JME
https://jme.guilan.ac.ir/
https://doi.org. 10.22124/jme.2024.26340.343

دوفصلنامه سوخت‌وساز و فعالیت ورزشی
سال چهاردهم، جلد چهاردهم، شماره ۱

Open Access
مقاله پژوهش

تاثیر تمرین تناوبی شدید و مصرف مکمل ملاتونین بر برخی شاخص‌های آپوپتوزی در بافت کلیه موش صحرایی نر پس از ایسکمی – رپرفیوژن کلیوی

فریبا پوراصغر[۱]، جبار بشیری*[۲]، رقیه پوزش جدیدی[۳]، حسن پوررضی[۴]، میر علیرضا نور آذر[۵]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۱۰ تاریخ چاپ: ۱۴۰۳/۰۲/۱۰

چکیده

مقدمه: هدف پژوهش حاضر بررسی تاثیر تمرین ورزشی تناوبی شدید و مکمل ملاتونین بر شاخص‌های آپوپتوزی بافت کلیه در موش‌های صحرایی مبتلا به آسیب ایسکمی رپرفیوژن کلیوی می‌باشد. **روش کار:** ۳۰ سر موش صحرایی نر از نژاد ویستار (وزن: ۲۵۰ الی ۳۰۰ گرم) به طور تصادفی در ۵ گروه سالم، ایسکمی I/R، گروه IR + تمرین تناوبی شدید، گروه IR + مکمل ملاتونین و گروه IR + تمرین تناوبی شدید + مکمل ملاتونین تقسیم شدند. به غیر از گروه سالم در دیگر گروه های آزمون، حیوانات مورد ایسکمی-رپرفیوژن قرار گرفتند. پروتکل تمرین تناوبی شدید به مدت ۱۲ هفته (۵ روز در هفته) اجرا شد. اندازه گیری شاخص های بیان ژن Caspaze 3، Bax، Bcl2 و TNFα به روش Real time PCR انجام شد. با توجه به توزیع غیر نرمال متغیرها، داده ها با استفاده از آزمون ناپارامتری کروسکال- والیس، یومن ویتنی و ویلکاکسن در سطح معنی داری p<۰/۰۵ تحلیل شدند. **یافته‌ها:** نتایج ارزیابی افزایش میزان Bax، Bax/Bcl2، Caspase3 و TNFα و کاهش معنی دار (p<۰/۰۵) Bcl2 در گروه ایسکمی-رپرفیوژن نسبت به گروه سالم را نشان می دهد. انجام تمرین تناوبی شدید به همراه مصرف مکمل ملاتونین باعث کاهش معنی دار (p<۰/۰۵) میزان Bax، Caspase3، TNFα و Bax/Bcl2 و افزایش معنی دار (p<۰/۰۵) Bcl2 نسبت به گروه ایسکمی شد. همچنین مصرف منظم مکمل ملاتونین بعد از ایسکمی رپرفیوژن کلیه منجر به کاهش معنی دار (p<۰/۰۵) TNFα نسبت به گروه ایسکمی شده است. **نتیجه‌گیری:** به نظر می رسد تمرین تناوبی شدید و مصرف مکمل ملاتونین در حفاظت از بافت کلیه در برابر التهاب ناشی از ایسکمی رپرفیوژن کلیوی و آسیب آپوپتوز موثر باشد.

واژگان کلیدی: تمرین تناوبی شدید، ملاتونین، ایسکمی رپرفیوژن کلیه، آپوپتوز.

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزش، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.۲. دانشیار، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی ، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران. ۳.استادیار، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی ، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران. ۴.استادیار، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه بین المللی امام خمینی، قزوین، ایران. ۵.استادیار، گروه دامپزشکی ، دانشگاه آزاد علوم پزشکی، تبریز، ایران

* نشانی الکترونیک نویسنده مسئول: bashiri.jabbar@iaut.ac.ir

JME
https://jme.guilan.ac.ir/
https://doi.org/10.22124/jme.2024.26340.343

مقدمه

آسیب حاد کلیوی ناشی از ایسکمی خونرسانی مجدد (IR)[1] کلیه به عنوان یک بیماری شایع کلیوی در عمل بالینی است که در بسیاری از موارد کلینیکی مانند شوک، پیوند، عفونت و جراحی‌های عروق ایجاد می‌شود و در نهایت می‌تواند به ایجاد اسیب حاد کلیوی بینجامد. ایسکمی-پرفیوژن مجدد عامل تعیین کننده برای بهبود عملکرد زود هنگام پیوند کلیه است (۱). شواهد بیولوژیکی مولکولی نشان می‌دهد که آپوپتوز[2] مکانیسم اولیه مرگ سلولی در طول ایسکمی رپرفیوژن کلیوی است. آپوپتوز یا مرگ برنامه ریزی شده سلولی نوعی فرآیند تحت کنترل ژن ها است که در حذف سلول های ناخواسته یا غیرضروری در موجودات زنده نقش دارد (۲). میتوکندری محل استقرار بسیاری از پروتئین های درگیر در مراحل اولیه آپوپتوز از جمله اعضای خانواده Bcl2[3] است (۲). پروتئین های خانواده Bcl2 و Bax[4] به ترتیب نقش بازدارنده و آغازگر در وقوع آپوپتوز دارند. Bcl2 در مهار رهایش سیتوکروم c از میتوکندری نقش دارد. سطوح بالای Bcl2 نسبت به Bax بقاء سلول را افزایش می دهد در حالی که نسبت معکوس آنها مرگ سلولی را به دنبال دارد (۳). اخیرا تاثیر تمرینات ورزشی با شدت‌ها و حجم‌های مختلف بر فرآیند آپوپتوز توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده است. منتظری و همکاران (۲) اثر ۸ هفته تمرین مقاومتی بر مارکرهای آپوپتوز سلول های قلب رت های دیابتی شده را مورد بررسی قرار دادند. مقادیر گلوکز، انسولین، شاخص مقاومت به انسولین سرمی و سطوح بیان ژن Bax ،Bcl2, Caspase8 و نسبت Bax/Bcl2 ارزیابی شد. در رت های دیابتی ۸ هفته تمرین مقاومتی منجر به کاهش معنی داری در بیان ژن Bax و نسبت Bax/Bcl2 و افزایش معنی داری در Bcl2 و Caspase 8 نسبت به گروه کنترل است. نتایج نشان داد که تمرینات مقاومتی می تواند به عنوان یک راهکار غیر دارویی برای کاهش عوارض آپوپتوز سلول های قلبی در افراد دیابتی مورد استفاده قرار گیرد. مطالعات شن و همکاران (۱) بر اثرات محافظتی پیش شرط سازی ایسکمیک (IP[5]) بر موش های صحرایی با آسیب ایسکمی- پرفیوژن مجدد کلیه و اثرات آن بر بیان Bcl2 و Bax نشان داد که که سطوح کراتنین و BUN در گروه‌های IR و IP به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد و سطوح Cr[6] و BUN[7] در گروه IR به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) بیشتر از گروه IP است. فعالیت SOD در گروه IR و گروه IP به طور

[1] Ischemia-Reperfusion (IR)
[2] Apoptosis
[3] B- Cell Lymphoma 2
[4] Bcl2-Associated X Protein
[5] Ischemic Preconditioning (IP)
[6] Ceratinine (Cr)
[7] Blood Urea Nitrogen (BUN)

https://doi.org/10.22124/jme.2024.26340.343

معنی داری (P<۰/۰۵) کمتر از گروه کنترل و فعالیت SOD[1] در گروه IR به طور معنی داری کمتر از گروه IP می باشد. IP می‌تواند از موش‌های مبتلا به آسیب ایسکمی-پرفیوژن مجدد کلیه با افزایش سطح بیان Bcl2 و کاهش سطح بیان Bax محافظت کند. در تحقیقات زیادی ورزش و ملاتونین به عنوان دو عنصر آنتی آپوپتوزی معرفی شده است (۴، ۵، ۶ و ۷). ملاتونین دارای اثرات ضد التهابی و ضد آپوپتوز (۸ و ۹) و همچنین سایر خواص قابل توجه محافظ سلولی است (۱۰ و ۱۱). ملاتونین به دلیل توانایی قوی در کاهش ROS به عنوان یک آنتی اکسیدان عالی نشان داده شده است و این ویژگی به ملاتونین توانایی محافظت از DNA در برابر استرس اکسیداتیو را ارائه می دهد (۱۲). عبدالرزاق و همکاران (۱۳) اثر پیش درمانی ملاتونین و پیش شرطی سازی ایسکمیک بر آسیب ایسکمی رپرفیوژن مجدد کلیه را بررسی کردند. نمونه‌های بافت کلیه برای ارزیابی هیستوپاتولوژیک و تعیین سیتوکین‌های پیش التهابی و ضد التهابی کلیه، پروتئین آپوپتوز کاسپاز ۳، مارکرهای استرس اکسیداتیو و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گرفته شد. نتایج نشان داد که ترکیب ملاتونین و IP اثرات مفید بهتری بر IR کلیوی نسبت به استفاده از هر یک به تنهایی دارند. ال ساکا و همکاران (۱۴) بررسی اثرات ورزش متوسط و شدید بر آسیب کبدی ناشی از IR در موش های صحرایی نر آلبینو را مطالعه کردند و نتایج نشان داد که تمرینات ورزشی شدید قبل از IR سطح TNF-α را به صورت معنی داری افزایش می دهد و همچنین مقدار کاسپاز در تمرینات شدید نسبت به گروه IR و شم افزایش معنی داری را داشته است. مطالعات گذشته اثر بخشی تمرینات ورزشی و مصرف مکمل ملاتونین بر پیش آماده سازی در برابر بیماری های کلیوی را قبل از IR نشان می دهند. و ازآنجائیکه اثر تمرین ورزشی تناوبی شدید و مصرف مکمل ملاتونین بر بیماران کلیوی جای مطالعه دارد لذا هدف و نوآوری این پژوهش بررسی اثر بخشی تفکیکی و تعاملی تمرین تناوبی شدید و مصرف مکمل ملاتونین بر شاخص های آپوپتوز بافت کلیه در موش‌های صحرایی مبتلا به آسیب ایسکمی رپرفیوژن کلیوی و روند تشدید آسیب بر آن می باشد.

روش کار

گروه های آزمایشی:

مطالعه بر روی ۳۰ سر موش صحرایی نر حدودا دو ماهه در محدوده وزنی ۲۵۰ الی ۳۰۰ گرم از نژاد ویستار از مرکز انسیستیتو پاستور کرج تهیه و در شرایط استاندارد (دمای۲±۲۲ درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی ۵±۵۰ درصد و چرخه تاریکی و

[1] Super Oxide Dismutase (SOD)

Copyright © The Authors Publisher: University of Guilan

روشنایی ۱۲:۱۲ ساعته) در قفسی از مواد پلی کربنات شفاف و قابلیت اتوکلاو با اندازه ۲۱×۳۲×۵۴ در آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد تبریز نگهداری شدند.

برای هر گروه (۵ گروه) و هر متغیر براساس فرمول کوهن با توجه به متوسط اندازه اثر ۱۳ متغیر (۰/۴۵) و حداقل توان آزمون ۸۰ درصد تعداد نمونه های لازم برای هر متغیر در این تحقیق ۶ نمونه در نظر گرفته شد. کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی در این پژوهش بر اساس دستورالعمل کمیته اخلاق و قوانین حمایت از حیوانات آزمایشگاهی پژوهش های زیست پزشکی رعایت شد (کد اخلاق در پژوهشهای زیست پزشکی IR.IAU.TABRIZ.REC.1402.133). جهت ایجاد مدل نفروکتومی یک طرفه ابتدا حیوانات در گروههای ایسکمی-رپرفیوژن به وسیله تزریق درون صفاقی (زایلازین mg/kg ۵ و محلول کتامین mg/kg ۴۰) بیهوش شدند. پس ازضد عفونی کردن برش طولی بر روی شکم ایجاد و عروقی که وارد کلیه چپ حیوان می‌شود به وسیله کلمپ بوداک به مدت ۴۵ دقیقه مسدود شده و سپس پرفیوژن برقرار گردید. سپس محل برش جراحی با نخ سیلک ۳ صفر دوخته شده و حیوانات به قفس‌های مجزا انتقال یافته و تیمار شدند. پس از گذشت ۱۵ روز از ایجاد عمل نفروکتومی یک طرفه، حیوانات دسترسی آزاد به جیره استاندارد پلت و آب آشامیدنی قرار گرفتند. پس از یک دوره سازگاری ۶ روزه، حیوانات به طور تصادفی به پنج گروه ۶ حیوانی تقسیم بندی شدند: ۱- گروه سالم: گروه بدون (پروتکل تمرین ورزشی ، دریافت مکمل و جراحی) ، حیوانات فقط از آب و غذای معمولی و استاندارد استفاده نمودند، ۲- گروه ایسکمی IR : در این گروه بر روی حیوانات ایسکمی رپرفیوژن انجام شد و حیوانات از آب و غذای معمولی استفاده کردند، ۳-گروه ایسکمی + تمرین: در این گروه بر روی حیوانات ایسکمی رپرفیوژن انجام شد و تحت پروتکل تمرین ورزشی با تناوب شدید قرار گرفتند. حیوانات فقط از آب و غذای معمولی استفاده کردند، ۴-گروه ایسکمی + مکمل: در این گروه بر روی حیوانات ایسکمی رپرفیوژن انجام شد و حیوانات از آب و غذای معمولی و مکمل ملاتونین استفاده کردند، ۵- گروه ایسکمی + تمرین + مکمل: در این گروه بر روی حیوانات ایسکمی رپرفیوژن انجام شد و تحت پروتکل تمرین ورزشی با تناوب شدید قرار گرفتند. حیوانات از آب و غذا و مکمل ملاتونین استفاده کردند.

پروتکل مکمل دهی:

پودر ملاتونین به میزان ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن رت (۲/۵ میلی گرم برای هر رت) ابتدا با ترازوی دیجیتال وزن شد

سپس با اتانول در میکروتیوپ حل شده و با محلول سالین رقیق شد و نیم سی سی از این محلول اماده شده بصورت روزانه، به مدت ۱۲ هفته در گروه ایسکمی + مکمل ملاتونین، و گروه ایسکمی + تمرین تناوبی شدید + مکمل ملاتونین (بعد از تمرین) با سرنگ ونیدل گاواژ انجام گرفت. (۱۵، ۱۶ و۱۷).

پروتکل تمرینات ورزشی:

پروتکل تمرین با اینتروال شدید به مدت ۳ ماه با ۵ جلسه در هفته انجام شد. در ابتدا تمامی موش‌های صحرایی به مدت ۷ روز تحت برنامه‌ی آشنایی با نحوه فعالیت روی نوارگردان قرار گرفتند. در طی این دوره، شیب نوارگردان صفر درصد، سرعت در ابتدای دوره ۱۵-۱۰ متر بر دقیقه و در انتهای دوره ۲۰-۲۵ متر بر دقیقه و مدت تمرین۱۰-۵ دقیقه در روز بود. پس از دوره آشناسازی، همه حیوانات یک آزمون فزاینده را برای محاسبه سرعت بیشینه (Vmax) اجرا کردند. در این آزمون، سرعت دویدن با ۱۰ متر بر دقیقه شروع و هر دو دقیقه یکبار، سرعتی معادل با سه متر بر دقیقه به آن اضافه شد تا زمانی که موش‌ها به حالت واماندگی برسند (ملاک ۳بار افتادن روی شوک یا خروج از نوار تریدمیل است). پروتکل اصلی تمرین (جدول ۱) سرعت دویدن در تناوب‌های با شدت بالا حدود ۹۰-۸۵ درصد سرعت بیشینه و در تناوب‌های با شدت پائین (استراحت فعال) حدود ۵۰-۴۵ درصد سرعت بیشینه بود (۱۸). و برای رعایت اصل اضافه بار، هر هفته حدود پنج درصد به میانگین سرعت نوارگردان اضافه شد. برنامه‌های گرم و سرد کردن در ابتدا و انتهای هر تمرین به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰ متر بردقیقه برابر با ۴۰-۳۰٪ Vo2max برای موش ها در نظر گرفته شد.

سنجش متغیرها:

پس از ۳ ماه تجویز، در نهایت رت‌ها ۲۴ ساعت پس از پایان پروتکل تمرینی با بیهوشی با اتر کشته و کالبد شکافی انجام گردید. کلیه خارج شده و بافت کلیه در انتهای مرحله جهت بررسی شاخص های بیان ژن در فریزر ۷۰- نگهداری شدند و همچنین از تمامی نمونه‌ها جهت بررسی اسیب شناسی بافت کلیه در فرمالین بافر ۱۰ درصد تثبیت شدند. از نمونه های بافتی با استفاده از روش های معمول پاساژ بافت و تهیه مقاطع آسیب شناسی برش های متوالی با ضخامت ۵ میکرون و با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (H&E) آماده شده و یافته‌های هیستوپاتولوژیک بافت کلیه با توجه به میزان آسیب هیستوپاتولوژیک بررسی شدند. برای آنالیز تغییرات پاتولوژیک داده ها از مطالعات میکروسکوپی استفاده گردید. اندازه گیری شاخص های بیان ژن Caspaze3، Bax، Bcl2 و TNFα به روش

Copyright © The Authors Publisher: University of Guilan

https://doi.org/10.22124/jme.2024.26340.343

آزمایشگاهی(Real time PCR) انجام شد. اصول کلی این روش مشابه PCR معمولی است با این تفاوت که در این تکنیک، الگو cDNA بوده و کمیت آن همگام با پیشرفت واکنش PCR توسط دستگاه آشکارسازی می شود. برای اندازه‌گیری میزان بیان ژن پروتئین‌های مورد نظر از دستگاه مربوطه Rotor gene-6000 (Corbett, USA) استفاده شد. جفت پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از نرم افزار Primer 3 طراحی و توسط بایونیر (Bioneer, Germany) سنتز شده و برای کار با غلظت نهایی nm ۱۰۰ مورد استفاده قرار گرفت و توالی پرایمرها ارائه گردید (جدول ۲). سطح بیان mRNA ژن‌ها به وسیله دستگاه PCR qRT- و با استفاده از SYBER GREEN اندازه‌گیری شد. از GAPDH به عنوان ژن مرجع (house keeping) و برای به دست آوردن تغییرات بیان ژن در qRT-PCR از روش $2^{-(\Delta CT)}$ استفاده شد.

$$\Delta CT = CT\ Target - CT\ Reference$$

تحلیل آماری:

جهت تحلیل اعداد خام بدست آمده از پارامترهای هیستو پاتولوژی از روش mean±SEM و برای نرمالیته از آزمون شاپیرو-ویلک و برای بررسی اختلاف معنی دار بین گروه ها برای داده های پارامتریک از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) Tukey و برای داده‌های غیر-پارامتریک از آزمون کروسکالوالیس و یومن ویتنی در سطح معنی داری ۰/۰۵ انجام گردید.

یافته‌ها

نتایج تحلیل آماری:

شکل ۱ و جدول ۲ نتایج داده متغیر های Caspase 3، Bax، Bax/Bcl2 ، Bcl2، TNFα را به صورت میانگین ± خطای استاندارد به تفکیک گروه های آزمایشی نشان می دهد. در این تحلیل مقایسه دو دویی گروه های ایسکمی+ تمرین، ایسکمی+ مکمل، ایسکمی+تمرین+ مکمل با گروه های سالم و ایسکمی با آزمون ناپارامتری یومن ویتنی و ویلکاسن انجام گرفت. نتایج تحلیل داده ها نشان داد که میزان بیان ژن Bax در گروه ایسکمی نسبت به گروه سالم ۲ برابر افزایش و در ایسکمی+ تمرین، ایسکمی+ مکمل، ایسکمی+ تمرین و مکمل به ترتیب ۰/۲، ۰/۵۵ و ۰/۵۳ برابر شده (کاهش داشته) و اختلاف گروه های ایسکمی+ تمرین، ایسکمی+ تمرین+ مکمل نسبت به گروه شاهد معنی دار است (p ۰/۰۵ >). همچنین میزان Bax در گروه ایسکمی+ تمرین، ایسکمی+ مکمل و ایسکمی+ تمرین+ مکمل نسبت به گروه ایسکمی به ترتیب ۰/۱، ۰/۲۷ ، ۰/۲۶ به طور قابل توجهی کاهش یافت که این اختلاف در گروه ایسکمی+ تمرین و ایسکمی + تمرین+ مکمل معنی دار

JME
https://jme.guilan.ac.ir/
https://doi.org/10.22124/jme.2024.26340.343

است (p<۰/۰۵). میزان بیان ژن Bcl2 در گروه ایسکمی ، ایسکمی+ تمرین ، ایسکمی + مکمل و ایسکمی + تمرین + مکمل نسبت به سالم ۰/۳۴، ۰/۵۱، ۰/۸۴ و ۰/۷۱ برابر کاهش داشته که در گروه ایسکمی این اختلاف معنی دار است (p <۰/۰۵) و در مقایسه با گروه ایسکمی گروه های ایسکمی+ تمرین، ایسکمی+ مکمل و ایسکمی+ تمرین+ مکمل به ترتیب ۱/۶۱، ۲/۶۳ و ۲/۲۵ برابر افزایش داشته است که این اختلاف در گروه ایسکمی+ تمرین+ مکمل معنی دار است (p <۰/۰۵). مقدار بیان ژن Bax/Bcl2 نسبت به گروه سالم در گروه ایسکمی به طور قابل توجهی ۶/۳۱ برابر افزایش داشته و گروه های ایسکمی + تمرین، ایسکمی + مکمل و ایسکمی + تمرین + مکمل به ترتیب ۰/۳۸، ۰/۶۴ و ۰/۷۵ برابر کاهش داشته است. درمقایسه با گروه ایسکمی مقدار Bax/Bcl2 در گروه های ایسکمی + تمرین، ایسکمی+ مکمل و ایسکمی + تمرین+ مکمل به ترتیب ۰/۰۶، ۰/۱۰ و ۰/۱۱ برابر کاهش داشته است که در گروه های ایسکمی + تمرین و ایسکمی + تمرین + مکمل این اختلاف معنی دار است (p <۰/۰۵).

کلافه مویرگی گلومرولی (پیکان نازک) و همچنین پرخونی و خونریزی همراه با ادم ملایم تا متوسط در فضای بینابینی (نوک پیکان) قابل مشاهده است.

در نمونه‌های بافتی گروه ایسکمی+تمرین+ مکمل (شکل ۲ ح) از بروز تغییرات پاتولوژیک در بافت کلیه به شدت کاسته شده بود و تغییرات بافتی عمدتا به شکل پرخونی و ادم خفیف واکوئولاسیون خفیف سیتوپلاسم سلول‌های پوششی توبولی (نوک پیکان) و همچنین پرخونی، ادم و ارتشاح خفیف تک هسته‌ای‌ها در فضای میان بافتی می باشد. آسیب‌های گلومرولی (پیکان) نیز در حد جزئی قابل مشاهده است و از تغییرات بافت بینابینی نیز به شدت کاسته شده و ادم و پرخونی خفیفی (پیکان ضخیم) در آن مشاهده می شود. شکل ۲ ذ، در منطقه مدولای بافت کلیه تغییرات شدید و گسترده دژنراتیو در سلول‌های اپیتلیال توبولی (نوک پیکان) و پرخونی و خونریزی شدید در بافت بینابینی این منطقه از کلیه (پیکان) رت ها در گروه ایسکمی را نشان می دهد. در منطقه مدولای نمونه های بافتی کلیه متعلق به این گروه، تغییرات متوسط دژنراتیو در سلول های اپیتلیال توبولی (نوک پیکان) و همچنین پرخونی و خونریزی همراه با ادم متوسط در بافت بینابینی این منطقه از کلیه (پیکان) مشاهده می گردد (شکل۲ ر). در گروه ایسکمی + مکمل (شکل ۲ ز) ، تغییرات ملایم تا متوسط دژنراتیو در سلول‌های اپیتلیال توبولی و همچنین پرخونی و خونریزی همراه با ادم ملایم تا متوسط در بافت بینابینی این منطقه از کلیه مشخص است. همچنین در

Copyright © The Authors Publisher: University of Guilan

https://doi.org/10.22124/jme.2024.26340.343

گروه ایسکمی+ تمرین+مکمل (شکل ۲ س)، از شدت آسیب بافت مدولای کلیه به خوبی کاسته شده و تغییرات جزئی و خفیف دژنراتیو در سلول‌های اپیتلیال توبولی (نوک پیکان) و همچنین پرخونی و خونریزی همراه با ادم خفیف در فضای بینابینی این منطقه از کلیه (پیکان) دیده می‌شود. جدول ۳ رتبه بندی و مقایسه آسیب‌های بافت کلیه در تمامی گروه‌های مورد مطالعه را نشان می دهد. ایسکمی+تمرین+مکمل کمترین و ایسکمی به تنهایی شدیدترین آسیب را به بافت کلیه موش های صحرایی داشته است. ایسکمی+مکمل و ایسکمی+ تمرین به ترتیب آسیب ملایم تا متوسط به بافت کلیه را داشته اند.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که افزایش میزان بیان ژن Bax، Bax/Bcl2، Caspase3 و TNFα و کاهش معنی دار Bcl2 در گروه IR نسبت به گروه سالم نشان دهنده تغییر فیزیولوژی کلیه و آسیب به کلیه است که با یافته های منتظری و همکاران (۲) و شن و همکاران (۱) همسو است. در فاز ایسکمی مدیاتورهای آماسی متعددی در بافت آسیب دیده آزاد می شوند که مهمترین آنها فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا (TNFα) می باشد که به دامنه آسیب ایسکمیک می افزاید (۲۰، ۲۱،۱۳). ایسکمی کلیه باعث ایجاد یک آبشار التهابی می شود که در آسیب کلیوی بیشتر دخیل است. بنابر این مهار پاسخ های التهابی یک رویکرد درمانی برای محافظت از بافت کلیه است .فعالیت پروتئین Caspase 3 در موش های در معرض ایسکمی به طور قابل توجهی از موش های سالم افزایش یافته که نشان دهنده مرگ سلولی است (۲۲ ،۲۳، ۲۴). مقایسه نتایج متغیرهای بیان ژن و همچنین ارزیابی هیستو پاتولوژی نشان داد که تمرین تناوبی شدید به همراه مصرف منظم مکمل ملاتونین، مصرف مکمل ملاتونین به تنهایی، تمرین تناوبی شدید به تنهایی به ترتیب بیشترین تا کمترین اثر را در کاهش آسیب به بافت کلیه بعد از IR را داشته اند. انجام تمرین تناوبی شدید به همراه مصرف مکمل ملاتونین باعث کاهش معنی دار میزان بیان ژن Bax، Caspase3، TNFα و Bax/Bcl2 و افزایش معنی دار Bcl2 نسبت به گروه IR شده است. به نظر می رسد محیط مناسبی برای بقا ی سلول های بافت کلیه و احتمالا توقف آپوپتوز فراهم شده که نشان دهنده محافظت از بافت کلیه در برابر آسیب آپوپتوز و التهاب ناشی از ایسکمی کلیوی است.

https://doi.org/10.22124/jme.2024.26340.343

جدول ۱: پروتکل تمرین موش های صحرایی

هفته		۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
تناوب شدید Vo2max ۸۵-۹۰ ٪	سرعت نوارگردان (متر بر دقیقه)	۲۶	۲۶	۲۷	۲۸	۲۹	۳۰	۳۱	۳۲	۳۳	۳۴	۳۵	۳۶
	زمان تناوب (دقیقه)	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲
تناوب سبک (استراحت فعال) Vo2max ۴۵-۵۰ ٪	سرعت نوارگردان (متر بر دقیقه)	۱۰	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸	۱۹	۲۰
	زمان تناوب (دقیقه)	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲
تعداد تکرار		۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶
شیب نوار گردان		۳	۳	۳	۳	۳	۳	۳	۳	۳	۳	۳	۳
مدت کل تمرین (دقیقه در روز)		۲۰	۲۴	۲۸	۳۲	۳۶	۴۰	۴۴	۴۸	۵۲	۵۶	۶۰	۶۴

جدول۲- توالی پرایمر ژنهای مورد استفاده در qRT-PCR

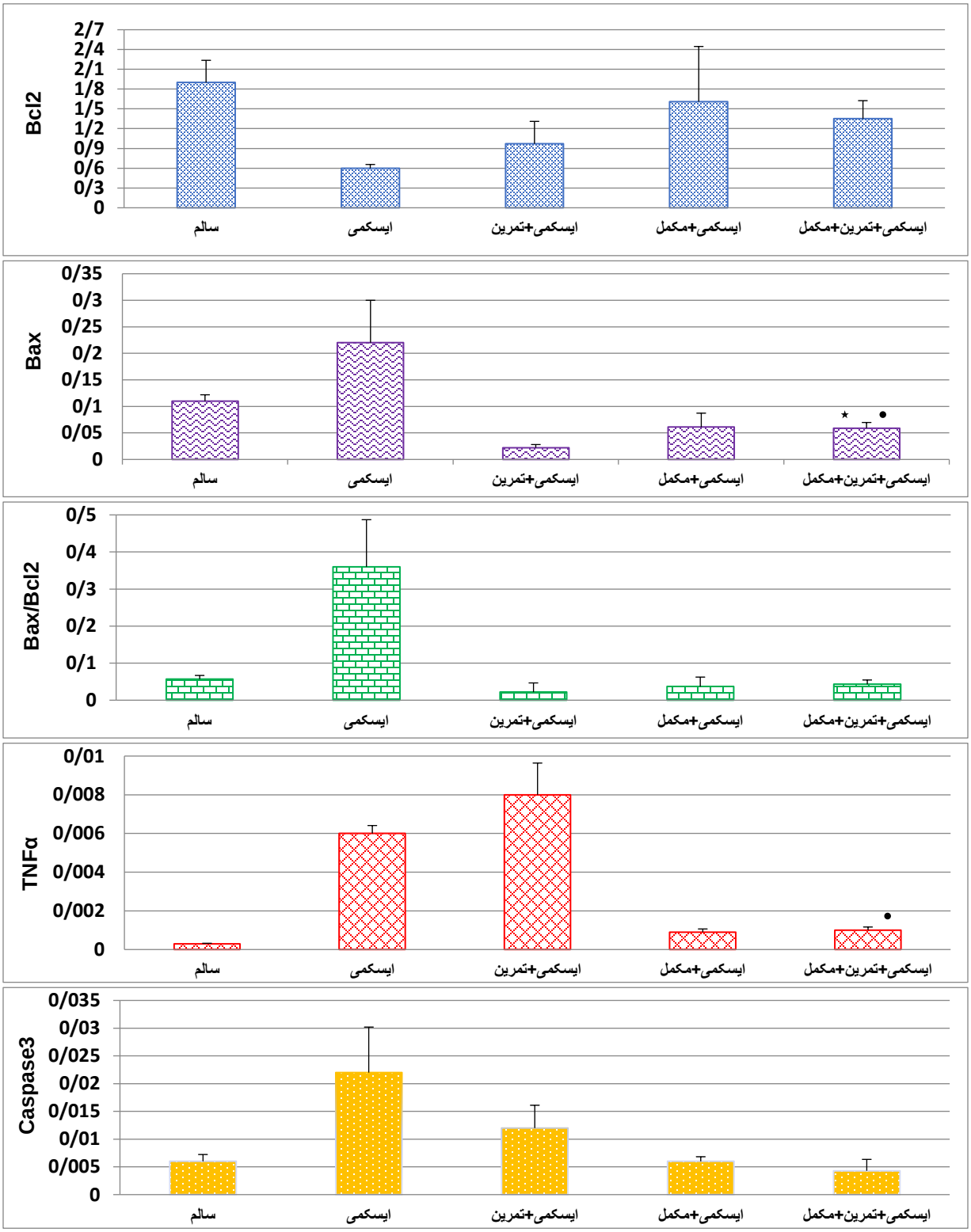
Target	Forward primer	Reverse primer
CASPASE 3	TGGAGGCCGACTTCCTGTATG	GATGAACCATGACCCGTCCCT
TNF	CGGGCTCAGAATTTCCAACA	CGCAATCCAGGCCACTACTT
BAX	GACTCCCCCCGAGAGGTCTT	ACAGGGCCTTGAGCACCAGTT
BCl-2	GAGCGTCAACAGGGAGATGTC	TGCCGGTTCAGGTACTCAGTC
GAPDH	CCCATCACCATCTTCCAGGAG	GAAGGGGCGGAGATGATGAC

جدول ۳- تاثیر انجام تمرین تناوبی شدید و مصرف مکمل ملاتونین بر آسیب ایسکمی- رپرفیوژن بافت کلیه در موش های صحرایی

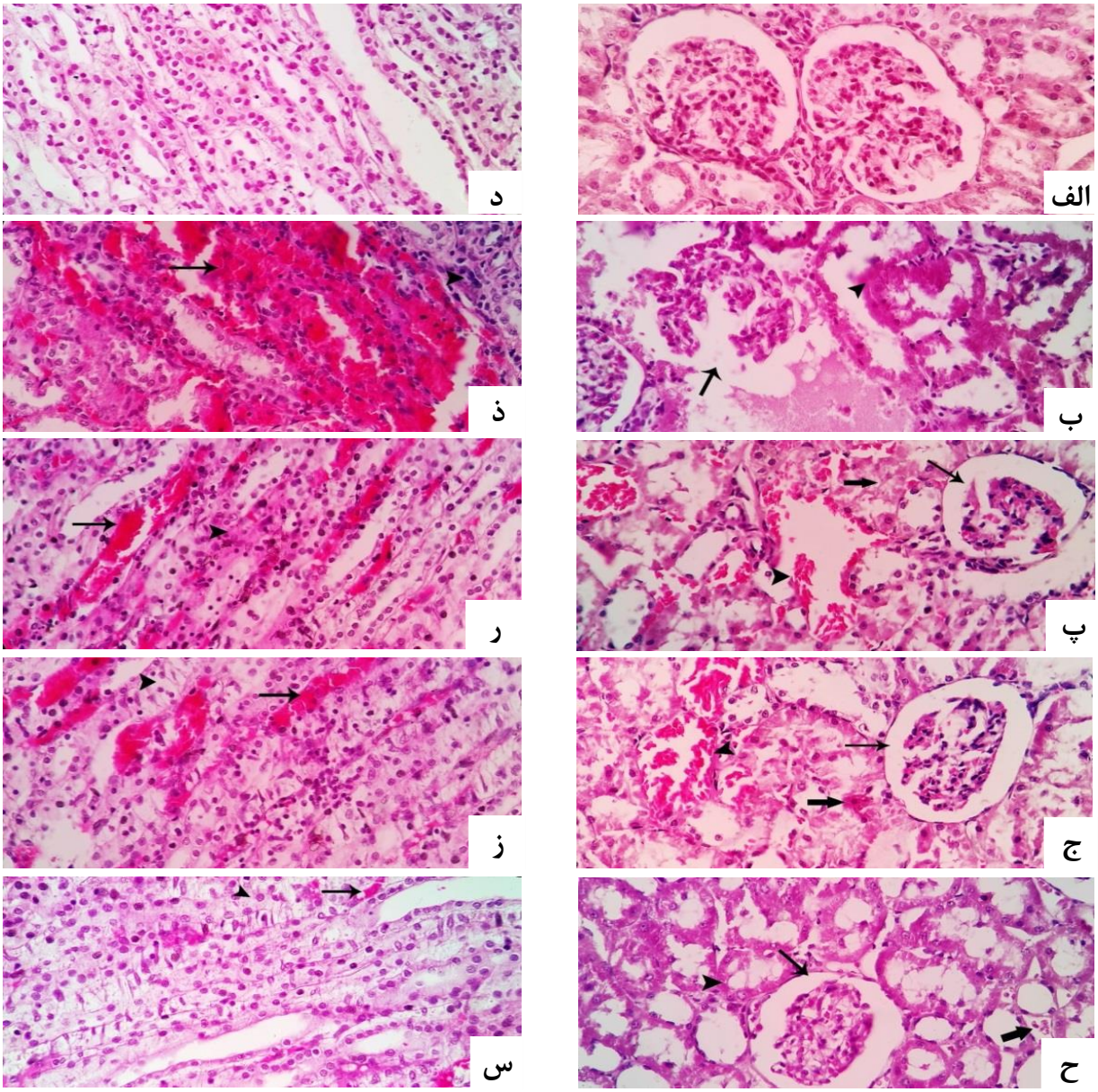
گروه ها	آسیب گلومرولی	تغییرات دژنراتیو سلول‌های توبولی	تغییرات نکروز سلول‌های توبولی	پرخونی و خونریزی	آماس
سالم	-	-	-	-	-
ایسکمی	++++	++++	++++	++++	++++
ایسکمی + تمرین	+++	+++	+++	+++	+++
ایسکمی + مکمل	++	+++/++	+++/++	+++/++	++
ایسکمی + تمرین + مکمل	+	+	+/-	+	+

علامت (-) نشانگر عدم وجود آسیب، علامت (+) نشانگر آسیب پاتولوژیک جزئی، (++) آسیب ملایم، (+++) آسیب متوسط و (++++) آسیب شدید می‌باشد.

Copyright © The Authors Publisher: University of Guilan



شکل ۱: نمودار میانگین +خطای استاندارد تغییرات متغیرها و نتایج آزمون مقایسه های دو دویی گروه های آزمایشی. علامت * نشانگر اختلاف معنی دار گروه ها با گروه سالم و علامت ° نشانگر اختلاف معنی دار گروه ها با گروه ایسکمی در سطح معنی داری ۰/۰۵



شکل ۲: نمای ریزبینی از قسمت قشری (سمت راست) و مدولای (سمت چپ) بافت کلیه یک موش صحرایی از گروه الف و د) سالم، ب و ذ) ایسکمی، پ و ر) ایسکمی+ تمرین ، ج و ز) ایسکمی+ مکمل ، ح و س) ایسکمی+ تمرین + مکمل

Copyright © The Authors Publisher: University of Guilan

اثر فزاینده سه ماه تمرین تناوبی شدید و مکمل ملاتونین بر بیان ژن Caspase3، TNFα و Bcl2 قابل توجه بود. نتایج نشان می دهد که مصرف مکمل ملاتونین به تنهایی باعث کاهش علائم آپوپتوزی و کاهش Bax و Caspase 3 و Bax/Bcl2 در بافت کلیه اختلال به ایسکمی شده و در افزایش بیان ژن Bcl2 و کاهش TNFα موثر بوده است. مکمل ملاتونین با خاصیت آنتی اکسیدانی قوی باعث مهار قابل توجهی در TNFα می شود و همچنین عامل مهم و مفیدی در کاهش فشارهای اکسایشی وابسته به خستگی عضلانی ناشی از فعالیت ورزشی نیز می باشد و می تواند آثار بازدارنده داشته باشد و بدین وسیله آپوپتوز را کاهش می دهد و نقش محافظت کننده سلولی در کلیه را دارد. ملاتونین با توجه به اثرات ضد التهابی خود می تواند ترشح واسطه های ضد التهابی (IL-10) را تحریک کند و در عین حال از سیتوکین های پیش التهابی مانند TNFα ، IL-6 و IL-1 که مسئول آسیب بافت هستند جلوگیری کند. ملاتونین به دلیل توانایی قوی در برابر استرس به عنوان یک آنتی اکسیدان عالی عمل نموده و این ویژگی به ملاتونین توانایی محافظت از ROS در کاهش اکسیداتیو را ارائه می دهد (۱۳،۲۵). تمرین تناوبی شدید و منظم منجر به کاهش معنی دار بیان ژن Bax و افزایش Bcl2 و کاهش مقدار Bax/Bcl2 نسبت به گروه سالم شده است. سطوح بالای Bcl2 نسبت به Bax و پی آمد آن برای سلول بقاء در برابر مرگ است که به نسبت ژن های بیان شده بستگی دارد. Bcl2 به عنوان یکی از پروتئین های موجود در دیواره میتوکندری مهارکننده کاسپاز ۳ می باشد که بواسطه جلوگیری از رها شدن سیتوکروم c مانع از تشکیل آپوپتوزوم و به راه افتادن آبشار کاسپازی می شود. بر اساس یافته های پژوهش اثرات تمرین تناوبی شدید به واسطه افزایش پروتئین ضد آپوپتیک Bcl2 و سرکوب شاخص های التهابی TNFα منجر به بهبود وضعیت ایسکمی کلیه می شود و می تواند به عنوان یک راهکار غیر دارویی برای تعدیل آپوپتوز باشد. این گونه به نظرمی رسد که اگر مدت زمان جلسات تمرینات تناوبی و شدت ان در هفته به تدریج افزایش یابد می توان بر نشانگرهای آپوپتوز تاثیر گذار بود. زیرا با سازگاری های تمرین عوامل اکسیدانی و التهابی و حتی پروفایل های چربی و نهایتا عوامل آپوپتوزی کاهش می یابد و برعکس آن عوامل آنتی اکسیدانی و

https://doi.org/10.22124/jme.2024.26340.343

مسیر های پیش بقای سلولی افزایش می یابد و در مجموع آپوپتوز را کاهش می دهد.

بررسی نتایج بیان ژن Bax، Caspase3، TNFα و Bax/Bcl2 که از مهمترین نشانگرهای آپوپتوز می باشند در این تحقیق نشان داد که ترکیب تمرینات تناوبی شدید و مصرف مکمل اثر مفید بهتری نسبت به استفاده از هریک به تنهایی در مقابل آسیب ایسکمی رپرفیوژن دارد. بنابر این یکی از سازو کارهای احتمالی به منظور کاهش حجم آپوپتوز، تمرین تناوبی شدید و مصرف ملاتونین می باشد. زیرا موجب ارتقای هموستاز سلول و هموستاز کلسیم و کانال های یونی، یکپارچگی غشای میتوکندریایی و نفوذ پذیری آن و رهایش سیتوکروم c، آدرنالین و انتی اکسیدان ها و نهایتا افزایش مقاومت سلول در مقابل آسیب ایسکمی ریپرفیوژن می گردد. و قابلیت اسیب آپوپتوتیکی ان را کاهش دهد در عین حال هنوز بخش های ناشناخته زیادی در سطح سلول وجود دارد. با این حال با توجه به محدودیت های پژوهش حاضر مانند عدم ارزیابی بیان سایر پروتئین های درگیر در مسیر میتوکندریایی آپوپتوز، بررسی بیان پروتئین های درگیر در مسیر خارجی آپوپتوز و اندازه گیری محتوی پروتئین های مورد نظر توسط روش وسترن بلات، اظهار نظر قطعی در مورد رابطه این شاخص ها و نحوه تاثیر پذیری آنها از شرایط مختلف منوط به انجام تحقیقات و مطالعات بیشتر در این زمینه می باشد. در کل یافته های ما بینش جدیدی در مورد مزایای تمرینات تناوبی شدید و مکمل ملاتونین به عنوان یک مداخله گر غیر تهاجمی و کارآمد با حداقل عوارض جانبی در بهبود عملکرد کلیوی بیماران ارائه می دهد. ورزش درمانی و مصرف ملاتونین می تواند یک استراتژی بالینی موثر بر کاهش مشکلات کلیوی و آسیب بعد از آن باشد.

حامی مالی: ندارد.
تعارض منافع: ندارد.

Copyright © The Authors Publisher: University of Guilan

منابع

1. Shen S, Zhou J, Meng S, Wu J, Ma J, Zhu C, et al. The protective effects of ischemic preconditioning on rats with renal ischemia-reperfusion injury and the effects on the expression of Bcl-2 and Bax. Experimental and therapeutic medicine. 2017;14(5):40–77-82.

2. Montazery Taleghani H, Shakeri N, Ebrahim K, Soori R, Gholami M. The effect of 8 weeks resistance exercise on cardaic apoptosis biomarkers in diabetic rats. Metabolism and Exercise. 2019;9(2):149-61.

3.Kourtis A, Adamopoulos PG, Papalois A, Iliopoulos DC, Babis GC, Scorilas A. Quantitative analysis and study of the mRNA expression levels of apoptotic genes BCL2, BAX and BCL2L12 in the articular cartilage of an animal model of osteoarthritis. Annals of translational medicine. 2018;6(12).

4. Ahmadiasl N, Banaei S, Alihemmati A. Combination antioxidant effect of erythropoietin and melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in rats. Iranian journal of basic medical sciences. 2013;16(12):1209.

5. Hadj Ayed Tka K, Mahfoudh Boussaid A, Zaouali MA ,Kammoun R, Bejaoui M, Ghoul Mazgar S, et al. Melatonin modulates endoplasmic reticulum stress and Akt/GSK3-beta signaling pathway in a rat model of renal warm ischemia reperfusion. Analytical Cellular Pathology. 2015;2015(1):1-10.

6. Potić M, Ignjatović I, Ničković VP, Živković JB, Krdžić JD, Mitić JS, et al. Two different melatonin treatment regimens prevent an increase in kidney injury marker-1 induced by carbon tetrachloride in rat kidneys. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. 2019;97(5):422-8.

7. Yang CC, Sung PH, Chiang JY, Chai HT, Chen CH, Chu YC, et al. Combined tacrolimus and melatonin effectively protected kidney against acute ischemia-reperfusion injury. The FASEB Journal. 2021;35(6):e21661.

8. Galano A, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. Journal of pineal research. 2011;51(1):1-16.

9. Mauriz JL, Collado PS, Veneroso C, Reiter RJ, González-Gallego J. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. Journal of pineal research. 2013;54(1):1-14.

10. Balduini W, Carloni S, Perrone S, Bertrando S, Tataranno ML, Negro S, et al. The use of melatonin in hypoxic-ischemic brain damage: an experimental study. The journal of maternal-fetal & neonatal medicine. 2012;25(sup1):119-24.

11. Lochner A, Huisamen B, Nduhirabandi F. Cardioprotective effect of melatonin against ischaemia/reperfusion damage. Frontiers in Bioscience-Elite. 2013;5(1):305-15.

12. Dun R-l, Lan T-y, Tsai J, Mao J-m, Shao Y-q, Hu X-h, et al. Protective effect of melatonin for renal ischemia-reperfusion injury: a systematic review and meta-analysis. Frontiers in Physiology. 2022;12:791036.

13. Abdel-Razek HA, Rizk MS, Amer GS, Kora MA, Afifi AM, Donia SS. Impact of combined ischemic preconditioning and melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in rats. Iranian Journal of Basic Medical Sciences. 2023;26(2):235.

14. El-Saka M, Madi N, Abou Fard G. Effect of moderate and severe swimming exercise on hepatic injury and apoptosis induced by renal ischemia reperfusion in male albino rats. Bulletin of Egyptian Society for Physiological Sciences. 2014;34(2):160-75.

15. Eybl V, Kotyzová D, Černá P, Koutenský J. Effect of melatonin, curcumin, quercetin, and resveratrol on acute ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA)-induced renal oxidative damage in rats. Human & experimental toxicology. 2008;27(4):347-53.

16. Aydın G, Ōzçelik N, Cicek E, Soyöz M. Histopathologic changes in liver and renal tissues induced by Ochratoxin A and melatonin in rats. Human & experimental toxicology. 2003;22(7):383-91.

17. Aouichat S, Navarro-Alarcon M, Alarcón-Guijo P, Salagre D, Ncir M, Zourgui L, Agil A. Melatonin improves endoplasmic reticulum stress-mediated IRE1α pathway in Zücker diabetic fatty rat. Pharmaceuticals. 2021;14(3):232.

18. Ghiasi S, Bashiri J, Pourrazi H, Jadidi RP. The effect of high-intensity interval training and CoQ10 administration on hepatic CEACAM1 and PDGFA proteins in diet-induced obese rats. Sport Sciences for Health. 2023;19(2):581-8.

19. Bhalodia Y, Kanzariya N, Patel R, Patel N, Vaghasiya J, Jivani N, Raval H. Renoprotective activity of benincasa cerifera fruit extract on ischemia/reperfusion-induced renal damage in rat.Iranian Journal of Kidney Diseases. 3(2): 80-85.

20. Goligorsky MS. Whispers and shouts in the pathogenesis of acute renal ischaemia. Nephrology Dialysis Transplantation. 2005;20(2):261-6.

21. Tuğtepe H, Şener G, Bıyıklı NK, Yüksel M, Çetinel Ş, Gedik N, Yeğen BÇ. The protective effect of oxytocin on renal ischemia/reperfusion injury in rats. Regulatory peptides. 2007;140(3):101-8.

22. Ren M, Wang X, Du G, Tian J, Liu Y. Calycosin-7-O-β-D-glucoside attenuates ischemia-reperfusion injury in vivo via activation of the PI3K/Akt pathway. Molecular Medicine Reports. 2016;13(1):633-40.

Copyright © The Authors Publisher: University of Guilan

23. Medicine ACoS, Thompson PD, Franklin BA, Balady GJ, Blair SN, Corrado D, et al. Exercise and acute cardiovascular events: placing the risks into perspective: a scientific statement from the American Heart Association Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism and the Council on Clinical Cardiology. Circulation. 2007;115(17):2358-68.

24. Subramaniam RM, Suarez-Cuervo C, Wilson RF, Turban S, Zhang A, Sherrod C, et al. Effectiveness of prevention strategies for contrast-induced nephropathy: a systematic review and meta-analysis. Annals of internal medicine. 2016;164(6):406-16.

25. Sener G, Sehirli AÖ, Keyer-Uysal M, Arbak S, Ersoy Y, Yeğen BÇ. The protective effect of melatonin on renal ischemia–reperfusion injury in the rat. Journal of pineal research. 2002;32(2):120-6.

JME https://jme.guilan.ac.ir/
https://doi.org/10.22124/jme.2024.26340.343

پور اصغر و همکاران دوفصلنامه سوخت و ساز و فعالیت ورزشی، بهار و تابستان ۱۴۰۳، جلد چهار

Metabolism and Exercise
A biannual journal

Vol 14, Number 1, 2024

University Of Guilan

The effect of high-intensity interval training and melatonin supplementation on gene expression indices in the kidney tissue of male rats after renal ischemia-reperfusion

Fariba Pourasghar[1], Jabbar Bashiri[2]*, Roghayeh Poozesh[3], Hassan Pourrazi[4], Mir Alireza Nourazar[5]

Received: 27/12/2023 Accepted: 29/02/2024 Published: 29/04/2024

Abstract

Introduction: The aim of the present study is to investigate the effect of intense interval exercise training and melatonin supplementation on the apoptotic indices of kidney tissue in rats suffering from renal ischemia reperfusion injury. **Methodology:** 30 male Wistar rats (weight: 250 and 300 grams) were randomly divided into 5 groups, healthy, Ischemia/Reperfusion (I/R), I/R + intense interval training, I/R + melatonin supplement and I/R + high intensive interval training + melatonin supplement. Except for the healthy group, the animals were subjected to ischemia-reperfusion in other test groups. The high intensive interval training protocol was implemented for 12 weeks (5 days per week). Caspase 3, BAX, BCL2 and TNFα gene expression indices were measured by real time PCR method. Because of the non-normal distribution of parameters, the data were analysed by Kruskal–Wallis, Mann–Whitney and Wilcoxon test at the significance level of $p < 0.05$.**Results:** The results show an increase in Bax, Bax/Bcl2, Caspase3 and TNFα and a significant decrease in Bcl2 in I/R group compared to the healthy group. Compared to the IR group, the level of the Bax, Caspase3, TNF and Bax/Bcl2 were significantly decreased ($p<0.05$) and the level of Bcl2 was significantly increased ($p<0.05$) in the high intensive interval training along with melatonin supplementation group. Also, regular use of melatonin supplement after IR led to a significant decrease ($p<0.05$) of TNFα compared to the IR group. **Conclusion**: It seems that the high-intensity interval training and melatonin supplementation are effective in protecting kidney tissue against apoptotic damage and inflammation caused by renal ischemia.

Key words: Intense interval training, melatonin, ischemia reperfusion, apoptosis.

1. PhD Student of Exercise Physiology, Department of Physical Education and Sport Science, Islamic Azad University of Tabriz, Iran. 2. Associate Professor, Department of Physical Education and Sport Science, Islamic Azad University of Tabriz, Iran 3. Assistant Professor, Department of Physical Education and Sport Science, Islamic Azad University of Tabriz Iran. 4. Assistant Professor, Department of Physical Education and Sport Science, Imam Khomeini international University, Qazvin, Iran.5. Assistant Professor, Department of Veterinary Medicine, Tabriz Azad University of Medical Sciences Islamic Azad University of Tabriz, Iran.

*Corresponding author: bashiri.jabbar@iaut.ac.ir

Copyright © The Authors Publisher: University of Guilan