Medical Journal
of
Tabriz University of Medical Sciences

Original Article

Effect of 8 weeks high-intensity interval training (HIIT) with and without caloric restriction on gene expression of myocardial *Bax* and *Bcl2* in mice

Mohammad Reza Zareli[1], Zaher Etemad[2]*, Kamal Azizbeigi[2], Pouran Karimi[3]

[1]PhD Student in Sports Physiology, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran
[2]Department of Physical Education, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran
[3]Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
*Corresponding author; E-mail: zetemad2002@yahoo.com

Received: 4 Aug 2019 Accepted: 22 Oct 2019 First Published online: 17 April 2021
Med J Tabriz Uni Med Sciences. 2021;43(1):124-133

Abstract

Background: Apoptosis is the physiological cell death that in natural conditions leads to the elimination of old, damaged, waste, and harmful cells. The aim of this study was the effect of eight weeks of high-intensity interval training (HIIT) with and without caloric restriction on gene expression of myocardial *Bax* and *Bcl2* in mice**.**

Methods: Present study was an experimental multi-group design with a control group conducted on 30 two-month old male mice. Subjects were divided into five homogenous groups including base control, control, caloric restriction, interval exercise training, and caloric restriction + interval exercise training. Training groups participated in interval exercise training five sessions per week for 8 weeks. The level of gene expression of myocardial *Bax* and *Bcl2* was evaluated by real-time PCR. Data were analyzed using the one-way ANOVA at the level of ($P<0.05$).

Results: The results showed that the training group had a significant increase in gene expression of myocardial *Bcl2* in comparison with caloric restriction + exercise training ($P<0.05$) and a significant decrease in gene expression of myocardial *Bax* compared to the caloric restriction group ($P<0.05$). Also, exercise training and exercise training + caloric restriction significantly increased the gene expression of myocardial *Bcl2* and significantly decreased *Bax*/*Bcl2* ratio compared to caloric restriction, base control, and control ($P< 0.05$).

Conclusion: It seems that high-intensity interval training without caloric restriction would provide a suitable environment for increasing the integrity of the mitochondrial membrane of myocardial cells and possibly apoptosis.

Keywords: High-intensity interval training, Caloric restriction, *Bax*, *Bcl2*

How to cite this article: Zareli MR, Etemad Z, Azizbeigi K, Karimi P. [Effect of 8 weeks high-intensity interval training (HIIT) with and without caloric restriction on gene expression of myocardial Bax and Bcl2 in mice]. Med J Tabriz Uni Med Sciences. 2021;43(1):124-133. Persian.

© 2021 The Author. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

مقاله پژوهشی

تاثیر ۸ هفته تمرین تناوبی با شدت بالا (HIIT) با و بدون محدودیت کالری بر میزان بیان ژن پروتیئن‌های BAX و BCL-2 میوکارد موش‌های نر صحرایی

محمدرضا زارعلی[۱]، ظاهر اعتماد[۲*]، کمال عزیزبیگی[۲]، پوران کریمی[۳]

[۱]دانشجو دکترا فیزیولوژی ورزشی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران
[۲]گروه تربیت بدنی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران
[۳]گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
[*]نویسنده مسؤول؛ ایمیل: zetemad2002@yahoo.com

دریافت: ۱۳۹۸/۵/۱۳ پذیرش: ۱۳۹۸/۷/۳۰ انتشار برخط: ۱۴۰۰/۱/۲۸
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز. ۱۴۰۰؛ ۴۳(۱):۱۲۴-۱۳۳

چکیده

زمینه: آپوپتوز، مرگ فیزیولوژیک سلولی است که در شرایط طبیعی سبب حذف سلول‌های پیر، آسیب دیده، اضافی و مضر می‌شود. هدف از پژوهش حاضر بررسی تاثیر ۸ هفته تمرین تناوبی با شدت بالا (HIIT) با و بدون محدودیت کالری بر میزان بیان ژن پروتئین‌های BAX و BCL-2 میوکارد موش‌های نر صحرایی بود.

روش‌کار: مطالعه حاضر در قالب یک طرح تجربی چند گروهی با گروه کنترل روی ۳۰ سر موش صحرایی نر دو ماهه انجام گردید. آزمودنی‌ها در پنج گروه کنترل پایه، کنترل، محدودیت کالری، تمرین و تمرین +محدودیت کالری جایگزین شدند. گروه‌های تمرینی برای ۵ روز در هفته به مدت ۸ هفته در برنامه تمرین تناوبی با شدت بالا شرکت کردند. میزان بیان ژن پروتئین‌های BAX و BCL2 میوکارد با روش Real Time-PCR بررسی شد. داده‌ها توسط آزمون آنالیز واریانس یک طرفه در سطح معنی‌داری (p<۰/۰۵) تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که گروه تمرین افزایش معنی‌داری در بیان ژن پروتئین Bcl2 میوکارد نسبت به گروه محدودیت کالری + تمرین (p<۰/۰۵) و کاهش معنی‌داری در بیان ژن پروتئین BAX میوکارد نسبت به گروه محدودیت کالری داشت (p<۰/۰۵). همچنین گروه تمرین و تمرین + محدودیت کالری افزایش معنی‌داری در بیان ژن پروتئین Bcl2 میوکارد و کاهش معنی‌داری در نسبت BAX به Bcl2 نسبت به گروه محدودیت کالری، کنترل پایه و کنترل (p<۰/۰۵) داشت.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می رسد که تمرین تناوبی با شدت بالا بدون محدودیت کالری محیط مناسبی را برای افزایش یکپارچگی غشای میتوکندری سلول‌های میوکارد و احتمالا توقف آپوپتوز فراهم کند.

کلید واژه‌ها: تمرین تناوبی با شدت بالا، محدودیت کالریایی، BAX، Bcl2

نحوه استناد به این مقاله: زارعلی م ر، اعتماد ض، عزیزبیگی ک، کریمی پ. تاثیر ۸ هفته تمرین تناوبی با شدت بالا (HIIT) با و بدون محدودیت کالریایی بر میزان بیان ژن پروتئین‌های BAX و BCL-2 میوکارد موش‌های نر صحرایی. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز. ۱۴۰۰؛ ۴۳(۱):۱۲۴-۱۳۳

حق تالیف برای مولفان محفوظ است.
این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کریتیو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

آپوپتوز، مرگ فیزیولوژیک سلولی است که در شرایط طبیعی سبب حذف سلول‌های پیر، آسیب دیده، اضافی و مضر می‌شود و برای تکامل و هموستاز بافتی ضروری است. آپوپتوز در ترمیم و نوسازی بافتی و نیز حذف سلول‌های خود واکنش‌گر نقش دارد (۱). این فرآیند فیزیولوژیکی از طریق دو مسیر داخل و خارج سلولی رخ می‌دهد. مسیر خارجی با اتصال لیگاندهای مهم مانند TNFα و Fas به گیرنده‌های غشایی القاکننده مرگ راه اندازی می‌شود. در حالی که مسیر داخلی به عنوان مهم‌ترین مسیر ایجاد آپوپتوز، با تغییراتی در نفوذپذیری میتوکندری و آزادسازی عوامل آپوپتوزی همراه است. به هر حال، واکنش‌های مولکولی آپوپتوز به واسطه تعادل بین پروتئین‌های ویژه تنظیمی پیش و ضد آپوپتوزی تنظیم می‌شود. در این بین پروتئین‌های BAX و Bcl2 به عنوان پروتئین‌های اصلی در شکل‌گیری آپوپتوز و پیام‌های آپوپتوز میتوکندری درگیر می‌شوند (۴-۲). بر اساس نتایج مطالعات اخیر مسیر پیام‌رسانی WNT و پروتئین‌های وابسته به این مسیر (GSK3 و β-کاتنین) به عنوان عوامل تنظیم‌گر بالادست آپوپتوز و خانواده Bcl2 هستند، به طوری که احتمال آن وجود دارد که فعال‌سازی مسیر WNT، با مهار انتخابی GSK3-β مانع فسفریله شدن β- کاتنین و تجمع آن در سیتوزول شده و در نهایت باعث بروز پروتئین ضد آپوپتوزی Bcl2 می‌شود. در حالی که کاهش پروتئین β- کاتنین و افزایش GSK3-β ممکن است موجب افزایش بیان و جابجایی عوامل پیش آپوپتوزی مانند پروتئین‌های BAX و BIM و تسریع آپوپتوز شود (۸-۵). نشان داده شده است که اجزای مکانیسم مرگ سلولی در طول تجزیه ارگانل‌ها استفاده شده‌اند. طبق این نظریه، تجزیه ارگانل‌ها شکلی از مرگ سلولی تقلیل یافته است. در حمایت از این نظریه مشاهده شد که بیان ژن BCL-2 – که یک مولکول ضد آپوپتوزی است – باعث کاهش یا به تاخیر انداختن تجزیه ارگانل‌ها در مسی رهای تمایزی می‌شود (۹). نفوذپذیری غشا میتوکندری به سیتوکروم C توسط نسبت واسطه‌های پروآپوپتوتیک و آنتی‌آپوپتوتیک از قبیل BAX یا BAK کنترل شده و متعاقب آن آپوپتوز سلولی را تحریک می‌کند. جلوگیری از آسیب سلول‌های میوکاردی قلبی به دنبال آپوپتوز بسیار با اهمیت است و در چند سال اخیر تاثیر تمرینات مختلف روی آپوپتوز مورد توجه بسیاری از پژوهشگران علوم ورزشی بوده و نشان دادند که آپوپتوز و مرگ سلولی می‌تواند با تمرینات ورزشی رخ دهد (۱۰). با این حال، پژوهشگران همواره به دنبال اتخاذ راهکارهای مناسب برای حمایت از میوکارد در مقابل آپوپتوز و آسیب‌های احتمالی مرتبط با آن هستند. در سال‌های اخیر، تاثیر محدودیت کالری و تمرینات ورزشی بر فرآیند آپوپتوز توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده است. نتایج برخی از مطالعات اشاره دارد که محدودیت کالری پایین تا متوسط (بدون سوتغذیه) ممکن است به عنوان یک رویکرد ضد آپوپتوزی عمل کند.

نکات کاربردی

با توجه به نتایج تحقیق حاضر به نظر می‌رسد احتمالاً تمرین تناوبی با شدت بالا بدون محدودیت کالری محیط مناسبی را برای جلوگیری از آپوپتوز ایجاد کرده و مرگ سلولی را با تاخیر روبه رو کند.

در این راستا، نیمان و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که ۶ ماه محدودیت کالری (۴۰ درصد کمتر از مقدار مورد نیاز) موجب کاهش قطعه قطعه شدن DNA و بیان پروتئین BAX و افزایش بیان پروتئین Bcl2 در میوکارد موش‌های صحرایی می‌شود. نیمان معتقد بود که کاهش فعالیت کمپلکس I میتوکندری و افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) که همراه با تغییرات عملکرد میتوکندری است، مهمترین دلیل افزایش فرآیند آپوپتوز در سلول‌های قلبی بوده و احتمالا محدودیت کالری با کاهش تولید ROS قادر به ممانعت از افزایش فرآیند آپوپتوز در این بافت حیاتی شود (۱۱). به علاوه مارزتی و همکاران (۲۰۰۹) در مقاله‌های مروری اشاره داشتند که محدودیت کالری ملایم با بیان پروتئین‌های ضد آپوپتوزی مانند Bcl2 و تعدیل مناسب آپوپتوز می‌تواند موجب حفاظت از میوکارد شود (۱۲). در حالی که نتایج پاتل و همکاران (۲۰۱۰) حاکی از آن است که یک دوره محدودیت کالری طولانی‌مدت ۶۰- درصدی موجب افزایش آپوپتوز در عضله اسکلتی موشی خانگی می‌شود. بر این اساس، محدودیت کالری طولانی مدت با افزایش فشار اکسایشی و کاهش HSP70 سلولی، موجب افزایش پروتئین پیش آپوپتوزی BAX و تسریع فرآیند آپوپتوز می‌شود. به عبارتی، فشارهای متابولیکی و اکسایشی- التهابی ناشی از محدودیت کالری به نسبت بالا ممکن است در بروز آپوپتوز شدید و عواقب بعدی آن موثر باشد (۱۳).

برخی از پژوهش‌ها به تسریع فرآیند آپوپتوز متعاقب تمرینات ورزشی اشاره دارند. زین و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که ۶ ماه تمرین استقامتی موجب کاهش بیان پروتئین BcI2 و افزایش بیان پروتئین BAX در میوکارد موش‌های صحرایی می‌شود (۱۴). به هر حال، با توجه به فشارهای به نسبت زیاد حین اردوها و رقابت‌های ورزشی سنگینی که در برخی از رشته‌های ورزشی وزنی به ورزشکاران اعمال می‌شود، این نکته یکی از نگرانی‌ها و چالش‌های جدی است که ذهن پژوهشگران و متخصصین ورزشی و حتی خود ورزشکاران را مشغول کرده است (۱۵).

به طوری که برخی محققین معتقدند که با اعمال محدودیت کالری حین تمرینات بدنی ممکن است میزان آپوپتوز و عواقب بعدی آن در حین یا پس از دوران ورزشی بیشتر شود. هر چند تاکنون مطالعه جامعی در این زمینه انجام نشده است. تمرینات تناوبی نوعی از تمرینات ورزشی است که شامل دوره‌های متغیری از فعالیت‌های ورزشی هوازی شدید با دوره‌های بازیابی غیرفعال یا فعالیت با شدت متوسط است (۱۶). با توجه به تاثیر بهتر

تمرینات تناوبی بر برخی شاخص‌ها از جمله ظرفیت هوازی و افزایش استفاده از این تمرینات توسط ورزشکاران و افراد عادی و حتی برخی بیماران، اثر این نوع از تمرینات بر آپوپتوز موضوع مهمی است. به عبارتی، اغلب مطالعات اثر تمرین ورزشی و محدودیت کالری را بر فرآیندهای آپوپتوزی به شکل مجزا بررسی کرده‌اند. لذا شناسایی اثر تمرینات ورزشی با و بدون محدودیت کالری کاهنده وزن بر آپوپتوز میوکارد جهت کاهش بیماری‌ها و آسیب‌های ناشی از آن در بین همه افراد جامعه به ویژه ورزشکاران یک ضرورت انکارناپذیر است. با توجه به اینکه تفاوت شدت و مدت تمرینات هوازی استفاده شده در مطالعات مختلف موجب نتایج متناقضی شده است و تاکنون مطالعه جامعی به ویژه در داخل کشور در زمینه تاثیر تمرینات هوازی با شدت بالاتر از متوسط بر آپوپتوز عضله اسکلتی و تغییرات احتمالی مولکولی و پروتئین‌های درگیر در آپوپتوز انجام نشده و اغلب مطالعات برخی جنبه‌های مورفولوژیکی آپوپتوز طی فعالیت ورزشی حاد را آزمایش کرده‌اند، انتظار می‌رود با انجام تحقیق حاضر بتوان ضمن پاسخ به برخی ابهامات موجود و تعیین تاثیر تمرینات ورزشی بر آپوپتوز، پیشنهادهای کاربردی متناسبی در راستای نحوه انجام تمرینات و نیز پیش‌بینی پیامدهای احتمالی ناشی از تمرین همراه با محدودیت کالری ارایه داد.

روش‌کار

پژوهش حاضر از نوع تجربی بود که به روش آزمایشگاهی اجرا شد و در آن تاثیر ۸ هفته تمرین تناوبی با شدت بالا (HIIT) با و بدون محدودیت کالری بر میزان بیان ژن پروتیئن‌های BAX، BCL-2 میوکارد و نسبت BAX به BCL-2 موش‌های نر صحرایی بررسی شد. با توجه به شرایط مناسب مدل حیوانی برای مطالعه حاضر، ۳۰ سر موش صحرایی نر دو ماهه‌ای ویستار از انستیتو پاستور ایران خریداری شد که پس از آشنایی با شرایط آزمایشگاه به پنج گروه شش‌تایی (گروه کنترل پایه، کنترل، محدودیت کالری، تمرین و تمرین + محدودیت کالری) تقسیم شدند (جدول ۱).

گروه کنترل پایه در ابتدای دوره پژوهش برای کنترل متغیرهای پایه و بعنوان گروه مرجع به روش آزمایشگاهی مورد نظر جراحی شد. همه موش‌ها به مدت ۱۴ روز تحت برنامه آشنایی با نحوه فعالیت روی نوارگردان قرار گرفتند.

آزمودنی‌های گروه کنترل و تمرین به صورت آزادانه از غذایی استاندارد و آب در طول پژوهش استفاده کردند. برای تعیین مقدار غذای مصرفی گروه‌های محدودیت کالری و تمرین + محدودیت کالری و اعمال محدودیت کالری برای آنها، مقدار غذای مصرفی سایر آزمودنی‌ها به طور روزانه اندازه‌گیری شد و گروه‌های دارای محدودیت، ۵۰ درصد مقدار غذای مصرفی سایر گروه‌ها را دریافت کردند. تمامی موش‌های صحرایی، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین به روش بدون درد توسط متخصصین کارآزموده کشته و جراحی شدند. سپس بخشی از بافت بطن چپ آزمودنی‌ها با دقت برداشت شد و برای بررسی میزان بیان ژنی یا mRNA پروتئین‌های BAX و BCI2 از روش RT-PCR استفاده شد. **پروتکل تمرین:** جهت جلوگیری از استرس و تغییر شرایط فیزیولوژیکی، نمونه‌ها به مدت دو هفته تحت شرایط جدید نگهداری شدند. دما (۲±۲۲ سانتی‌گراد)، رطوبت محیط (۵±۵۰ درصد) و چرخه روشنایی- تاریکی ۱۲:۱۲ ساعته کنترل شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۴ روز تحت برنامه آشنایی با نحوه فعالیت روی نوارگردان قرار گرفتند. طی این دوره، شیب نوار گردان صفر درصد، سرعت ۱۵- ۱۰ متر بر دقیقه و مدت تمرین ۱۰-۵ دقیقه در روز بود. در پایان این دوره، موش‌ها پس از مطابقت وزنی به طور تصادفی به پنج گروه کنترل، کنترل پایه، محدودیت کالری، تمرین و تمرین + محدودیت کالری تقسیم شدند. دو گروه تمرین و تمرین + محدودیت کالری برای ۵ روز در هفته (یکشنبه، دوشنبه، سه شنبه، پنج شنبه و جمعه) و به مدت ۸ هفته در برنامه تمرین تناوبی با شدت بالا (۱۰۰-۹۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه، مدت ۶۰ دقیقه و سرعت ۵۳-۲۸ متر بر دقیقه) روی نوارگردان الکترونیکی هوشمند حیوانی شرکت کردند. شدت نسبی کار در سرتاسر برنامه تمرین معادل ۱۰۰-۹۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه (۵۳-۲۸ متر بر دقیقه) حفظ شد.

جراحی حیوانات آزمایشگاهی و استخراج نمونه

همه آزمودنی‌ها طبق برنامه از پیش تعیین شده و با استفاده از شیوه مناسب، کشته و جراحی شدند. در این تحقیق سعی بر آن بود تا حیوانات در کمترین زمان ممکن و با حداقل درد و آزار کشته شوند. بنابراین با مشاوره جراح و مطالعه انواع روش‌های آسان‌کشی (Euthanasia)، تصمیم بر آن شد تا با بیهوش نمودن حیوان، عمل مورد نظر صورت گیرد. 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، سپس بخشی از بافت بطن چپ آزمودنی‌ها با دقت برداشت شد و برای بررسی میزان بیان ژنی یا mRNA پروتئین‌های BAX و BCL2 از روش RT-PCR استفاده شد.

ساخت cDNA

طبق دستورالعمل کیت Standard cDNA Synthesis Revert AID TM First یک میکرولیتر RNA و یک میکرولیتر از DNase I reaction buffer 10X در یک لوله ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شده و توسط DEPC-traeted water به حجم ۹ میکرولیتر رسید. برای از بین بردن آلودگی احتمالی با DNA ، یک میکرولیتر DNase به لوله اضافه و پس از افزودن یک میلی‌لیتر از اتانول مطلق، لوله مربوطه به

مدت ۳۰ دقیقه در فریزر منفی ۷۰ درجه قرار گرفت. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط ۴ درجه و ۱۴۰۰۰ g سانترفیوژ شد و پس از آن، در زیر هود به دقت اتانول آن خالی شده و حدود ۱۰ دقیقه اجازه داده شد تا الکل تبخیر شود. به لوله یک میکرولیتر DEPC– treated water و یک میکرولیتر پرایمر oligi (dt) یا پرایمر Random hexamer 5x افزوده شد و ۵ دقیقه در دما ۷۰ درجه روی Dry block انکوبه گردید. چهار میکرولیتر reaction buffer 5X و دو میکرولیتر dNTP 10mM mix و یک میکرولیتر Ribo lock Ribo nuclease Transcription Inhibitor به لوله افزوده شد و پس از سانترفیوژ مختصر، به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه گردید. یک میکرولیتر آنزیم Rverert AidTM H Minus M-MuLV. Reverse به لوله قبل افزوده شد. در ادامه در صورت استفاده از پرایمر oligo (dt) ، ۶ دقیقه در ۴۲ درجه و در صورت استفاده از پرایمر Random hexamer، ابتدا ۵ دقیقه در ۲۵ درجه و به دنبال آن ۹۰ دقیقه در ۴۲ درجه انکوبه شد. واکنش با قرار دادن لوله به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه پایان یافت و نمونه در فریزر منفی ۷۰ درجه نگهداری شد.

Real-time PCR

برای اندازه‌گیری 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 Primer نسخه ۳ طراحی و توسط بایونیر (Bioneer, Germany) سنتز شده و برای کار با غلظت نهایی 100 nm استفاده شدند.

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 (Melting curve) 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 ΔCt ژن در هر نمونه از افتراق Ct ژن مربوطه و Ct ژن β-actin به عنوان رفرنس محاسبه شد. فرمول‌ها برای محاسبه به ترتیب زیر است:

$$\Delta CT = CT\ target - CT\ reference$$
$$\Delta\Delta CT = \Delta CT\ test\ sample - \Delta CT\ control\ sample$$

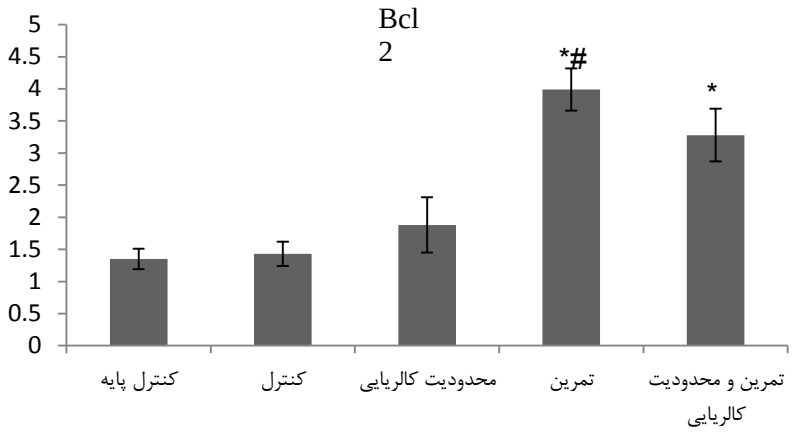
بعد از جمع‌آوری داده‌های حاصل از پژوهش، از آمار توصیفی برای توصیف داده‌ها استفاده شد. در ادامه با آزمون شاپیرو– ویلک نرمال بودن توزیع آنها بررسی شد. داده‌های حاصله با روش آماری تحلیل واریانس یک طرفه در سطح معنی‌داری کمتر از ۵ درصد ($P<0.05$) به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

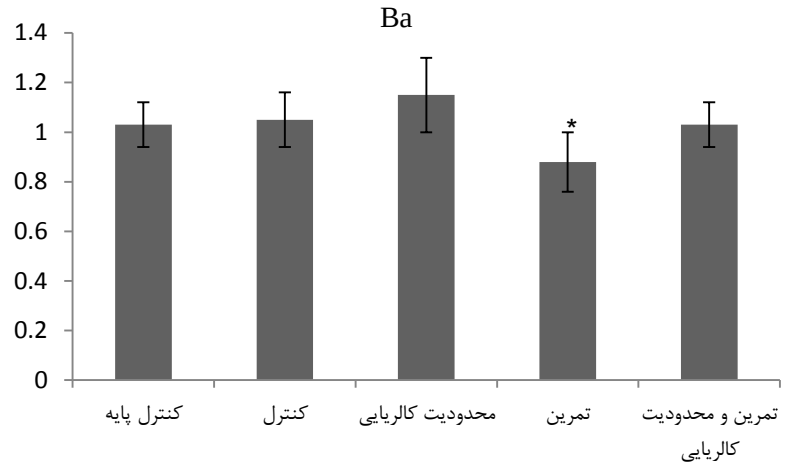
نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد که تفاوت معنی‌داری در میزان بیان ژن پروتئین Bcl2 (p=۰/۰۰۰)، BAX (p=۰/۰۰۸) و نسبت BAX به Bcl2 (p=۰/۰۰۰) میوکارد موش‌های نر صحرایی وجود دارد. نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد که گروه تمرین و محدودیت کالری و تمرین نسبت به گروه کنترل پایه، کنترل و محدودیت کالری افزایش معنی‌داری در میزان بیان ژن پروتئین Bcl2 میوکارد داشتند (p<۰/۰۵). از سوی دیگر گروه تمرین نیز افزایش معنی‌داری در میزان بیان ژن پروتئین Bcl2 میوکارد نسبت به گروه تمرین و محدودیت کالری داشت (p<۰/۰۵) (نمودار شماره ۱). همچنین نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد که گروه محدودیت کالری نسبت به گروه تمرین افزایش معنی‌داری در میزان بیان ژن پروتئین BAX میوکارد داشت (p<۰/۰۵) (نمودار شماره ۲). نتایج آزمون تعقیبی توکی نیز نشان داد که گروه کنترل پایه، کنترل و محدودیت کالریایی نسبت به گروه تمرین و محدودیت کالریایی و تمرین و نیز گروه کنترل پایه نسبت به گروه محدودیت کالریایی افزایش معنی‌داری در نسبت BAX به Bcl2 میوکارد داشتند (p<۰/۰۵) (نمودار شماره ۳).

جدول ۱: مشخصات توصیفی موش‌ها

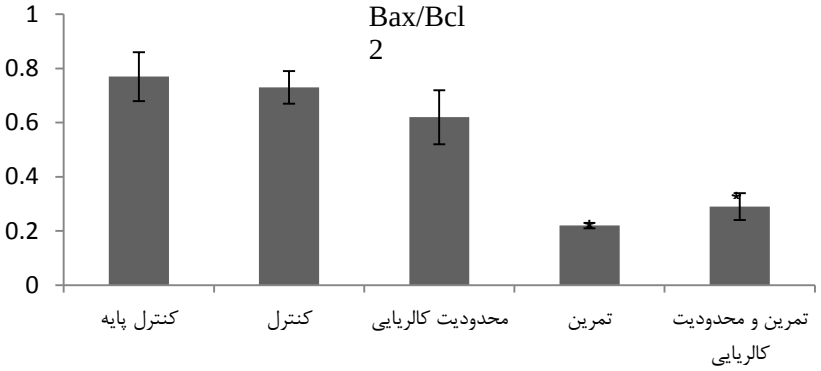
گروه	وزن بدن	وزن قلب	نسبت وزن قلب به وزن بدن
کنترل پایه	۱۷۳/۳۷±۱۱/۹۶	۰/۵۵۶±۰/۰۶	۳/۱۰±۰/۲۴
کنترل	۳۹۹/۱۳±۱۸/۶۷	۱/۰۴±۰/۰۷	۲/۶۲±۰/۱۷
محدودیت کالریایی	۳۳۲/۰۳±۷/۶۹	۱/۰۶±۰/۰۵	۳/۲۰±۰/۲۲
تمرین	۳۴۵/۲۶±۸/۹۷	۱/۲۰±۰/۰۶	۳/۴۹±۰/۲۱
تمرین و محدودیت کالریایی	۳۲۲/۹۳±۱۰/۴۱	۱/۱۰±۰/۰۲	۳/۴۰±۰/۱۳



نمودار ۱: تغییرات Bcl2 در گروه‌های مختلف (* تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل پایه، کنترل و محدودیت کالری، # تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه تمرین و محدودیت کالری)



نمودار ۲: تغییرات BAX در گروه‌های مختلف (* تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه محدودیت کالری)



نمودار ۳: تغییرات نسبت BAX/Bcl2 در گروه‌های مختلف (* تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل پایه، کنترل و محدودیت کالری)

بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که گروه تمرین افزایش معنی‌داری در بیان ژن پروتئین Bcl2 میوکارد نسبت به گروه محدودیت کالری و تمرین و کاهش معنی‌داری در بیان ژن پروتئین BAX میوکارد نسبت به گروه محدودیت کالری داشت. همچنین گروه تمرین و تمرین و محدودیت کالری افزایش معنی‌داری در بیان ژن پروتئین Bcl2 میوکارد و کاهش معنی‌داری در نسبت BAX به Bcl2 نسبت به گروه محدودیت کالری، کنترل پایه و کنترل داشتند.نتایج با یافته‌های وینشتاین و همکاران (۲۰۱۱)، هونگ و همکاران (۲۰۱۲)، گایو و همکاران (۲۰۱۳)، نیمان و همکاران (۲۰۱۰) و مارزتی و همکاران (۲۰۰۹) همسو بود. وینشتاین و همکاران (۲۰۱۱) در پژوهش خود به این نتیجه رسیدند که سطوح شاخص‌های BAX/Bcl2 قلبی در حیوانات تمرین کرده کاهش یافته بود. میزان پروتئین BAX میتوکندری و سیتوکروم C سیتوزولی تحت شرایط فشار اکسایشی تنها در عضله قلبی افزایش نشان داد. این پژوهشگران اشاره داشتند که فشار اکسایشی کوتاه مدت در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند موجب القا پیام‌های آپوپتوزی در عضلات مخطط گردد. به علاوه تمرین می‌تواند فشار اکسایشی ناشی از آپوپتوز را در بافت‌های ویژه‌ای کاهش دهد که اثر آن در عضله قلبی بیشتر برجسته است (۱۶).

گایو و همکاران (۲۰۱۳) نیز در مطالعه ای اثر ۶ هفته تمرین تردمیل (روزی ۳۰ دقیقه) بر شاخص‌های آپوپتوزیس فرایند پیری در سلول‌های قلبی موش‌ها را بررسی کردند. با افزایش سن، BAX افزایش یافته و HSP۷۰ در گروه تمرین نکرده کاهش یافته بود. با این وجود تمرین مانع کاهش HSP۷۰ و افزایش BAX شده بود و محققان پیشنهاد کردند تمرین ورزشی با کاهش آپوپتوز سلول‌های قلبی از افت عملکرد قلب جلوگیری می‌کند و ظرفیت قلبی‌عروقی را بهبود می‌بخشد که می‌تواند خطر بیماری‌های قلبی‌عروقی را از این طریق کاهش دهد (۱۸). در این بین برخی از مطالعات اشاره دارند که محدودیت کالری پایین تا متوسط (بدون سوتغذیه) ممکن است به عنوان یک رویکرد ضد آپوپتوزی عمل کند. این مطالعات عنوان داشتند که محدودیت کالری می‌تواند موجب کاهش آسیب‌های DNA و افزایش ظرفیت بازسازی آن، کاهش بیان عوامل پیش آپوپتوزی و افزایش بیان ضد آپوپتوزی شود (۱۹). در این راستا، نیمان و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که ۶ ماه محدودیت کالری (۴۰- درصد) موجب کاهش پروتئین‌های پیش آپوپتوزی در میوکارد موشهای صحرایی می‌شود. نتایج این پژوهشی حاکی از آن بود که محدودیت کالری موجب کاهش قطعه قطعه شدن DNA میتوکندریایی، کاهش بیان پروتئین BAX و افزایش بیان ژن پروتئین Bcl2 می‌شود. نیمان معتقد بود که کاهش فعالیت کمپلکس I میتوکندری و افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) که همراه با تغییرات عملکرد میتوکندری است، مهم‌ترین دلیل افزایش فرآیند آپوپتوز در سلول‌های قلبی بوده و احتمالا محدودیت کالری با کاهش تولید ROS قادر به ممانعت از افزایش زیاد فرآیند آپوپتوز در این بافت حیاتی است (۱۱). به علاوه مارزتی و همکاران (۲۰۰۹) در مقاله‌ای مروری اشاره داشتند که محدودیت کالری ملایم با کاهش فشار اکسایشی، عملکرد نامطلوب میتوکندری، التهاب و نیز تعدیل مناسب آپوپتوز می‌تواند موجب حفاظت از میوکارد شود. محدودیت کالری این عملکرد حفاظتی را در برابر آپوپتوز به وسیله افزایش بیان پروتئین‌های ضد آپوپتوزی مانند Bcl2 و پایداری غشا میتوکندری انجام می‌دهد (۱۲). اگرچه سازوکارهای متعددی مانند تغییر مستقیم در بیان و وضعیت ROS ژن‌های مربوط به آپوپتوز، کاهش آزادسازی عوامل آپوپتوتیک میتوکندری، تغییرات تولید ضداکسایشی برای اثرات محافظتی تمرینات ورزشی در مقابل آپوپتوز مطرح شده است، ولی هنوز ابهامات بسیاری در این زمینه وجود دارد (۲۰). در این راستا، اعضای خانواده Bcl-2 شامل پروتئین‌های BAX و Bcl-2 به عنوان پروتئین‌های اصلی در شکل گیری کانال‌های آپوپتوزی، تنظیم نفوذپذیری میتوکندری و پیام‌های آپوپتوزی میتوکندری درگیر هستند. نسبت BAX به Bcl2 شاخصی برای نشان دادن پتانسیل آپوپتوزی میتوکندری است که Bcl-2 بوسیله ممانعت از اگومری شدن BAX-BAX با فعالیت پیش آپوپتوزی 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 شده و باعث شروع پیام‌رسانی آپوپتوتیک آبشارهای کاسپاز پایین دستی می‌شود (۲۱). مسدود کردن منافذ نفوذپذیر میتوکندری، میزان آپوپتوز را کاهش می‌دهد. همچنین پروتئین Bcl-2 با ورود به غشا خارجی میتوکندری، یکپارچگی غشا را با خروج یون‌های هیدروژن از کانال‌های یونی حفظ کرده و با اتصال به Apaf-1 فعال‌سازی کاسپازی را مهار می‌کند (۲۳-۲۱، ۳). لذا نسبت BAX به Bcl2 نشان‌گر پتانسیل آپوپتوزی میتوکندری است. در این راستا، وینشتاین و همکاران (۲۰۱۱) اشاره داشتند که آپوپتوز میتوکندری اغلب با افزایش گونه‌های فعال اکسیژن همراه است و تمرینات ورزشی می‌توانند با کاهش تولید ROS و افزایش دفاع ضداکسایشی روند آپوپتوز را کندتر کند. در پاسخ به فشار اکسایشی، جابجایی و استقرار پروتئین BAX در غشای بیرونی میتوکندری افزایش می‌یابد. این موضوع تا اندازه‌ای می‌تواند ناشی از فعال شدن JNK سیتوز (c-Jun-N-terminal kinase) باشد به طوری که JNK در حضور محرک‌های استرس سلولی فسفریله شده و موجب مهار پروتئین Bcl-2 می‌شود، لذا پروتئین BAX اجازه جابه جایی به سمت میتوکندری می‌یابد. این مسئله با کاهش بیان پروتئین BAX و جابه‌جایی آن به سمت میتوکندری و افزایش بیان پروتئین Bcl2 همراه است (۱۶). از طرفی، نتایج برخی از مطالعات قبلی با مطالعه حاضر در تناقض بوده و اشاره به تسریع فرآیند آپوپتوز و افزایش قابل ملاحظه بیان پروتئین‌های پیش

آپوپتوزی متعاقب تمرینات ورزشی دارد که می‌توان به یافته‌های صفرزاده گرگری و همکاران (۲۰۱۸)، زین و همکاران (۲۰۰۹)، لیو و همکاران (۲۰۱۳) و پاتل و همکاران (۲۰۱۰) اشاره کرد. صفرزاده گرگری و همکاران (۲۰۱۸) در تحقیق خود با عنوان تاثیر تمرینات تداومی همراه با تزریق آب اکسیژنه بر پروتئین‌های BAX، BCL-2 و BAX/BCL-2 قلبی موش‌های نر به این نتیجه رسیدند که تمرینات تداومی همراه با تزریق دو میلی‌لیتر آب اکسیژنه در مقایسه با تزریق یک میلی‌لیتر باعث کاهش بیشتری در میزان پروتئین‌های آپوپتوزی می‌شود. همچنین غلظت پروتئین BCL-2 و نسبت BAX/BCL2 نیز در همه گروه‌ها تقریبا مشابه بود (۲۴). علت را می‌توان به اثر تمرینات استقامتی بر بیان ژن‌های ایجاد کننده هایپرتروفی قلبی نسبت داد. تمرینات استقامتی باعث تغییر بیان ژن‌هایی از جمله سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، ATP حساس به کانال‌های پتاسیم، مونو آمینواکسیداز و SIRT3 میتوکندری می‌شود که متعاقب آن باعث کاهش تحریک آپوپتوز و بسیاری از صدمات میتوکندری می‌گردد. افزایش بیان ژن SOD2 میتوکندری نقش مهمی در جلوگیری از آسیب‌های قلبی در ورزش دارد (۲۵). زین و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که ۶ ماه تمرین استقامتی موجب افزایش بیان ژن پروتئین BAX و کاهش بیان ژن پروتئین Bcl2 در میوکارد موش‌های صحرایی می‌شود. آنها اشاره داشتند که تمرین استقامتی طولانی مدت به دلیل افزایش فشار اکسایشی می‌تواند موجب بروز آپوپتوز در عضله قلبی شود (۱۴). مشابه نتایج مربوط به تمرینات ورزشی و آپوپتوز تناقضاتی در رابطه با سازوکار اثرگذاری محدودیت کالری بر فرآیند آپوپتوز مشاهده می‌شود. در این راستا، لیو و همکاران (۲۰۱۳) با بررسی تاثیر نه هفته تمرین استقامتی یکنواخت و استقامتی وامانده ساز بر میزان بیان ژن BAX، Bcl-2 و نسبت BAX به Bcl-2 در عضله ساق پای موش‌های صحرایی نر نشان دادند که میزان بیان ژن BAX در هر دو گروه تمرینی به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود. به علاوه، میزان بیان ژن Bcl-2 در گروه‌های تمرینی به طور غیر معنی‌داری کمتر از گروه کنترل است. لذا، نسبت میزان بیان ژن BAX به Bcl-2 در هر دو گروه تمرینی به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود (۲۴). نتایج مطالعه اخیر پاتل و همکاران (۲۰۱۰) حاکی از آن است که یک دوره محدودیت کالری طولانی مدت (۶۰- درصد) به دلیل افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و التهاب موجب افزایش آپوپتوز در عضله اسکلتی موش می‌شود. این پژوهشگران عنوان داشتند مطالعه آنها اولین پژوهشی است که اشاره به زیان‌آور بودن محدودیت کالری دارد. بر این اساسی، محدودیت کالری طولانی مدت با افزایش MDA و فشار اکسایشی و کاهش HSP70 سلولی، موجب افزایش پروتئین پیش آپوپتوزی BAX و تسریع فرآیند آپوپتوز شد. با این حال، آنها اشاره داشتند که مکانیسم‌های مولکولی این فرآیند هنوز نامشخص است (۱۳).

به علاوه، زین و همکاران (۲۰۰۹) نیز اشاره داشتند که تمرینات استقامتی طولانی مدت و شدید (شش ماه) به دلیل افزایش فشار اکسایشی می‌تواند موجب بروز آپوپتوز در عضله قلبی شود. این تناقض نیز احتمالا ناشی از مدت قرارداد تمرینی و نوع بافت مطالعه شده باشد. به طوری که زین و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که میزان تغییرات عوامل آپوپتوتیکی نیز می‌تواند در بافت‌های مختلف متفاوت باشد. همچنین به نظر می‌رسد که افزایش سن یکی از مهمترین عوامل بروز و تشدید آپوپتوز و افزایش بیان ژن پروتئین BAX در بافت‌های مختلف باشد به طوری که با پیشرفت سن میزان مرگ سلول‌های عضلانی نیز افزایش یابد (۲۵).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به نظر می‌رسد که تمرین تناوبی با شدت بالا بدون محدودیت کالری محیط مناسبی را برای افزایش یکپارچگی غشا میتوکندری سلول‌های میوکارد و احتمالا توقف آپوپتوز فراهم کند. در تحقیق حاضر فقط بیان ژن بررسی شده است که دقیقا به معنی آپوپتوز نیست و ممکن است که کلا به دلیل موارد پساترجمه‌ای متوقف شود و یا اینکه مرگ سلولی به طور مستقیم از طریق روش‌هایی مانند تونل و یا اتوفاژی نکروز تایید نشده است که همه این موارد از محدودیت‌های تحقیق حاضر هستند.

قدردانی

با سپاس از درگاه خداوند متعال، نویسندگان از تمامی افرادی که در اجرای این تحقیق ما را یاری نمودند صمیمانه سپاسگزاری می‌کنند. این مقاله حاصل پایان‌نامه دکتری در دانشگاه آزاد سنندج است.

ملاحظات اخلاقی

پروتکل این مطالعه در کمیته پزشکی دانشگاه علوم پزشکی سنندج، استان کردستان به شماره مرجع IR.MYK.REC.1397.5022 تایید شده است.

منابع مالی

حمایت مالی در این مطالعه صورت نگرفت.

منافع متقابل

مولفان اظهار می‌دارند که منافع متقابلی از تالیف و انتشار این مقاله ندارند.

مشارکت مولفان

م ز، ظ ا، ک ع‌ب و پ ک طراحی، اجرا و تحلیل نتایج مطالعه را عهده داشتند. همچنین مولفان، مقاله را تالیف نموده و نسخه نهایی آن را خوانده و تایید کرده‌اند.

References

1. von Harsdorf R, Li PF, Dietz R. Signaling pathways in reactive oxygen species–induced cardiomyocyte apoptosis. Circulation. 1999 Jun 8;99(22):2934-41. doi: 10.1161/01.cir.99.22.2934
2. Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. Aging (Albany NY). 2012 May;4(5):330-49. doi: 10.18632/aging.100459. PMID: 22683550; PMCID: PMC3384434.
3. Kwak HB. Effects of aging and exercise training on apoptosis in the heart. J Exerc Rehabil. 2013 Apr;9(2):212-9. doi: 10.12965/jer.130002. Epub 2013 Apr 25. Erratum in: J Exerc Rehabil. 2013 Dec;9(6):549. PMID: 24278863; PMCID: PMC3836520.
4. Phaneuf S, Leeuwenburgh C. Apoptosis and exercise. Med Sci Sports Exerc. 2001 Mar;33(3):393-6. doi: 10.1097/00005768-200103000-00010.
5. Amin H, Vachris J, Hamilton A, Steuerwald N, Howden R, Arthur ST. GSK3β inhibition and LEF1 upregulation in skeletal muscle following a bout of downhill running. J Physiol Sci. 2014 Jan;64(1):1-11. doi: 10.1007/s12576-013-0284-5. Epub 2013 Aug 21. PMID: 23963660.
6. Aschenbach WG, Ho RC, Sakamoto K, Fujii N, Li Y, Kim YB, et al. Regulation of dishevelled and beta-catenin in rat skeletal muscle: an alternative exercise-induced GSK-3beta signaling pathway. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2006 Jul;291(1):E152-8. doi: 10.1152/ajpendo.00180.2005. Epub 2006 Feb 14. PMID: 16478782.
7. Sakamoto K, Arnolds DE, Ekberg I, Thorell A, Goodyear LJ. Exercise regulates Akt and glycogen synthase kinase-3 activities in human skeletal muscle. Biochem Biophys Res Commun. 2004 Jun 25;319(2):419-25. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.05.020. PMID: 15178423.
8. Pećina-Slaus N. Wnt signal transduction pathway and apoptosis: a review. Cancer Cell Int. 2010 Jun 30;10:22. doi: 10.1186/1475-2867-10-22. PMID: 20591184; PMCID: PMC2908610.
9. Xie J, Zhou X, Hu X, Jiang H. H2O2 evokes injury of cardiomyocytes through upregulating HMGB1. Hellenic J Cardiol. 2014 Mar-Apr;55(2):101-6. PMID: 24681787.
10. Nabiyuni T, Parivar R, Divsalar F. Effects of honey bee poison on leukemia lymphoblastic cancer cells. Kashan J Faze Med Sci. 2012;16(2):7-121. [Persian]
11. Niemann B, Chen Y, Issa H, Silber RE, Rohrbach S. Caloric restriction delays cardiac ageing in rats: role of mitochondria. Cardiovasc Res. 2010 Nov 1;88(2):267-76. doi: 10.1093/cvr/cvq273. Epub 2010 Aug 25. PMID: 20797984.
12. Marzetti E, Wohlgemuth SE, Anton SD, Bernabei R, Carter CS, Leeuwenburgh C. Cellular mechanisms of cardioprotection by calorie restriction: state of the science and future perspectives. Clin Geriatr Med. 2009 Nov;25(4):715-32, ix. doi: 10.1016/j.cger.2009.07.002.
13. Patel BP, Safdar A, Raha S, Tarnopolsky MA, Hamadeh MJ. Caloric restriction shortens lifespan through an increase in lipid peroxidation, inflammation and apoptosis in the G93A mouse, an animal model of ALS. PLoS One. 2010 Feb 24;5(2):e9386. doi: 10.1371/journal.pone.0009386. PMID: 20195368; PMCID: PMC2827549.
14. Xin L, Jian LU, Wei WU. Effect of Long-term Endurance Exercise on Cardiac Apoptosis. J Mian Nor Univ 2009;7(2): 2009-11.
15. Langan-Evans C, Close GL, Morton JP. Making weight in combat sports. Strength & Conditioning Journal. 2011 Dec 1;33(6):25-39.
16. Haram PM, Kemi OJ, Lee SJ, Bendheim MØ, Al-Share QY, Waldum HL, et al. Aerobic interval training vs. continuous moderate exercise in the metabolic syndrome of rats artificially selected for low aerobic capacity. Cardiovasc Res. 2009 Mar 1;81(4):723-32. doi: 10.1093/cvr/cvn332. Epub 2008 Dec 1. PMID: 19047339; PMCID: PMC2642601.
17. Vainshtein A, Kazak L, Hood DA. Effects of endurance training on apoptotic susceptibility in striated muscle. J Appl Physiol (1985). 2011 Jun;110(6):1638-45. doi: 10.1152/japplphysiol.00020.2011. Epub 2011 Apr 7. PMID: 21474699.
18. Ko IG, Kim SE, Kim CJ, Jee YS. Treadmill exercise alleviates aging-induced apoptosis in rat cardiac myocytes. International journal of gerontology. 2013 Sep 1;7(3):152-7. doi: 10.1016/j.ijge.2013.01.0011
19. Speakman JR, Mitchell SE. Caloric restriction. Mol Aspects Med. 2011 Jun;32(3):159-221. doi: 10.1016/j.mam.2011.07.001. Epub 2011 Aug 10. PMID: 21840335.
20. 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 (1985). 2012 Oct;113(7):1048-57. doi: 10.1152/japplphysiol.00290.2012. Epub 2012 Aug 2. PMID: 22858629.
21. 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 (1985). 2008 Dec;105(6):1934-43. doi: 10.1152/japplphysiol.00037.2008. Epub 2008 Oct 2. PMID: 18832755; PMCID: PMC2612474.
22. García-Sáez AJ. The secrets of the Bcl-2 family. Cell Death Differ. 2012 Nov;19(11):1733-40. doi:

10.1038/cdd.2012.105. Epub 2012 Aug 31. PMID: 22935609; PMCID: PMC3469065.

23. Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. Mol Cell Biochem. 2011 May;351(1-2):41-58. doi: 10.1007/s11010-010-0709-x. Epub 2011 Jan 6. PMID: 21210296.
24. Safarzadeh Gargari S, Matin Homai H, Azarbayjani MA. Effects of Continuity exercise with H2O2 injection on BAX and BCL-2 ratio heart proteins following by in rat male. Journal of Applied Health Studies in Sport Physiology. 2018;**5**(2):13-9. doi: 10.22049/jassp.2019.26218.1175
25. Moradi M, Tahmasebi W, Azizi M. Journal of Applied Health Studies in Sport Physiology. Journal of Applied Health Studies in Sport Physiology. 2019;6(1).
26. Liu WY, He W, Li H. Exhaustive training increases uncoupling protein 2 expression and decreases Bcl-2/Bax ratio in rat skeletal muscle. Oxid Med Cell Longev. 2013;2013:780719. doi: 10.1155/2013/780719. Epub 2013 Jan 9. PMID: 23365696; PMCID: PMC3556863.
27. Kalyani RR, Corriere M, Ferrucci L. Age-related and disease-related muscle loss: the effect of diabetes, obesity, and other diseases. Lancet Diabetes Endocrinol. 2014 Oct;2(10):819-29. doi: 10.1016/S2213-8587(14)70034-8.