

Research Paper

Effect of 8 Weeks of High Intensity Interval Training (HIIT) With and Without Calorie Restriction on Gene Expression of Caspase-3 and Caspase-9 Proteins in Male Rats



Mohammadreza Zarali¹, *Zaher Etemad¹, Kamal Azizbeigi¹, Poursan Karimi²

1. Department of Exercise Physiology, School of Physical Education and Sport Sciences, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.

2. Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran



Citation: Zarali M, Etemad Z, Azizbeigi K, Karimi P. [Effect of 8 Weeks of High Intensity Interval Training (HIIT) With and Without Calorie Restriction on Gene Expression of Caspase-3 and Caspase-9 Proteins in Male Rats (Persian)]. Journal of Arak University of Medical Sciences (JAMS). 2020; 23(3):300-313. <https://doi.org/10.32598/JAMS.23.3.5960.1>

<https://doi.org/10.32598/JAMS.23.3.5960.1>



Article Info:

Received: 04 Sep 2019

Accepted: 12 Nov 2019

Available Online: 01 Aug 2020

Key words:

High intensity interval training, Caloric restriction, Caspase

ABSTRACT

Background and Aim Apoptosis or programmed death is active biological process and reversible that the balance between growth and cell death in various tissues, particularly myocardial tissue is essential role. The aim of this study was the effect of 8 weeks High Intensity Interval Training (HIIT) with and without food restriction on gene expression of Caspase 3 and 9 in rats.

Methods & Materials This study was experimental multi group design with control group which conducted on 30 rats with two months old male. Subjects were divided in to five homogenous groups including base control, control, caloric restriction, interval exercise training and caloric restriction+interval exercise training. Training groups five sessions in weeks were participated in interval exercise training for 8 weeks. The level of gene expression of the proteins Caspase 3 and 9 was evaluated by Real Time-PCR. Dates were analyzed using the 1-way ANOVA at the level of ($P < 0.05$).

Ethical Considerations The protocol of this study was approved by the Medical Committee of Sanandaj University of Medical Sciences (Code: IR.MYK.REC.1397.5022).

Results The results showed that the training group had a significant decrease in gene expression of Caspase 3 in comparison with caloric restriction+exercise training ($P < 0.05$). Also, exercise training and exercise training+caloric restriction significantly decrease in the gene expression of Caspase 9 compared to caloric restriction, base control and control ($P < 0.05$) and significantly decrease in the gene expression of Caspase 3 compared to base control and control ($P < 0.05$).

Conclusion According to the results, it seems that high intensity interval training with and without caloric restriction provides the necessary adaptations to inhibit or stop apoptosis induced by aerobic exercise.

Extended Abstract

1. Introduction

Apoptosis is a biologically active and reversible process that plays a key role in regulating the balance between cell growth and death in

various tissues, especially the myocardium. This process begins with the compression and fragmentation of chromatin and the condensation of the cellular cytoplasm and ends with the crumpling of the cell nucleus and membranes and the production of vacuoles containing apoptotic particles [1-3]. Apoptosis occurs through the intracellular and extracellular pathways [1, 2, 4].

* Corresponding Author:

Zaher Etemad, PhD.

Address: Department of Exercise Physiology, School of Physical Education and Sport Sciences, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.

Tel: +98 (918) 1741523

E-mail: zetemad2002@yahoo.com

Table 1. Descriptive characteristics of the rats

Groups	Body Weight	Heart Weight	Ratio of Heart Weight to Body Weight
Basic control	173.37±11.96	0.556±0.06	3.10±0.24
Control	399.13±18.67	1.04±0.07	2.62±0.17
Calorie restriction	323.03±7.69	1.06±0.05	3.20±0.22
Exercise	345.26±8.97	1.20±0.06	3.49±0.21
Exercise and calorie restriction	322.93±10.41	1.10±0.02	3.40±0.13


 Journal of
Arak University of Medical Sciences

The internal pathway, as the most important pathway for apoptosis, is associated with changes in mitochondrial permeability and release of apoptotic agents. Molecular events of apoptosis are determined by the balance between pro- and anti-apoptotic specific regulatory proteins. In the meantime, Bax and Bcl2 proteins are involved as major proteins in the formation of apoptosis and mitochondrial apoptotic messages. The aim of the present study was to investigate the effect of 8 weeks of High-Intensity Interval Training (HIIT) with and without calorie restriction on gene expression of caspase-3 and caspase-9 proteins in male rats.

2. Materials and Methods

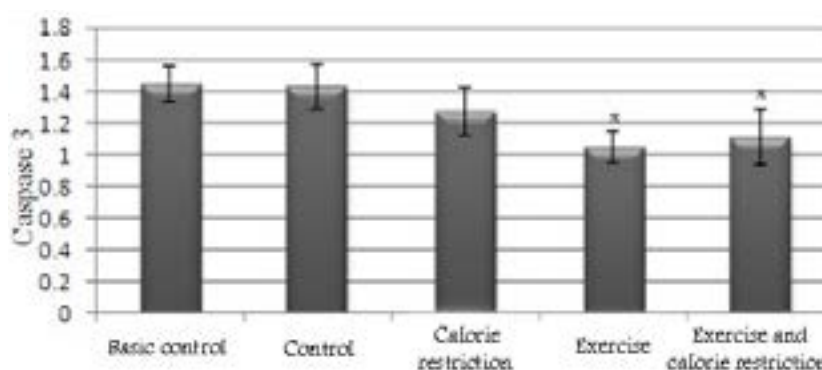
The present research was an experimental study performed in a field and laboratory method in which the effect of 8 weeks of high-intensity interval training with and without calorie restriction on gene expression of caspase-3 and caspase-9 proteins in male rats was investigated. Considering the suitable conditions of the animal model for the present study, 30 two-month-old male Wistar rats were purchased from the Pasteur Institute of Iran. After familiarizing the rats with the laboratory environment, they were divided into five groups of six (“basic control”, “control”, “calorie

restriction”, “exercise”, and “exercise and calorie restriction”) (Table 1). In order to control the baseline variables and to determine the reference group, the “baseline control” group underwent surgery at the beginning of the research period using the specified laboratory method. All rats were placed on a treadmill for 14 days under a training program.

The subjects in the “control” and “exercise” groups freely used standard food and water during the study period. To determine the amount of food consumed by the “calorie restriction” and “exercise” groups, along with the application of calorie restriction to them, the amount of food consumed by the other subjects was measured daily and the restricted groups received 50% of the food consumed by the other groups.

3. Results

The results of one-way ANOVA showed that there was a significant difference between the expression of myocardial caspase-3 protein in male rats ($P=0.001$). Also, the results of Tukey post hoc test showed that the “basic control” and “control” groups had a significant increase in the expression of myocardial caspase-3 protein compared to the “exercise

**Figure 1.** Changes in caspase-3 in different groups

*significant difference compared to basic control, control and calorie restriction groups.


 Journal of
Arak University of Medical Sciences

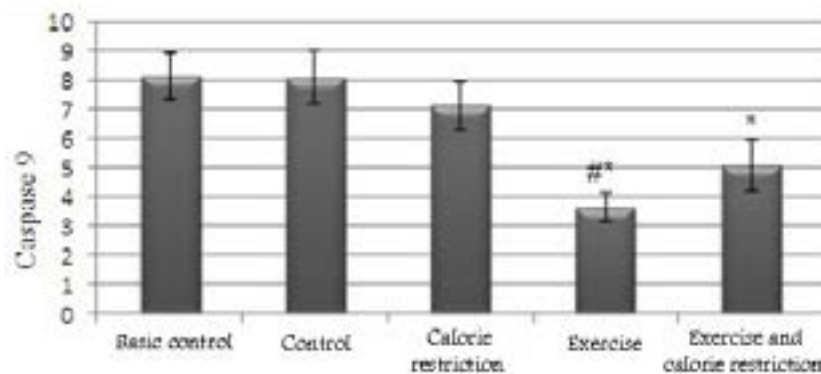


Figure 2. Changes in caspase-9 in different groups

*significant difference compared to basic control, control and calorie restriction groups; #significant difference compared to exercise and calorie restriction groups.

and calorie restriction” and “exercise” groups ($P < 0.05$). The results of one-way ANOVA showed that there was a significant difference between the expression rate of myocardial caspase-9 protein in male rats ($P = 0.001$).

Also, the results of Tukey post hoc test showed that the “basic control”, “control” and “calorie restriction” groups had a significant increase in the expression of myocardial caspase-9 protein compared to the “exercise and calorie restriction” and “exercise” groups ($P < 0.05$). On the other hand, the “exercise” group had a significant decrease in the expression of myocardial caspase-9 protein compared to the “exercise and calorie restriction” group ($P < 0.05$) (Figures 1 and 2).

4. Discussion

Although the exact mechanisms of exercise-induced apoptosis are unclear, there are many possible hypotheses that need further investigation. One of the important hypotheses in this regard is that during exercise, muscle metabolism increases, which leads to the production of ROS [5]. High quantities of ROS can produce oxidative damage and thus lead to apoptosis via the internal pathway [15].

It has been reported that a significant decrease in caspase-3 protein expression following aerobic exercise was associated with a decrease in pre-apoptotic factors such as Bax protein expression and Bax to Bcl2 ratio as well as a significant increase in Bcl2 anti-apoptotic protein. This decrease in mitochondrial apoptotic potential following aerobic exercise in elderly rats may be associated with decreased release of apoptotic agents such as cytochrome c and Apaf1 into skeletal muscle, which significantly reduced caspase-3 expression [14].

In the internal pathway, mitochondria and endoplasmic reticulum play a major role in this process, in which the role of mitochondria in apoptosis is the most important and have been focused in many studies [5, 16, 17]. Under stressful conditions, factors such as glucocorticoids, ROS, nitrogen monoxide, chemotherapy drugs, radiation, reduced growth stimulants, and cytokines cause changes in mitochondrial permeability by causing stress; and cytochrome c which is located in the inner membrane of the mitochondria and interstitial space, is released into the cytosol and binds to apoptosis-activating protease factor 1 (Apaf-1) inside the release cytosol to form a compound called dATP. This compound then induces apoptosis by activating procaspase-9, caspase-9, and caspase-3 [18]. The most important step in controlling this pathway is the release of cytochrome c. Cell death pathway inhibitory proteins such as Bcl-2 and Bcl-XL inhibit the release of cytochrome c and thus play a role [19].

5. Conclusion

According to the results, it seems that high-intensity interval exercise with and without calorie restriction provides the necessary adaptations to inhibit or stop apoptosis caused by aerobic exercise. In addition, in this study, the contribution of caspase-8, especially caspase-6, and even bad protein as pathways for possible interactions was not investigated. Therefore, activation of caspase-3 might have originated externally, which was one of the limitations of the present study.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

The protocol of this study was approved by the Medical Committee of Sanandaj University of Medical Sciences (Code: IR.MYK.REC.1397.5022).

Funding

The present paper was extracted from the PhD. thesis of the first author, Department of Exercise Physiology, School of Physical Education and Sport Sciences, Sanandaj Branch, Islamic Azad University.

Authors' contributions

All authors contributed in preparing this article.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

This Page Intentionally Left Blank

تأثیر ۸ هفته تمرین تناوبی با شدت بالا (HIIT) با و بدون محدودیت کالری بر بیان ژن پروتئین‌های کاسپاز ۳ و ۹ موش‌های نر صحرایی

محمد رضا زارعلی^۱، *ظاهر اعتماد^۱، کمال عزیزبگی^۱، پوران کریمی^۲

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم انسانی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران.
۲. گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله:

تاریخ دریافت: ۱۳ مرداد ۱۳۹۸

تاریخ پذیرش: ۲۱ آبان ۱۳۹۸

تاریخ انتشار: ۱۱ مرداد ۱۳۹۹

زمینه و هدف: آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده یک فرایند زیستی فعال و برگشت‌پذیر است که در تنظیم تعادل بین رشد و مرگ سلولی در بافت‌های مختلف به‌ویژه بافت میوکارد نقش اساسی دارد. هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر هشت هفته تمرین تناوبی با شدت بالا (HIIT) با و بدون محدودیت کالری بر بیان ژن پروتئین‌های کاسپاز سه و نه موش‌های نر صحرایی بود.

مواد و روش‌ها: مطالعه حاضر در قالب یک طرح تجربی چندگروهی با گروه کنترل روی ۳۰ سر موش صحرایی نر دوماهه انجام شد. آزمودنی‌ها در پنج گروه کنترل پایه، کنترل، محدودیت غذایی، تمرین و تمرین + محدودیت غذایی جایگزین شدند. گروه‌های تمرینی برای پنج روز در هفته به مدت هشت هفته در برنامه تمرین تناوبی با شدت بالا شرکت کردند. میزان بیان پروتئین‌های کاسپاز سه و نه با استفاده از روش RT-PCR بررسی شد. داده‌ها توسط آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه در سطح معنی‌داری ($P < 0.05$) تحلیل شدند.

ملاحظات اخلاقی: پروتکل این مطالعه در کمیته پزشکی دانشگاه علوم پزشکی سنندج به شماره مرجع IR.MYK.REC.۲۲/۵۰۳۹۷/۱۳۹۷ به تایید رسیده است.

یافته‌ها: یافته‌ها نشان داد گروه تمرین کاهش معنی‌داری در بیان پروتئین کاسپاز سه نسبت به گروه محدودیت غذایی + تمرین ($P < 0.05$) داشت. همچنین گروه تمرین و تمرین + محدودیت غذایی کاهش معنی‌داری در میزان بیان پروتئین کاسپاز نه نسبت به گروه محدودیت غذایی، کنترل پایه و کنترل ($P < 0.05$) و کاهش معنی‌داری در میزان بیان پروتئین کاسپاز سه نسبت به گروه کنترل پایه و کنترل داشت ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج، به نظر می‌رسد که تمرین تناوبی با شدت بالا با و بدون محدودیت کالری سازگاری‌های لازم برای مهار یا توقف آپوپتوز ناشی از تمرینات هوازی را فراهم می‌کند.

کلیدواژه‌ها:

تمرین تناوبی با شدت بالا، محدودیت کالری، کاسپاز

مقدمه

مجدد، داروهای مختلف، سالخوردگی و فشارهای جسمانی (مکانیکی متابولیکی) تشدید پیدا کرده و از این طریق مقدمات بروز انواع بیمارهای قلبی عروقی را فراهم کند [۱، ۲].

این فرایند فیزیولوژیایی از طریق دو مسیر داخل و خارج سلولی رخ می‌دهد. مسیر خارجی با اتصال لیگاندهای مهم مانند TNF α و Fas به گیرنده‌های غشایی القاکننده مرگ راه‌اندازی می‌شود [۳، ۴]. در حالی که مسیر داخلی به عنوان مهم‌ترین مسیر ایجاد آپوپتوز، با تغییراتی در نفوذپذیری میتوکندری و ره‌ایش عوامل آپوپتوزی همراه است. به هر حال، رخداد‌های مولکولی آپوپتوز اساساً به واسطه تعادل بین پروتئین‌های ویژه تنظیمی پیش و ضد آپوپتوزی مشخص می‌شود. در این بین، پروتئین‌های Bax و Bcl2 به عنوان پروتئین‌های

آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده یک فرایند زیستی فعال و برگشت‌پذیر است که در تنظیم تعادل بین رشد و مرگ سلولی در بافت‌های مختلف، به‌ویژه بافت‌های سوماتیک مانند مغز، عضله اسکلتی و میوکارد نقش اساسی دارد. این روند با فشرده‌سازی و تکه‌تکه کردن کروماتین‌ها و چگال کردن سیتوپلاسم سلولی کار خود را آغاز می‌کند و با مچاله شدن هسته و غشاهای سلولی و تولید واکوئل‌های محتوی ذرات آپوپتوتیکی خاتمه می‌یابد [۱-۳]. با این حال، نتایج مطالعات موجود حاکی از آن است که میزان آپوپتوز اندک میوکارد (در حدود ۰/۰۰۱ الی ۰/۰۰۲ درصد) ممکن است در اثر عوامل درونی یا بیرونی مانند پرتوافکنی، ایسکمی / خون‌رسانی

* نویسنده مسئول:

ظاهر اعتماد

نشانی: سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنندج، دانشکده علوم انسانی، گروه فیزیولوژی ورزشی.

تلفن: ۱۷۴۱۵۲۳ (۹۱۸) ۹۸+

پست الکترونیکی: zetemad2002@yahoo.com

باعث کاهش غیرمعنی‌دار پروتئین کاسپاز ۳ در موش‌های صحرایی در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل می‌شود [۱۰].

با حصول پیشرفت‌های محسوس در زمینه‌های سلولی و مولکولی ورزشی، برخی از مدارک و شواهد از احتمال تسریع فرایند آپوپتوز با تمرینات هوازی طولانی‌مدت خبر می‌دهند که این احتمال با تلفیق یک محدودیت غذایی شدید قوت می‌یابد. با این حال اثر تمرینات مختلف ورزشی و محدودیت‌های غذایی بر آپوپتوز در هاله‌ای از ابهام قرار داشته و نیازمند اجرای پژوهش‌های دقیق و جدی در این زمینه است.

با توجه به اینکه تفاوت شدت و مدت تمرینات هوازی مورد استفاده در مطالعات مختلف باعث به دست آمدن نتایج متناقضی شده است و تاکنون مطالعه جامعی به‌ویژه در داخل کشور در زمینه تأثیر 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 در طی فعالیت ورزشی حاد را مورد آزمایش قرار داده‌اند، انتظار می‌رود با انجام تحقیق حاضر بتوان ضمن پاسخ به برخی ابهامات موجود و تعیین تأثیر تمرینات ورزشی بر آپوپتوز، پیشنهادهای کاربردی متناسبی در راستای نحوه انجام تمرینات و نیز پیش‌بینی پیامدهای احتمالی ناشی از تمرین همراه با محدودیت کالری ارائه داد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربی بود که به شیوه میدانی و آزمایشگاهی اجرا شد و در آن تأثیر هشت هفته تمرین تناوبی با شدت بالا و بدون محدودیت کالری بر بیان ژن پروتئین‌های کاسپاز سه و نه موش‌های نر صحرایی بررسی شد.

با توجه به شرایط مناسب مدل حیوانی برای مطالعه حاضر، سی سر موش صحرایی نر دوماهه ویستار از انستیتو پاستور ایران خریداری شد که پس از آشنایی با شرایط آزمایشگاه به پنج گروه شش‌تایی (گروه کنترل پایه، کنترل، محدودیت غذایی، تمرین و تمرین و محدودیت غذایی) تقسیم شدند (جدول شماره ۱). گروه کنترل پایه در ابتدای دوره پژوهش برای کنترل متغیرهای پایه و به عنوان گروه مرجع به روش آزمایشگاهی موردنظر جراحی شد. همه موش‌ها به مدت چهارده روز تحت برنامه آشنایی با نحوه فعالیت روی نوارگردان قرار گرفتند.

آزمودنی‌های گروه کنترل و تمرین به صورت آزادانه از غذای استاندارد و آب در طول دوره پژوهش استفاده کردند. برای تعیین مقدار غذای مصرفی گروه‌های محدودیت غذایی و تمرین همراه با محدودیت غذایی و اعمال محدودیت غذایی 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.

اصلی در شکل‌گیری آپوپتوز و پیام‌های آپوپتوز میتوکندریایی درگیر می‌شوند. تحقیقات نشان داده‌اند که پروتئین Bax با کاهش پایداری غشای بیرونی میتوکندری می‌تواند منتج به رهائش عوامل آپوپتوزی مانند سیتوکروم C از فضای بین غشایی شود. این در حالی است که پروتئین Bcl2 با فعالیت پیش‌آپوپتوزی پروتئین Bax مخالفت کرده و موجب حفظ یکپارچگی غشای میتوکندری می‌شود. در این بین، فصل مشترک همه مسیرهای آپوپتوزی، در نهایت فعال‌سازی کاسپاز ۳ و تجزیه پروتئین‌های حیاتی سلول است [۵-۱].

کاسپازها اجراکنندگان اصلی آپوپتوز هستند. تا به امروز دو مسیر پیام‌رسانی عمده آپوپتوز مشخص شده‌اند. نخست، مسیر وابسته به میتوکندری که به نشانه‌های خارج سلولی و عوامل داخلی از قبیل آسیب پاسخ می‌دهد. دومین مسیر آپوپتیک به وسیله DNA اعضای خانواده بزرگ گیرنده‌های مرگ به واسطه فعال‌سازی کاسپاز یک تحریک می‌شود [۶]. کاسپازها، پروتئازهایی هستند که به عنوان آغازکننده‌ها و اجراکننده‌های ضروری فرایند آپوپتیک ایفای نقش می‌کنند. به صورت کلاسیک، آبشار کاسپازی به وسیله شکستن کاسپازهای به اصطلاح آغازگر (کاسپاز دو، هشت، نه و ده) به احتمال زیاد به واسطه اتوپروتولیز آغاز می‌شود. کاسپازهای آغازگر به نوبه خود، کاسپازهای اجراکننده (کاسپازهای سه، شش و هفت) را شکسته و فعال می‌کنند که به فرایند آپوپتوز منجر می‌شود [۷].

کاسپاز سه یکی از مهم‌ترین پروتئازهای اجراکننده در مسیر شناخته‌شده آپوپتوز است. کاسپاز سه تا زمانی که کاسپازهای آغازگر به وسیله پروتئولیز مستقیم فعال می‌کنند، به صورت خاموش باقی می‌ماند. کاسپاز سه فعال شده، مهارکننده DNase فعال‌کننده کاسپاز را می‌شکند و به مرگ سلولی منجر می‌شود. فعال شدن کاسپاز سه در شرایط هیپوکسیک در چندین گونه سلول از قبیل میوسیت‌های بطنی، سلول‌های اندوتلیال و سلول‌های سنگ‌فرشی کارسینومای ریه نشان داده شده است [۸].

برخی از محققین معتقدند که بروز فشار در حین فعالیت‌های ورزشی نسبتاً سنگین و شدید ممکن است با افزایش عوامل پیش‌آپوپتوزی یا کاهش پروتئین‌های ضدآپوپتوزی، باعث تشدید این فرایند و پیامدهای بعدی آن شود. هرچند نتایج برخی از مطالعات به نقش محافظتی تمرینات بدنی اشاره دارد. این تناقضات ممکن است عمدتاً ناشی از شدت، مدت و نوع تمرینات بدنی (مقاومتی در برابر غیر مقاومتی) یا وضعیت سلامت و آمادگی آزمودنی‌های مورد مطالعه باشد.

تبریزی و همکاران نشان دادند دوازده هفته برنامه تمرین هوازی با شدت ۷۵ تا ۸۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه به طور معنی‌داری باعث افزایش بیان ژن کاسپاز ۹ در عضله قلبی موش‌های صحرایی نر در گروه تمرین می‌شود [۹]. در مقابل اصغرپور و همکاران در پژوهش خود به این نتیجه رسیدند که دوازده هفته تمرین هوازی

1. Cleavage

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



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 مورد مطالعه در کمترین زمان ممکن و با حداقل درد و آزار کشته شوند. تمامی موش‌های صحرایی، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، توسط تزریق درون صفاقی کتامین (۹۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) بیهوش و پس از تخلیه خون قلب و وزن کشی آن، بلافاصله دهلیزها از بطن جدا شده و بخشی از بافت بطن چپ آزمودنی‌ها در کرایوتوبوب در نیتروژن مایع قرار گرفت و برای بررسی میزان بیان ژنی پروتئین‌های کاسپاز سه و نه با استفاده از روش RT-PCR در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۱۱].

ساخت cDNA

طبق دستورالعمل کیت (Fermentas, Canada) یک میکرولیتر RNA و یک میکرولیتر از DNase I reaction buffer 10X در یک تیوب ۱/۵ میلی لیتری ریخته شد و توسط DEPC-treated water

جهت جلوگیری از استرس و تغییر شرایط فیزیولوژیکی، نمونه‌ها به مدت دو هفته تحت شرایط جدید نگهداری شدند. دما (۲±۲ سانتیگراد)، رطوبت محیط (۵±۵ درصد) و چرخه ی روشنایی تاریکی ۱۲:۱۲ ساعته، کنترل شد. سپس نمونه‌ها چهارده روز تحت برنامه آشنایی با نحوه فعالیت روی نوارگردان قرار گرفتند. در طی این دوره، شیب نوار گردان صفر درصد، سرعت ۱۰-۱۵ متر بر دقیقه و مدت تمرین ۵-۱۰ دقیقه در روز بود. در پایان این دوره، موش‌ها پس از مطابقت وزنی به طور تصادفی به پنج گروه کنترل، کنترل پایه، محدودیت غذایی، تمرین و تمرین + محدودیت غذایی تقسیم شدند. دو گروه تمرین و تمرین + محدودیت غذایی برای پنج روز در هفته (یکشنبه، دوشنبه، سه‌شنبه، پنجشنبه و جمعه) و به مدت هشت هفته در برنامه تمرین تناوبی با شدت بالا (۹۰-۱۰۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه، به مدت ۶۰ دقیقه و با سرعت ۲۸-۵۳ متر بر دقیقه روی نوارگردان الکترونیکی هوشمند حیوانی (شرکت تجهیز آزما پویا) شرکت کردند. شدت نسبی کار در سرتاسر برنامه تمرین معادل ۹۰-۱۰۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه (۲۸-۵۳ متر) حفظ شد (جدول شماره ۲).

جدول ۲. برنامه تمرین تناوبی با شدت بالا

تمرین اصلی	گرم کردن	مراحل تمرین HIIT
تمرین تناوبی با شدت بالا		زمان تناوب (دقیقه)
۴	۶	شدت (حجم حداکثر اکسیژن مصرفی بیشینه)
۹۰-۱۰۰ (درصد)	۵۰-۶۰ (درصد)	هفته اول و دوم (متر بر دقیقه)
۲۸-۳۱	۱۶-۱۹	هفته سوم و چهارم (متر بر دقیقه)
۳۳-۳۷	۱۹-۲۲	هفته پنجم و ششم (متر بر دقیقه)
۳۸-۴۱	۲۱-۲۵	هفته هفتم و هشتم (متر بر دقیقه)
۴۸-۵۳	۲۷-۳۲	



جدول ۳. توالی پرایمرها

Genes	Primer sequence Product	length (bp)
Caspase3	F: 5'GGAGCTTGAACGGTACGCT3' R:5'AGTCCACTGACTTGCTCCCA3'	۱۱۸
Caspase9	F:5' CGAGCTGTTACAGGCCCAT3' R: 5'CGCAGAAACGAAGCCAGCAT3	۱۷۴
β-actin	F: 5'CTCTGTGTGGATCGGTGGCT3' R:5'GCAGCTCAGTAACAGTCCGC3	۱۳۸



متصل شده و نور فلورسنت ساطع می‌کند. به عنوان بلانک از تیوبی که حاوی همه مواد موجود در واکنش به جز cDNA بود، استفاده شد و به جای cDNA به تیوب مربوطه DEPC water اضافه شد. پس از اتمام واکنش تکثیر، برای هر واکنش یک نمودار رسم و سپس بر این اساس CT تعیین شد. در پایان قبل از آنالیز داده‌ها، منحنی ذوب^۲ به دست آمده از هر واکنش Real-time PCR بررسی شد تا پیک مربوط به ژن مورد نظر و فقدان پرایمر دایمر تأیید شود. برای آنالیز داده‌ها ابتدا ΔCt ژن در هر نمونه از افتراق Ct ژن مربوطه و Ct ژن β -actin به عنوان رفرنس محاسبه شد. فرمول‌ها برای محاسبه به ترتیب زیر است (فرمول شماره ۱ و ۲):

۱.

$$\Delta CT = CT \text{ target} - CT \text{ reference}$$

۲.

$$\Delta \Delta CT = \Delta CT \text{ test sample} - \Delta CT \text{ control sample}$$

بعد از جمع‌آوری داده‌های حاصل از پژوهش، از آمار توصیفی برای توصیف داده‌ها استفاده شد. در ادامه با استفاده از آزمون شاپیرو ویلک نرمال بودن توزیع آن‌ها بررسی شد. داده‌های با استفاده از روش آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه 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 یک‌طرفه نشان داد تفاوت معنی‌داری بین میزان بیان پروتئین کاسپاز سه میوکارد موش‌های نر صحرایی وجود دارد ($P = 0.001$). همچنین نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد گروه کنترل پایه و کنترل نسبت به گروه تمرین و محدودیت غذایی و تمرین افزایش معنی‌داری در میزان بیان پروتئین کاسپاز سه میوکارد داشتند ($P < 0.05$). نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان داد تفاوت معنی‌داری بین میزان بیان پروتئین کاسپاز

به حجم ۹ میکرولیتر رسید. برای از بین بردن آلودگی احتمالی با DNA، یک میکرولیتر DNase به تیوب اضافه و پس از افزودن یک میلی‌لیتر از اتانول مطلق، تیوب مربوطه به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر ۷۰ درجه قرار گرفت. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط ۴ درجه و ۱۴۰۰۰ برابر شتاب جاذبه سانتریفیوژ شد و پس از آن، در زیر هود به دقت اتانول آن خالی شد و حدود ۱۰ دقیقه اجازه داده شد تا الکل تبخیر شود. به تیوب یک میکرولیتر DEPC treated water و یک میکرولیتر پرایمر oligo (dt) یا پرایمر Random hexamer 5x افزوده شد و ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه روی Dry block انکوبه شد. چهار میکرولیتر 5X reaction buffer و دو میکرولیتر Ribo lock Ribo nuclease و یک میکرولیتر dNTP 10mM mix و یک میکرولیتر Transcription Inhibitor به تیوب افزوده شد و پس از سانتریفیوژ مختصر، به مدت پنج دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه شد. یک میکرولیتر آنزیم Rverert AidTM H Minus M-MuLV. Reverse به تیوب قبل افزوده شد. در ادامه در صورت استفاده از پرایمر oligo (dt)، 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 انکوباسیون صورت گرفت. واکنش با قرار دادن تیوب به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه پایان پذیرفت و نمونه در فریزر با دمای منهای ۷۰ درجه نگهداری شد.

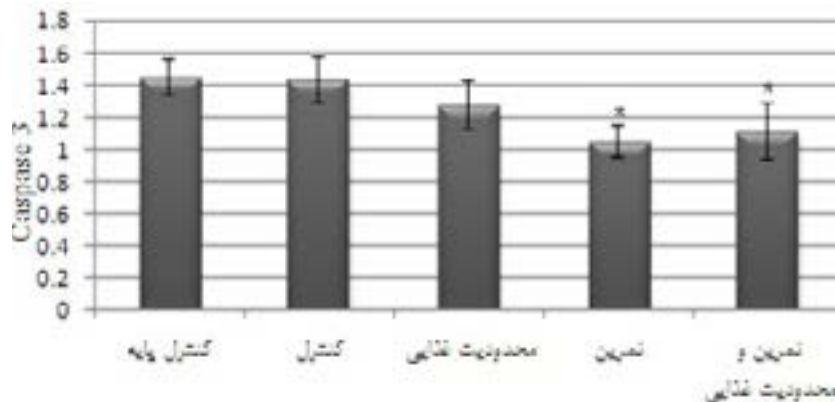
Real-time PCR

برای اندازه‌گیری میزان بیان ژنی پروتئین‌های مورد نظر، از دستگاه Rotor gene- 6000 (Corbett USA) استفاده شد. جفت پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از نرم‌افزار Primer ۳ طراحی و توسط بایونیر (Bioneer, Germany) سنتز شد و برای کار با غلظت نهایی ۱۰۰ نانو متر مورد استفاده قرار گرفتند. توالی پرایمرها در جدول شماره ۳ ارائه شده‌اند.

پرایمرها

واکنش‌ها بر مبنای استفاده از رنگ Syber green انجام شد. رنگ Syber green طی واکنش Real-time PCR به DNA دورشته‌ای

2. Melting curve



تصویر ۱. تغییرات کاسپاز سه در گروه‌های مختلف (* تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل پایه، کنترل و محدودیت غذایی)



نتایج پژوهش حاضر با یافته‌های اصغرپور و همکاران، لی و همکاران، هوانگ و همکاران و کواک و همکاران همسوست.

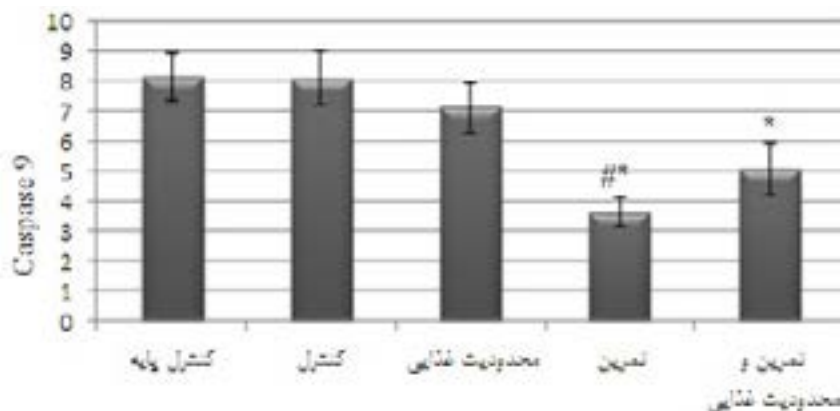
اصغرپور و همکاران در پژوهش خود به این نتیجه رسیدند که دوازده هفته تمرین هوازی باعث کاهش غیرمعنی‌دار پروتئین کاسپاز سه در موش‌های صحرایی در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل می‌شود. با این حال و با توجه به عدم تفاوت معنی‌دار پروتئین کاسپاز سه، اظهار نظر قطعی در مورد تأثیر تمرین ورزشی بر شاخص‌های مربوط به آپوپتوز، منوط به انجام مطالعات بیشتری است [۱۰].

لی و همکاران مطالعه‌ای را برای بررسی اثر تمرین ورزشی بر شاخص‌های آپوپتوزیس روی ۱۶ موش لاغر و ۳۲ موش چاق پنج تا شش ماهه انجام دادند از ۳۲ موش چاق، ۱۶ موش را وادار به تمرین ورزشی به مدت سه ماه و با تواتر هر روز یک ساعت دویدن روی تردمیل کردند. نتایج مطالعه بیانگر پایین بودن سطوح کاسپاز سه و نه و $TNF-\alpha$ در عضلات قلبی گروه تمرین نسبت به دو گروه دیگر بود [۱۲]. همچنین نتایج کواک و همکاران به

نه میوکارد موش‌های نر صحرایی وجود دارد ($P=0/001$). همچنین نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد گروه کنترل پایه، کنترل و محدودیت غذایی نسبت به گروه تمرین و محدودیت غذایی و تمرین افزایش معنی‌داری در میزان بیان پروتئین کاسپاز ۹ میوکارد داشتند ($P<0/05$). از سوی دیگر گروه تمرین نیز کاهش معنی‌داری در میزان بیان پروتئین کاسپاز ۹ میوکارد نسبت به گروه تمرین و محدودیت غذایی داشت ($P<0/05$) (تصویر شماره ۱ و ۲).

بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد گروه تمرین کاهش معنی‌داری در بیان پروتئین کاسپاز سه نسبت به گروه محدودیت غذایی و تمرین داشت. همچنین گروه تمرین و تمرین و محدودیت غذایی کاهش معنی‌داری در میزان بیان پروتئین کاسپاز سه نسبت به گروه محدودیت غذایی، کنترل پایه و کنترل و کاهش معنی‌داری در میزان بیان پروتئین کاسپاز سه نسبت به گروه کنترل پایه و کنترل داشت.



تصویر ۲. تغییرات کاسپاز نه در گروه‌های مختلف (* تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل پایه، کنترل و محدودیت غذایی، # تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه تمرین و محدودیت غذایی)

کاهش آپوپتوز عضله میوکارد موش‌های صحرایی مسن متعاقب تمرین استقامتی اشاره داشت. بر این اساس، آن‌ها چهل موش صحرایی را در چهار گروه (کنترل پیر، تجربی پیر، کنترل جوان، تجربی جوان) تقسیم و تحت تمرین قرار دادند. نتایج نشان داد که دوازده هفته تمرین استقامتی با شدت ۷۵ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه (پنج جلسه در هفته) به طور معنی‌داری موجب کاهش سطوح کاسپاز ۹ میوکارد موش‌های مسن شد [۱۳].

هوانگ و همکاران با در نظر گرفتن اینکه آپوپتوز قلبی در موش‌های دارای پرفشاری خون افزایش می‌یابد، مطالعه‌ای را روی این گروه از موش‌ها انجام دادند. چهارده موش با پرفشاری خون مجبور به فعالیت روی تردمیل، یک ساعت در روز و پنج روز در هفته به مدت دوازده هفته شدند. نتایج نشان داد سطوح کاسپاز سه و نه در عضلات قلبی گروه تمرین کاهش یافته بود [۱۴]. از طرفی گزارش شده است که دوازده هفته تمرین استقامتی با شدت نسبی ۷۵ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه، موجب کاهش کاسپاز سه در عضلات موش‌های پیر (۲۴ ماهه) شده است [۱۴].

اگرچه مکانیسم‌های دقیق آپوپتوز ناشی از فعالیت ورزشی به طور دقیقی مشخص نیست، اما فرضیه‌های احتمالی زیادی وجود دارند که به بررسی‌های بیشتری نیاز دارند. یکی از فرضیه‌های مهم در این زمینه این است که در حین فعالیت ورزشی، متابولیسم عضلاتی افزایش می‌یابد که منجر به تولید ROS می‌شود [۵]. کمیت زیاد ROS می‌تواند آسیب اکسیداتیو تولید کرده و بدین گونه منجر به آپوپتوز از طریق مسیر داخلی شود [۱۵].

گزارش شده است که کاهش قابل توجه بیان پروتئین کاسپاز سه متعاقب تمرین هوازی با کاهش عوامل پیش‌آپوپتوزی مانند بیان پروتئین Bax و نسبت Bax به Bcl2 و نیز افزایش معنی‌دار پروتئین ضد آپوپتوزی Bcl2 همراه بود. این کاهش پتانسیل آپوپتوز میتوکندریایی متعاقب تمرین هوازی در موش‌های سالخورده احتمالاً با کاهش رهاش عوامل آپوپتوتیک مانند سیتوکروم c و Apaf1 در عضله اسکلتی همراه شده و موجب کاهش معنی‌دار بیان کاسپاز سه شده است [۱۴].

در مسیر داخلی، میتوکندری و رتیکولوم اندوپلاسمیک محوریت فرایند را دارند که در این مسیر محوریت میتوکندری در ایجاد آپوپتوز بیشترین اهمیت را داشته و بسیاری از مطالعات بر نقش آن تمرکز کرده‌اند [۱۷، ۱۶، ۵]. در شرایط استرس‌زا عواملی مثل گلوکوکورتیکوئیدها، ROS، مونوکسید نیتروژن، داروهای شیمی‌درمانی، پرتوافکنی، کاهش محرک‌های رشدی و سایتوکین‌ها با ایجاد استرس در میتوکندری، موجب تغییراتی در نفوذپذیری آن می‌شوند و سیتوکروم c که در غشای داخلی میتوکندری و فضای بین‌غشایی قرار دارد، به داخل سیتوزول آزاد می‌شود، به فاکتور ۱ پروتئاز فعال‌کننده آپوپتوزیس (Apaf-1) متصل شده و ترکیبی به نام dATP تشکیل می‌دهد. سپس این ترکیب، از طریق فعال‌سازی پروکاسپاز نه، کاسپاز نه و کاسپاز سه موجب آپوپتوزیس می‌شود

[۱۸]. مهم‌ترین مرحله کنترل این مسیر، آزادسازی سیتوکروم c است. پروتئین‌های مهارکننده مسیر مرگ سلولی مانند Bcl-2 و Bcl-XL مانع آزادسازی سیتوکروم c شده و به این ترتیب نقش خود را ایفا می‌کنند [۱۹].

برخی از مطالعات اشاره دارند که محدودیت غذایی یا کالریکی و تمرینات ورزشی می‌تواند موجب تحریک و افزایش بیان پروتئین‌های درگیر در بیوزن میتوکندریایی شود. در این راستا کیو و همکاران با اعمال ۳۰ درصد محدودیت دریافت کالری به مدت شش ماه بر موش‌ها مشاهده کردند SOD2 و SIRT3 افزایش یافت و ROS کاهش پیدا کرد [۲۰].

با این حال و بر خلاف نتایج مطالعات مذکور، برخی از پژوهش‌ها اشاره به تسریع فرایند آپوپتوز متعاقب تمرینات ورزشی دارند که می‌توان به یافته‌های تبریزی و همکاران، هو و همکاران و کوکتورک و همکاران اشاره کرد.

هو و همکاران نشان دادند که بیان پروتئین کاسپاز سه در میوکارد موش‌ها در گروه تمرین پس از دوازده هفته تمرین استقامتی به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بوده است [۲۱]. تبریزی و همکاران نیز نشان دادند که دوازده هفته برنامه تمرین هوازی با شدت ۷۵ تا ۸۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه به طور معنی‌داری باعث افزایش بیان ژن کاسپاز نه در عضله قلبی موش‌های صحرایی نر در گروه تمرین می‌شود. به عبارتی، دوازده هفته تمرین هوازی روی نوارگردان با شدت ۷۵ تا ۸۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه، موجب افزایش قابل توجه هر دو ژن مربوط به آپوپتوز میتوکندریایی عضله قلبی موش‌های صحرایی شده و این احتمال وجود دارد که این موضوع در نهایت، موجب تشدید بروز فرایند آپوپتوز از طریق مسیر داخلی شود [۹].

یکی از علت‌های مغایرت یافته‌های تبریزی و همکاران با نتایج پژوهش حاضر سن موش‌هاست. در مطالعه تبریزی موش‌ها ۲۴ ماهه بودند، در حالی که در پژوهش حاضر موش‌ها دوماهه بودند. به نظر می‌رسد که افزایش سن یکی از مهم‌ترین عوامل بروز و تشدید آپوپتوز و افزایش استعداد آسیب، التهاب و استرس اکسایشی باشد. استرس اکسایشی، سایتوکاین‌های التهابی و اختلال در محافظت از استرس سلول، سازوکارهای احتمالی‌ای هستند که در افزایش آپوپتوز بافت‌های پیر مشارکت می‌کنند [۲۲].

کوکتورک و همکاران پاسخ آپوپتوزیسی را نسبت به فعالیت ورزشی شدید (دویدن روی تردمیل با سرعت ۲۵ متر بر دقیقه با شیب ۵ درجه تا سرحد خستگی) در عضلات دوقلو و نعلی موش‌ها مورد بررسی قرار دادند. نتایج در ارتباط با عضله نعلی حاکی از افزایش فعالیت کاسپاز سه بلافاصله پس از فعالیت بود. فعال‌سازی کاسپاز سه توسط اثرات کاسپاز نه و کاسپاز هشت تفاوت معناداری با گروه کنترل داشت. اما در فعالیت کاسپازها در دو عضله، تفاوت معناداری مشاهده نشد. این پژوهشگران نتیجه‌گیری کردند که فعال‌سازی کاسپاز ۹ نشان‌دهنده‌ی این است که آپوپتوزیس در فیبرهای عضله

نعلی، وابسته به مکانیسم داخلی و فعال سازی مکانیسم خارجی از طریق کاسپاز ۸ ایجاد می شود [۲۳].

کوئیندیری و همکاران نیز اشاره به کارکرد حفاظتی تمرین استقامتی (۷۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه) در مقابله با آپوپتوز میوکارد موش‌های صحرائی پس از آسیب ناشی از ایسکیمی پرفزیون مجدد داشتند [۲۴]. با این حال، مدارکی دال بر اثرگذاری تمرینات ورزشی بر مسیر پیام‌رسانی Wnt و پروتئین‌های وابسته به این مسیر (GSK3-β و بتا کاتنین) به عنوان تنظیم‌کننده‌های بالادست آپوپتوز در عضله قلب یافت نشد و تاکنون مطالعات اغلب بر تأثیر تمرینات بر عضله اسکلتی متمرکز شده‌اند. در این راستا آمین و همکاران عنوان داشتند میزان تام پروتئین GSK3-β سه روز پس از دویدن در سراسیبی حدود نه برابر کاهش نشان داد، اما تغییری در میزان پروتئین β-کاتنین در عضله اسکلتی موش مشاهده نشد [۲۵].

افزایش سطوح TNF-α پلاسما منجر به افزایش لیگاند متصل شونده به گیرنده TNF-α در سارکولما شده و باعث افزایش آپوپتوز در مسیر خارجی می‌شود. همه این اثرات ممکن است باعث فعال شدن کاسپاز هشت و کاسپاز سه از طریق مسیر خارجی شود. در کل، کنترل کاسپاز سه فرایند پیچیده‌ای است و چندین مسیر پیام‌رسانی آپوپتوز را درگیر می‌کند. نشان داده شده است که کاسپاز سه به وسیله فعال شدن کاسپاز دوازده از طریق مسیر آزادسازی کلسیم یا به وسیله فعال شدن کاسپاز نه در مسیر داخلی و یا افزایش TNF-α سرم در مسیر خارجی فعال می‌شود [۲۳]. همچنین، کاسپاز سه نقش مهمی در تغییر حالت بافت عضلانی، به‌ویژه در عضلات اسکلتی بازی می‌کند و برای تمایز سلولی عضله اسکلتی ضروری است. بنابراین، حفظ فعالیت کاسپاز سه پس از تمرینات ورزشی ممکن است برای سایر اعمال سلولی مانند تغییر حالت ناشی از فعالیت ورزشی و تفکیک سلول‌های ماهواره‌ای مورد نیاز باشد [۲۶]؛ بنابراین، احتمالاً سطوح پایینی از کاسپاز سه برای تحریک برخی فعالیت‌های سلولی و ترمیم یا رشد بافت متعاقب تمرین ورزشی مناسب باشد.

سازوکار آپوپتوزیس با واسطه رتیکلوم اندوپلاسمیک / سارکوپلاسمیک، مستقل از مسیر لیگاند گیرنده و مسیر میتوکندریایی است. منابع استرس روی شبکه رتیکلوم اندوپلاسمیک / سارکوپلاسمیک شامل عواملی نظیر ایسکمی، تخلیه ATP و مهم‌ترین آن‌ها استرس اکسیداتیو است [۲۷]. کالپاین‌ها همچنین با افزایش Bid و ایجاد استرس روی میتوکندری موجب افزایش رهاسازی سیتوکروم C و در نهایت کاسپاز نه می‌شوند [۲۸].

استرس روی شبکه رتیکلوم اندوپلاسمیک / سارکوپلاسمیک همچنین با سرکوب Bcl-2 موجب ایجاد استرس روی میتوکندری و در نهایت افزایش کاسپاز نه می‌شود [۲۹]. علاوه بر این، کاسپاز دوازده موجب فعال شدن کاسپاز نه مستقل از عامل Apaf-1 شده [۲۸، ۲۹] و استرس وارد شده بر شبکه رتیکلوم اندوپلاسمیک / سارکوپلاسمیک موجب افزایش استرس اکسیداتیو و تغییرات میتوکندری می‌شود که

این روند با افزایش بیان Bcl-2 سرکوب می‌شود [۲۸].

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج، به نظر می‌رسد تمرین تناوبی با شدت بالا با و بدون محدودیت کالری سازگاری‌های لازم برای مهار یا توقف آپوپتوز ناشی از تمرینات هوازی را فراهم می‌کند. به علاوه، در این تحقیق سهم کاسپاز هشت و به‌ویژه کاسپاز شش و حتی پروتئین bad به عنوان مسیرهای ایجاد برهم‌کنش احتمالی بررسی نشده است؛ بنابراین فعال‌سازی کاسپاز سه ممکن است که از مسیر بیرونی نیز منشأ گرفته باشد که از محدودیت‌های تحقیق حاضر است.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

پروتکل این مطالعه در کمیته پزشکی دانشگاه علوم پزشکی سنندج به شماره مرجع IR.MYK.REC.1397.5022 به تأیید رسیده است.

حامی مالی

این مقاله مستخرج از پایان نامه دکتری نویسنده اول در گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم انسانی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی است.

مشارکت نویسندگان

تمامی نویسندگان در نگارش این مقاله مشارکت داشته‌اند.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله هیچ‌گونه تعارضی در منافع اعلام نکردند.

References

- [1] Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Ilio CD, Laurenzi V.D. Role of Apoptosis in disease. *Aging*. 2012; 4(5):330-49. [DOI:10.18632/aging.100459] [PMID] [PMCID]
- [2] Kwak HB. Effects of aging and exercise training on apoptosis in the heart. *J of Exer Rehabi*. 2013; 9(2):219-22. [DOI:10.12965/jer.130002] [PMID] [PMCID]
- [3] Lee Y, Min K, Talbert EE, Kavazis AN, Smuder AJ, Willis WT, et al. Exercise protects cardiac mitochondria against ischemia reperfusion injury. *MedSci Sports Exerc*. 2012; 44(3):397-405. [DOI:10.1249/MSS.0b013e318231c037] [PMID]
- [4] Phaneuf S, Leeuwenburgh C. Apoptosis and exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2001; 33(3):393-6. [DOI:10.1097/00005768-200103000-00010] [PMID]
- [5] Peterson JM, Bryner RW, Sindler A, Frisbee JC, Alway SE. Mitochondrial apoptotic signaling is elevated in cardiac but not skeletal muscle in the obese Zucker rat and is reduced with aerobic exercise. *J Appl Physiol*. 2008; 105(6):1934-43. [DOI:10.1152/jap-physiol.00037.2008] [PMID] [PMCID]
- [6] Zhong N, Chen H, Zhao Q, Wang H, Yu X, Eaves AM, et al. Effects of griseofulvin on apoptosis through caspase-3- and caspase-9-dependent pathways in K562 leukemia cells: An in vitro study. *Curr Ther Res Clin Exp*. 2010; 71(16):384-97. [DOI:10.1016/S0011-393X(10)80004-9]
- [7] Rodríguez-Berriguete G, Galvis L, Fraile B, de Bethencourt FR, Martínez-Onsurbe P, Olmedilla G, et al. Immunoreactivity to caspase-3, caspase-7, caspase-8, and caspase-9 forms is frequently lost in human prostate tumors. *Hum Pathol*. 2012; 43(2):229-37. [DOI:10.1016/j.hum-path.2011.04.024] [PMID]
- [8] Harada H, Hiraoka M, Kizaka-Kondoh S. Antitumor effect of TAT-oxygen-dependent degradation-caspase-3 fusion protein specifically stabilized and activated in hypoxic tumor cells. *Cancer Res*. 2002; 62(7):2013-8. [PMID]
- [9] Javid Tabrizi N, Bashiri J, Narimani Rad M. [Effect of 12 weeks of treadmill aerobic training on cytochrome C and Caspase-9 gene expression in cardiac muscle of male rats (Persian)]. *Qom Univ Med Sci J*. 2017; 11(6):1-9. <http://journal.muq.ac.ir/article-1-869-en.html>
- [10] Siahkohian M, Asgharpour-arshad M, Bolboli L, Jafari A, Sheikhzadeh hesari F. [Effect of 12- weeks aerobic training on some indices of skeletal muscle apoptosis in male rats (Persian)]. *Med J Tabriz Univ Med Sci Health Serv*. 2018; 39(6):35-43. <https://www.sid.ir/fa/journal/ViewPaper.aspx?id=359071>
- [11] Marzetti E, Lawler JM, Hiona A, Manini T, Seo AY, Leeuwenburgh C. Modulation of age-induced apoptotic signaling and cellular remodeling by exercise and calorie restriction in skeletal muscle. *Free Radic Biol Med*. 2008; 44(2):160-8. [DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2007.05.028] [PMID]
- [12] Lee SD, Shyu WC, Cheng IS, Kuo CH, Chan YS, Lin YM, et al. Effects of exercise training on cardiac apoptosis in obese rats. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2013; 23(6):566-73. [DOI:10.1016/j.numecd.2011.11.002] [PMID]
- [13] Kwak HB, Song W, Lawler JM. Exercise training attenuates age-induced elevation in Bax/Bcl-2 ratio, apoptosis, and remodeling in the rat heart. *FASEB J*. 2006; 20(6):791-3. [DOI: 10.1096/fj.05-5116fje] [PMID]
- [14] Huang Ch, Lin TJ, Chen ChCh, Lin WT. Endurance training accelerates exhaustive exercise-induced mitochondrial DNA deletion and apoptosis of left ventricle myocardium in rats. *Eur J Appl Physiol*. 2012; 107(6):697-706. [DOI:10.1007/s00421-009-1177-4] [PMID]
- [15] Rastogi RP, Rajeshwar R, Sinha RP. Apoptosis: Molecular mechanisms and pathogenicity. *EXCLI J*. 2009; 8:155-88.
- [16] Marzetti E, Privitera G, Simili V, Wohlgenuth SE, Aulisa L, Pahor M, et al. Multiple pathways to the same end: mechanisms of myonuclear apoptosis in sarcopenia of aging. *ScientificWorldJournal*. 2010; 10:340-9. [DOI:10.1100/tsw.2010.27] [PMID] [PMCID]
- [17] Viña J, Gomez-Cabrera MC, Borrás C, Froio T, Sanchis-Gomar F, Martínez-Bello VE et al. Mitochondrial biogenesis in exercise and in ageing. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009; 61(14):1369-14. [DOI:10.1016/j.addr.2009.06.006] [PMID]
- [18] Wang ZB, Liu YQ, Cui YF. Pathways to caspase activation. *Cell Biol Int*. 2005; 29(7):489-96. [DOI:10.1016/j.cellbi.2005.04.001] [PMID]
- [19] Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: Opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; 9(1):47-59. [DOI:10.1038/nrm2308] [PMID]
- [20] Qiu X, Brown K, Hirschey MD, Verdin E, Chen D. Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation. *Cell Metab*. 2010; 12(6):662-7. [DOI:10.1016/j.cmet.2010.11.015] [PMID]
- [21] Ho TJ, Huang CC, Huang CY, Lin WT. Fasudil, a Rho-kinase inhibitor, protects against excessive endurance exercise training-induced cardiac hypertrophy, apoptosis and fibrosis in rats. *Eur J Appl Physiol*. 2012; 112(8):2943-55. [DOI:10.1007/s00421-011-2270-z] [PMID]
- [22] Song W, Kwak HB, Lawler JM. Exercise training attenuates age-induced changes in apoptotic signaling in rat skeletal muscle. *Antioxid Redox Signal*. 2006; 8(3-4):517-28. [DOI:10.1089/ars.2006.8.517] [PMID]
- [23] Koçtürk S, Kayatekin BM, Resmi H, Açıkgöz O, Kaynak C, Ozer E. The apoptotic response to strenuous exercise of the gastrocnemius and soleus muscle fibers in rats. *Eur J Appl Physiol*. 2008; 102(5):515-24. [DOI:10.1007/s00421-007-0612-7] [PMID]
- [24] Quindry JC, Miller L, McGinnis G, Kliszczewicz B, Irwin JM, Landram M, et al. Ischemia reperfusion injury, KATP channels, and exercise-induced cardioprotection against apoptosis. *J Appl Physiol*. 2012; 113(3):498-506. [DOI:10.1152/jap-physiol.00957.2011] [PMID] [PMCID]
- [25] Amin H, Vachris J, Hamilton A, Steuerwald N, Howden R, Arthur ST. GSK3 β inhibition and LEF1 upregulation in skeletal muscle following a bout of downhill running. *J Physiol Sci*. 2014; 64(1):1-11. [DOI:10.1007/s12576-013-0284-5] [PMID]
- [26] 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; 113(7):1048-57. [DOI:10.1152/jap-physiol.00290.2012] [PMID]
- [27] Rasheva VI, Domingos PM. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis*. 2009; 14(8):996-1007. [DOI:10.1007/s10495-009-0341-y] [PMID]
- [28] Szegedzi E, Fitzgerald U, Samali A. Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: The story so far. *Ann N Y Acad Sci*. 2003; 1010:186-94. [DOI:10.1196/annals.1299.032] [PMID]
- [29] Zhang Q, Liu J, Chen S, Liu J, Liu L, Liu G, et al. Caspase-12 is involved in stretch-induced apoptosis mediated endoplasmic reticulum stress. *Apoptosis*. 2016; 21(4):432-42. [DOI: 10.1007/s10495-016-1217-6] [PMID]

This Page Intentionally Left Blank
