمودنی‌ها در نظر گرفته شد. سپس پروتکل اصلی تمرین شروع شد، به این صورت که گروه تمرین به مدت ۱۲ هفته تحت تأثیر تمرینات هوازی قرار گرفتند. گروه مکمل به مدت ۱۲ هفته عصاره چای سبز دریافت کردند و گروه تمرین به اضافه مکمل به مدت ۱۲ هفته تمرینات هوازی به همراه مصرف عصاره چای سبز، انجام دادند. پس از اتمام دوره در حالت ناشتا و روز بعد از آخرین جلسه تمرین نمونه‌های مورد نیاز از رت‌ها جمع‌آوری شد.

پروتکل تمرینی

پروتکل تمرینی روی نوار گردان با شیب ثابت ۰ درصد به مدت ۱۲ هفته و ۵ روز در هفته بود. یک هفته پیش از اجرای پروتکل اصلی به منظور آشنایی با تمرین رت‌ها یک هفته را با شدت ۱۰ متر بر دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه تمرین کردند. سپس پروتکل اصلی آغاز شد. مدت و شدت تمرین به صورت تدریجی اضافه شد، به این صورت که مدت تمرین هر جلسه از ۱۰ دقیقه در هفته اول به ۶۰ دقیقه در هفته ششم رسید و پس از آن تا اتمام دوره ثابت ماند. شدت تمرین براساس سرعت نوار گردان از ۱۷ متر بر دقیقه [حدود ۶۰ درصد $\dot{V}O_2^{peak}$] در هفته اول به ۲۷ متر بر دقیقه [حدود ۷۵ درصد $\dot{V}O_2^{peak}$] در هفته دوازدهم رسید (۲۱) (جدول ۱). در ابتدای هر جلسه رت‌ها سه دقیقه را با سرعت ۱۰ متر بر

دقیقه به‌عنوان گرم کردن می‌دویدند و سپس به‌ازای هر ۲ دقیقه ۳ متر بر دقیقه به سرعت اضافه شد تا به سرعت موردنظر برسد، در انتهای هر جلسه نیز به‌منظور سرد کردن طی ۵ دقیقه سرعت را به‌صورت تدریجی کاهش دادیم تا به ۸ متر بر دقیقه برسد.

جدول ۱. پروتکل تمرینی

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

مکمل‌دهی

رت‌های گروه مکمل و گروه تمرین به اضافه مکمل به مدت ۱۲ هفته ۵ روز در هفته عصاره چای سبز دریافت کردند. عصاره چای سبز به‌صورت کپسول ۴۰۰ میلی‌گرمی حاوی پودر عصاره چای سبز، ساخت شرکت NOW FOODS آمریکا بود که هر کپسول حاوی ۴۰ درصد پلی‌فنول بود. کپسول را باز کرده و سپس به میزان ۳۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن پودر (حدود ۷۵ میلی‌گرم برای هر رت) را در ۱ سی‌سی آب مقطر حل کردیم و به‌وسیله گاواژ به رت‌ها دادیم (۱۶).

روش آزمایشگاهی

در این مطالعه برای بررسی بیان کاسپاز-۳ در بافت قلب از روش ایمنو‌هیستوشیمی استفاده شد. برای این منظور از آنتی‌بادی کاسپاز-۳ (Caspase-3 Polyclonal Antibody) ساخت شرکت Elabscience با شماره کاتالوگ E-AB-30756 ساخت آمریکا استفاده شد. یک روز بعد از انجام آخرین جلسه تمرینی در حالت ناشتا رت‌ها جراحی شدند. ابتدا رت‌ها توسط تزریق عضلانی کتامین بی‌هوش شدند و سپس قلب حیوان برداشته شده و در داخل فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد. روش ایمنو‌هیستوشیمی پس از قرارگیری ۴۸ ساعته نمونه‌ها در فرمالین انجام گرفت (۲۲). تصاویر با میکروسکوپ نوری گرفته شد. برای تجزیه و تحلیل تصاویر و مشخص کردن میزان کاسپاز-۳ از نرم‌افزار Image J استفاده شد (۲۳)، که بیان کاسپاز-۳ را براساس درصدی از تصویر نشان داد.

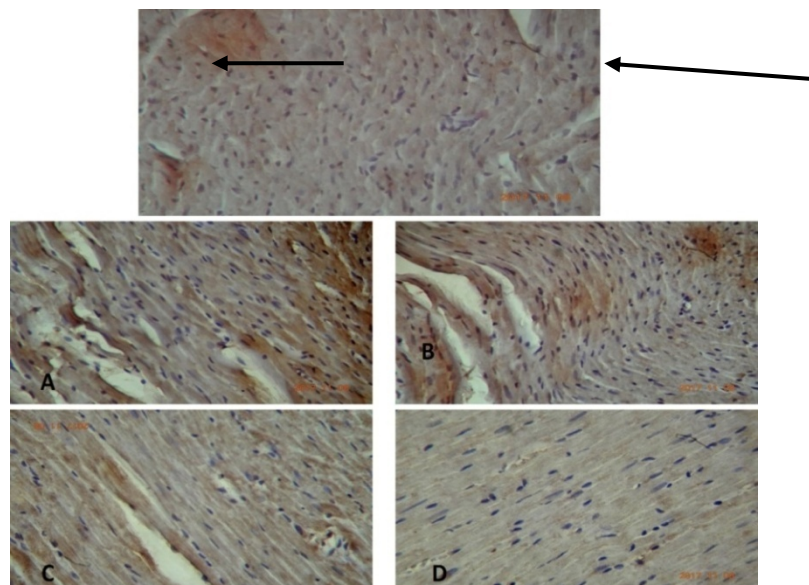
روش‌های آماری

از آمار توصیفی برای توصیف داده‌ها و رسم نمودار استفاده شد. برای بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون کولموگروف - اسمیرنوف و برای مقایسه بین گروه‌ها از آزمون تحلیل واریانس یک‌راهه

(ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. برای بررسی تجانس واریانس از آزمون لون استفاده شد. سطح معناداری $P \leq 0/05$ در نظر گرفته شد. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار Spss 24 انجام گرفت. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

یافته‌ها

شکل ۱ تصاویر ایمنوهیستوشیمی در گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد. نقاط بیان کاسپاز-۳ در تصاویر به رنگ قهوه‌ای تیره مشخص شده است. نقاط آبی هسته سلول‌ها هستند. داده‌ها براساس درصدی از کل تصویر با استفاده از نرم‌افزار Image J به دست آمدند. نتایج آزمون کولموگروف - اسمیرنوف از لحاظ آماری معنادار نبود ($Z = -0/957$, $P = 0/320$) که نشان‌دهنده توزیع طبیعی داده‌ها بود. نتایج آزمون لون از لحاظ آماری معنادار نبود ($P = 0/532$)، که نشان‌دهنده همگن بودن واریانس‌ها بود. نتایج آزمون ANOVA نشان داد که مقدار بیان کاسپاز-۳ بین گروه‌ها تفاوت معناداری دارد ($P = 0/0001$). برای مقایسه بین گروه‌ها از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد (جدول ۳). ($F = 73/276$).

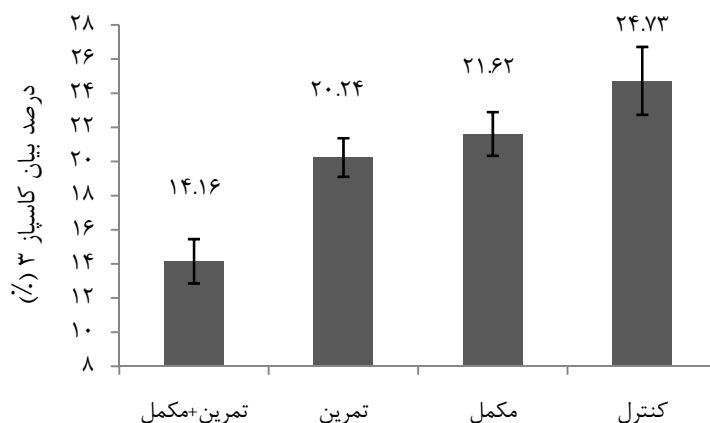


شکل ۱. تصاویر ایمنوهیستوشیمی، A گروه کنترل، B گروه مکمل، C گروه تمرین، D گروه تمرین + مکمل
جدول ۳. نتایج آزمون تعقیبی توکی

گروه‌ها	تفاوت میانگین گروه‌ها	سطح معناداری
کنترل - تمرین	۴/۴۹۲	$P=0.0001^*$
کنترل - مکمل	۳/۱۱۵	$P=0.0001^*$
کنترل - مکمل + تمرین	۱۰/۵۷۲	$P=0.0001^*$
تمرین - مکمل	-۱/۳۷۷	$P=0.259$
تمرین - مکمل + تمرین	۶/۰۸۰	$P=0.0001^*$
مکمل - مکمل + تمرین	۷/۴۵۷	$P=0.0001^*$

* سطح معناداری از لحاظ آماری $P \leq 0.05$

نمودار ۱ مقادیر بیان کاسپاز-۳ در بافت قلب را در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد. نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد که اختلاف بین همه گروه‌های تجربی با گروه کنترل معنادار است، همان‌گونه که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود، بیان کاسپاز-۳ به صورت معناداری در گروه‌های تمرین (۱۸ درصد)، مکمل (۱۳ درصد) و تمرین + مکمل (۴۳ درصد) نسبت به گروه کنترل کاهش داشت ($P \leq 0.05$). همچنین، بیان کاسپاز-۳ به صورت معناداری در گروه تمرین + مکمل نسبت به گروه‌های تمرین (۳۰ درصد) و مکمل (۳۴ درصد) کاهش داشت ($P \leq 0.05$). مقدار بیان کاسپاز-۳ در گروه تمرین نسبت به گروه مکمل پایین‌تر بود، اما از لحاظ آماری معنادار نبود ($P=0.259$).



نمودار ۱. مقادیر بیان کاسپاز-۳ در بافت قلب گروه‌های مختلف

بحث

در مطالعه حاضر مشاهده شد که ۱۲ هفته تمرین هوازی بیان کاسپاز-۳ در بافت قلب رت‌ها نر مسن را کاهش داد. هانگ^۱ و همکاران (۲۰۱۶) تأثیر ۱۰ هفته فعالیت هوازی با شدت متوسط ۵ روز در هفته و هر جلسه یک ساعت بر مسیرهای داخل سلولی و خارج سلولی آپوپتوز بافت قلب در رت‌های نر بررسی و بیان کردند که فعالیت هوازی سبب کاهش کاسپاز-۳، کاسپاز ۹، Fas لیگاند^۲، گیرنده‌های Fas^۳ و کاسپاز ۸ در بافت قلب رت‌های مسن شد (۲۴). نتایج مطالعه هانگ با نتایج مطالعه حاضر همسوست که می‌تواند به دلیل تشابه شدت فعالیت ورزشی، تعداد جلسه در هفته، مدت هر جلسه تمرینی و سن رت‌ها در هر دو مطالعه باشد. لی^۴ و همکاران (۲۰۱۳) تأثیر سه ماه فعالیت هوازی با شدت متوسط را بر فاکتورهای آپوپتوز در بافت قلب رت‌های چاق و مسن بررسی کردند و گزارش دادند که فعالیت هوازی سبب کاهش فعالیت کاسپاز ۹، کاسپاز ۸ و کاسپاز-۳ شد (۲۵). نتایج مطالعه لی با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد که ممکن است به دلایل مختلف از جمله مدت دوره فعالیت هوازی که در هر دو مطالعه تقریباً مشابه است و شدت تمرین که در هر دو مطالعه متوسط بود، باشد. کواک و همکاران (۲۰۰۶) تأثیر ۱۲ هفته تمرین هوازی بر آپوپتوز در بافت قلب رت‌های مسن را بررسی کردند و نشان دادند که ۱۲ هفته تمرین هوازی موجب کاهش سطوح کاسپاز-۳، کاسپاز ۹ و نسبت Bax به Bcl-2 در بافت قلب شد (۱۴) که با نتایج مطالعه حاضر همسوست. از جمله دلایل همخوانی مطالعه کواک با نتایج مطالعه حاضر می‌تواند مدت دوره تمرینی که در هر دو مطالعه ۱۲ هفته است و آزمودنی‌های مسن باشد.

در این مطالعه مشاهده شد که ۱۲ هفته مصرف مکمل عصاره چای سبز سبب کاهش معنادار بیان کاسپاز-۳ در بافت قلب شد. همچنین ترکیب ۱۲ هفته تمرین هوازی و مصرف عصاره چای سبز موجب کاهش معنادار بیان کاسپاز-۳ شد که این مقدار کاهش نسبت به انجام تمرین هوازی به تنهایی و مصرف عصاره چای سبز به تنهایی به صورت معناداری بیشتر بود. به بیان دیگر، انجام تمرین هوازی و مصرف چای سبز نسبت به هر کدام از آنها به تنهایی بیان کاسپاز-۳ را به صورت معناداری کاهش داد. مطالعات اندکی تأثیر عصاره چای سبز بر مسیرهای آپوپتوز را بررسی کرده‌اند. شنگ و همکاران (۲۰۱۳) تأثیر EGCG بر مسیر تلوامریک آپوپتوز در بافت قلب رت‌ها را بررسی کردند و نشان دادند که EGCG موجب

-
1. Huang
 2. Fas ligand
 3. Fas receptors
 4. Lee

کاهش آپوپتوز، کاهش تخریب DNA، کاهش مقادیر P21 و P53 در بافت قلب شد (۲۰). نتایج مطالعات شنگ و همکاران با نتایج مطالعه‌ی حاضر همسوست که علت آن می‌تواند تأثیرات آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌التهابی چای سبز باشد.

تولید بیش‌ازحد گونه‌ی فعال اکسیژن می‌تواند موجب ایجاد استرس در سلول، بافت یا اندام و همچنین آسیب DNA و آپوپتوز یا پیری شود (۲۶). استارر^۱ و همکاران چندین ژن استرس اکسیداتیو را که با بیولوژی پیری در ارتباطند، معرفی کردند. استرس اکسیداتیو پایدار به آسیب DNA و مرگ سلولی منجر می‌شود (۲۷). چای سبز نوشیدنی محبوبی است که ۳۰ درصد وزن آن در حالت خشک را پلی‌فنول‌های چای تشکیل می‌دهد. EGCG بیشترین و فعال‌ترین پلی‌فنول موجود در چای سبز است و به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی شناخته شده است که خیلی سریع از روده‌ی کوچک جذب خون می‌شود. پلی‌فنول‌های موجود در چای سبز می‌تواند رادیکال‌های آزاد را خنثی کند و کاهش دهد و حتی ممکن است از برخی آثار مخرب رادیکال‌های آزاد جلوگیری کند (۱۶). مطالعات آثار سودمند چندین آنتی‌اکسیدان از جمله ویتامین C، گلوکاتینون و N-استیل-L-سیستئین بر جلوگیری از آپوپتوز را گزارش داده‌اند (۱۷). رایس-اوانز^۲ (۱۹۹۸) نشان داد که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی EGCG از ویتامین C و ویتامین E بیشتر است (۲۸). با توجه به تأثیرات استرس اکسیداتیو بر بیولوژی پیری و خاصیت آنتی‌اکسیدانی چای سبز، به‌نظر می‌رسد که مصرف چای سبز می‌تواند تأثیر مثبتی بر آپوپتوز سلولی داشته باشد. از این‌رو احتمال دارد که کاهش بیان کاسپاز-۳ در اثر مصرف مکمل چای سبز در مطالعه‌ی حاضر ناشی از خاصیت آنتی‌اکسیدانی چای سبز باشد.

از عوامل تأثیرگذار بر آپوپتوز و پیری سلولی می‌توان به عوامل التهابی اشاره کرد. مسیر خارج‌سلولی آپوپتوز به‌وسیله‌ی فاکتورهای التهابی به‌ویژه TNF- α القا می‌شود (۳). از مهم‌ترین خواص چای سبز که بیشتر مطالعات به آن اشاره کرده‌اند، خاصیت ضدالتهابی آن است (۲۰). EGCG برای اثر بخشیدن ویژگی ضدالتهابی خود با خنثی‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروزن و دیگر رادیکال‌های آزاد، مانع انتقال NF- κ B و AP-1 و در نتیجه بیان عوامل التهابی می‌شود (۲۹). IL-8 می‌تواند تجمع نوتروفیل‌ها را تحریک کند و فعال‌سازی گونه‌های اکسیژن فعال را افزایش دهد. مشخص شده است که EGCG می‌تواند تولید IL-8 از سلول اپیتلیوم را مهار کند، بنابراین موجب کاهش شدت پاسخ التهابی می‌شود

1. Starr

2. Rice-Evans

(۳۰). علاوه بر این، تانگ^۱ و همکاران (۲۰۰۸) مشاهده کردند که EGCG بیان ژن‌های التهابی را که به وسیله گیرنده P2X4 القا می‌شوند، با سرکوب مسیر سیگنالینگ JAK1/2 تیروزین کیناز در سلول‌های اندوتلیال عروقی، مهار می‌کند (۳۱). با توجه به تأثیر عوامل التهابی در فرایند آپوپتوز و مرگ سلولی، احتمال دارد که دیگر عامل تأثیرگذار بر نتایج پژوهش حاضر در اثر مصرف عصاره چای سبز، خاصیت ضدالتهابی چای سبز باشد.

به صورت طبیعی پیری سبب کاهش عملکرد قلبی و افزایش استرس اکسیداتیو در قلب می‌شود که به مرگ سلولی از طریق اختلال عملکرد میتوکندریایی می‌انجامد. از طرفی فعالیت بدنی تأثیر مثبتی در جلوگیری از آپوپتوز در قلب مسن دارد که نشان‌دهنده تأثیرات مثبت فعالیت بدنی بر قلب در دوران پیری است (۸). با اینکه فرایند پیری سبب کاهش سلول‌های قلبی و جلوگیری از هایپرتروفی سایر سلول‌های باقیمانده می‌شود، کواک و همکاران (۲۰۰۶) گزارش دادند که نسبت وزن قلب به وزن بدن در رت‌های مسن با رت‌های جوان اختلاف معناداری ندارد (۱۴). بنابراین کاهش سلول‌های قلبی به معنی کاهش وزن قلب نیست، بلکه فرایند پیری در بافت قلب با افزایش بافت همبند، افزایش نسبت سفتی به ضخامت و کاهش خاصیت الاستیکی بافت قلب همراه است (۳۲).

بر اساس نتایج مطالعات آپوپتوز در قلب بر اثر پیری افزایش می‌یابد و فعالیت ورزشی منظم سبب کاهش آپوپتوز در قلب مسن می‌شود. در این زمینه کواک و همکاران گزارش دادند که فعالیت ورزشی منظم در بافت قلب سبب کاهش مقادیر Bax و افزایش مقادیر Bcl-2 شد (۱۴)، این نتایج توسط صوفی و همکاران (۱۲)، کو و همکاران (۳) و جعفری و همکاران (۳۳) تکرار شد. این نتایج با کاهش بیان و مقادیر پروتئین Bax و افزایش پروتئین Bcl-2 نشان‌دهنده تأثیرات آنتی‌آپوپتوزیس فعالیت بدنی در بافت قلب هنگام سالمندی است. افزایش نسبت Bax به Bcl-2 در بافت قلب در اثر پیری به فعال‌سازی آبشار کاسپازها از طریق آزادسازی سیتوکروم c، فعال‌سازی کاسپاز ۹ و سپس کاسپاز-۳ و در نهایت شکسته شدن DNA و مرگ سلولی منجر می‌شود. برعکس، فعالیت ورزشی منظم سبب کاهش سطوح کاسپاز ۹، کاسپاز-۳ و همچنین نسبت کاهش نسبت Bax به Bcl-2 در بافت قلب مسن می‌شود (۸). با توجه به این نتایج می‌توان گفت که فعالیت بدنی با سرکوب مسیر میتوکندریایی آپوپتوز به کاهش آپوپتوز منجر می‌شود. بنابراین، احتمال دارد که کاهش نسبت Bax به Bcl-2 در بافت قلب مسن در اثر

فعالیت ورزشی عامل تأثیرگذاری بر کاهش بیان کاسپاز-۳ در بافت قلب مسن در اثر فعالیت بدنی در مطالعه باشد.

براساس نتایج مطالعات مقدار پروتئین HSP70^۱ در اثر پیری در بافت قلب کاهش می‌یابد. افزایش بیان HSP70 در بافت قلب تأثیرات محافظتی دارد (۱۲). HSP70 نقش مهمی در پاسخ به سازگاری‌ها دارد و در مکانیسم‌های آنتی‌آپوپتوزیس درگیر است (۳۴). رینالدینی^۲ و همکاران (۲۰۰۶) گزارش دادند که فعالیت ورزشی منظم از طریق افزایش بیان HSP70، سبب کاهش نارسایی قلبی و بیماری‌های عروقی مرتبط با افزایش سن و آپوپتوز در بافت قلب رت‌های مسن می‌شود (۳۵). کو و همکاران (۳) و صوفی و همکاران (۱۲) نشان دادند که فعالیت بدنی منظم سطوح HSP70 را در بافت قلب مسن افزایش می‌دهد. از این‌رو، احتمال دارد که یک عامل تأثیرگذار در کاهش بیان کاسپاز-۳ بافت قلبی رت‌های مسن در اثر فعالیت هوازی در مطالعه حاضر، پاسخ پروتئین HSP70 به فعالیت هوازی و تأثیر آن بر آپوپتوز باشد.

p-p38^۳ عامل دیگری است که احتمال دارد در کاهش بیان کاسپاز-۳ بافت قلبی در اثر فعالیت هوازی در مطالعه حاضر تأثیرگذار باشد. براساس نتایج مطالعات بیان p-p38 در بافت قلب رت‌های مسن نسبت به بافت قلب رت‌های جوان بیشتر است، با این حال فعالیت هوازی منظم سبب کاهش بیان آن در بافت قلب رت‌های مسن شد (۳). تیلور^۴ و همکاران گزارش کردند که کاهش بیان پروتئین HSP70 در بافت قلب پیر با افزایش بیان p-p38 همراه است (۳۶). مطالعات نشان داده‌اند که افزایش بیان p-p38 در بافت قلب مسن به آپوپتوز و مرگ سلولی منجر می‌شود (۳۴). از این‌رو کاهش آن از طریق فعالیت بدنی می‌تواند خاصیت آنتی‌آپوپتوزی داشته باشد.

TNF- α یک مولکول پیش‌آپوپتوزی و پیش‌التهابی است که در مسیر خارج‌سلولی آپوپتوز با اتصال با گیرنده TNFR1 می‌تواند کاسپاز ۸ را فعال کرده و آپوپتوز را شروع کند. از دیگر عوامل خارج‌سلولی آپوپتوز می‌توان از Fas لیگاند و گیرنده‌های Fas نام برد که با فعال‌سازی کاسپاز ۸ سبب فعال‌سازی کاسپاز-۳ و در نهایت آپوپتوز می‌شوند (۲۴). هانگ و همکاران (۲۰۱۶) و لی و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که تمرین هوازی با شدت متوسط سبب کاهش مقادیر TNF- α ، Fas لیگاند و گیرنده‌های

-
1. 70 kilodalton heat shock proteins
 2. Rinaldi
 3. phosphorylated p38
 4. Taylor

Fas در بافت قلب شد (۲۴، ۲۵). بنابراین، احتمال دارد که سازوکار دیگر عامل کاهش کاسپاز-۳ در بافت قلب در مطالعه حاضر در اثر فعالیت بدنی سرکوب مسیر خارج سلولی آپوپتوز در اثر تمرین هوازی باشد.

نتیجه گیری

در مجموع، براساس نتایج پژوهش حاضر به نظر می‌رسد که ترکیب ۱۲ هفته تمرین هوازی با شدت متوسط و مصرف مکمل عصاره چای سبز نسبت به تمرین هوازی و مصرف مکمل چای سبز به تنهایی می‌تواند بیان کاسپاز-۳ در بافت قلب رت‌های نر مسن را کاهش دهد. همچنین، انجام تمرین هوازی یا مصرف عصاره چای سبز به تنهایی نیز موجب کاهش بیان کاسپاز-۳ در بافت قلب مسن می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه برگرفته از رساله دکتری رشته فیزیولوژی ورزشی دانشگاه ارومیه است. از تمامی عزیزانی که ما را در انجام این پژوهش یاری کردند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع و مأخذ

1. Dinh HC, Beyer I, Mets T, Onyema O, Njemini R, Renmans W, et al. Effects of physical exercise on markers of cellular immunosenescence: a systematic review. *Calcified tissue international*. 2017;100(2):193-215.
2. Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, De Simone G, Ferguson TB, Flegal K, et al. Heart disease and stroke statistics—2009 update. *Circulation*. 2009;119(3):e21-e181.
3. Ko I-G, Kim S-E, Kim C-J, Jee Y-S. Treadmill Exercise Alleviates Aging-induced Apoptosis in Rat Cardiac Myocytes. *International Journal of Gerontology*. 2013;7(3):152-7.
4. Maejima Y, Adachi S, Ito H, Hirao K, Isobe M. Induction of premature senescence in cardiomyocytes by doxorubicin as a novel mechanism of myocardial damage. *Aging cell*. 2008;7(2):125-36.
5. Shih H, Lee B, Lee RJ, Boyle AJ. The aging heart and post-infarction left ventricular remodeling. *Journal of the American College of Cardiology*. 2011;57(1):9-17.
6. Kanter M, Aksu F, Takir M, Kostek O, Kanter B, Oymagil A. Effects of low intensity exercise against apoptosis and oxidative stress in Streptozotocin-induced diabetic rat heart. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*. 2017;125(09):583-91.

7. Ashe PC, Berry MD. Apoptotic signaling cascades. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2003;27(2):199-214.
8. Kwak H-B. Effects of aging and exercise training on apoptosis in the heart. *Journal of exercise rehabilitation*. 2013;9(2):212.
9. 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. *Journal of applied physiology*. 2008;105(6):1934-43.
10. Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(49):30761-4.
11. Lu Y, Chen G-Q. Effector caspases and leukemia. *International journal of cell biology*. 2011;2011.
12. Soufi FG, Farajnia S, Aslanabadi N, Ahmadiasl N, Alipour M, Alipour M, et al. Long-term exercise training affects age-induced changes in HSP70 and apoptosis in rat heart. *General physiology and biophysics*. 2008;27(4):263.
13. Hsieh S-F, Hu G-C, Chuang Y-C, Chen C-Y, Hu Y-N. The effects and safety of exercise training in subjects with chronic heart failure—do elder subjects gain similar benefits? *International Journal of Gerontology*. 2010;4(4):165-70.
14. Kwak H-B, Song W, Lawler JM. Exercise training attenuates age-induced elevation in Bax/Bcl-2 ratio, apoptosis, and remodeling in the rat heart. *The FASEB Journal*. 2006;20(6):791-3.
15. Higdon JV, Frei B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2003;43:89-143.
16. Gad SB, Zaghoul DM. Beneficial effects of green tea extract on liver and kidney functions, ultrastructure, lipid profile and hematological parameters in aged male rats. *Global Vet*. 2013;11(2):191-205.
17. Sheng R, Gu ZL, Xie ML, Zhou WX, Guo CY. Epigallocatechin gallate protects H9c2 cardiomyoblasts against hydrogen dioxides- induced apoptosis and telomere attrition. *European journal of pharmacology*. 2010;641(2-3):199-206.
18. Li WG, Li QH, Tan Z. Epigallocatechin gallate induces telomere fragmentation in HeLa and 293 but not in MRC-5 cells. *Life sciences*. 2005;76(15):1735-46.
19. Sheng R, Gu ZL, Xie ML, Zhou WX, Guo CY. EGCG inhibits proliferation of cardiac fibroblasts in rats with cardiac hypertrophy. *Planta medica*. 2009;75(2):113-20.
20. Sheng R, Gu ZL, Xie ML. Epigallocatechin gallate, the major component of polyphenols in green tea, inhibits telomere attrition mediated cardiomyocyte apoptosis in cardiac hypertrophy. *International journal of cardiology*. 2013;162(3):199-209.
21. Hoydal MA, Wisloff U, Kemi OJ, Ellingsen O. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *European journal of cardiovascular prevention and rehabilitation : official journal of the European Society of*

- Cardiology, Working Groups on Epidemiology & Prevention and Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology. 2007;14(6):753-60.
22. Keele JA, Stayton MM. Immunohistochemistry in the Heart: A Protocol Manual 2008 [cited 2016 Aug 12]. Available from: http://www.uwyo.edu/molecbio/faculty-and-staff/mark-stayton/_files/ihc-heart-protocols.pdf.
 23. Siagian M, Lousiana M, Santoso DI, Endardjo S. Effects of anaerobic exercise and detraining on the caspase-3 expression of rat ventricular cardiomyocyte. Medical Journal of Indonesia. 2015;24(2):84.
 24. Huang C-Y, Lin Y-Y, Hsu C-C, Cheng S-M, Shyu W-C, Ting H, et al. Antiapoptotic effect of exercise training on ovariectomized rat hearts. Journal of Applied Physiology. 2016;121(2):457-65.
 25. Lee S-D, Shyu W-C, Cheng I-S, Kuo C-H, Chan Y-S, Lin Y-M, et al. Effects of exercise training on cardiac apoptosis in obese rats. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases. 2013;23(6):566-73.
 26. Arsenis NC, You T, Ogawa EF, Tinsley GM, Zuo L. Physical activity and telomere length: Impact of aging and potential mechanisms of action. Oncotarget. 2017;8(27):45008-19.
 27. Starr JM, Shiels PG, Harris SE, Pattie A, Pearce MS, Relton CL, et al. Oxidative stress, telomere length and biomarkers of physical aging in a cohort aged 79 years from the 1932 Scottish Mental Survey. Mechanisms of ageing and development. 2008;129(12):745-51.
 28. Rice-Evans C. Implications of the mechanisms of action of tea polyphenols as antioxidants in vitro for chemoprevention in humans. Proceedings of the Society for experimental Biology and Medicine. 1999;220(4):262-6.
 29. Tedeschi E, Menegazzi M, Yao Y, Suzuki H, Förstermann U, Kleinert H. Green tea inhibits human inducible nitric-oxide synthase expression by down-regulating signal transducer and activator of transcription-1 α activation. Molecular pharmacology. 2004;65(1):111-20.
 30. Kim I-B, Kim D-Y, Lee S-J, Sun M-J, Lee M-S, Li H, et al. Inhibition of IL-8 production by green tea polyphenols in human nasal fibroblasts and a549 epithelial cells. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2006;29(6):1120-5.
 31. Tang Y, Matsuoka I, Ono T, Inoue K, Kimura J. Selective up-regulation of P2X4-receptor gene expression by interferon- γ in vascular endothelial cells. Journal of pharmacological sciences. 2008;107(4):419-27.
 32. Lakatta EG, Sollott SJ. The “heartbreak” of older age. Molecular interventions. 2002;2(7):431.
 33. 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 and Tissue. 2015;2(4).
 34. Aceros H, Farah G, Cobos-Puc L, Stabile A, Noiseux N, Mukaddam-Daher S. Moxonidine improves cardiac structure and performance in SHR through inhibition of cytokines, p38 MAPK and Akt. British journal of pharmacology. 2011;164(3):946-57.

35. Rinaldi B, Corbi G, Boccuti S, Filippelli W, Rengo G, Leosco D, et al. Exercise training affects age-induced changes in SOD and heat shock protein expression in rat heart. *Experimental gerontology*. 2006;41(8):764-70.
36. Taylor R, Starnes JW. Age, cell signalling and cardioprotection. *Acta Physiologica*. 2003;178(2):107-16.

Effect of 12 weeks aerobic training and oral green tea extract on cardiac caspase-3 expression in aged male rats

Mirza Hossein Norouzi Kamareh¹ - Mohammad Reza

Zolfaghari^{*2} - Firouz Ghaderi Pakdel³ - Javad Tolouei Azar⁴

1. PhD Student of exercise physiology, Faculty of Sport Sciences, Urmia University, Urmia, Iran 2,4. Assistant Professor of exercise physiology, Faculty of Sport Sciences, Urmia University, Urmia, Iran 3. Associate Professor of Physiology, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

(Recive:2017/11/14;Accept:2018/2/21)

Abstract

Aim: The incidence of heart failure increases with age. Cardiomyocyte apoptosis contributes to the pathogenesis of heart failure. The aim of this study was to evaluate the effect of 12 weeks aerobic training and oral green tea extract on cardiac caspase-3 expression in aged male rats. **Methodology:** In this study, 32 aged male rats were randomly divided into 4 groups: control, exercise, supplement and exercise + supplement. Exercise groups performed at intensity of 60-75% of vo₂peak aerobic exercise for 12 weeks and 5 days per week; meantime, the supplementary groups consumed green tea extract. Immunohistochemistry method was used to measure the expression of caspase-3. Data was analyzed by ANOVA and Tukey's post hoc test. **Results:** The results show that caspase-3 expression was significantly lower in exercise group (18%), supplement group (13%) and exercise + supplement group (43%), than the control group ($p \leq 0.05$). Also, caspase-3 expression was significantly lower in exercise + supplement group than exercise group (30%) and supplement group (34%) ($p \leq 0.05$). **Conclusion:** According to the results of this of this study, combination of 12 weeks of moderate-intensity aerobic training with supplementation of green tea extract can decreased the expression of cardiac caspase-3 than aerobic training and supplementation of green tea alone.

Keywords

Aging, aerobic training, caspase-3, green tea.

*. Corresponding Author: E-mail: m.zolfaghari@urmia.ac.ir Tel: +989143413941