

اثر مکمل سازی مونوهیدرات کراتین بر آپوپتوزیس در فعالیت حاد مقاومتی مردان میانسال

وحید ساری صراف¹، رامین امیر ساسان¹، داریوش شیخ الاسلامی وطنی²، حسن فرجی³

1- دانشیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تبریز، ایران
2- دانشیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه کردستان، ایران
3- نویسنده مسئول: مربی گروه فیزیولوژی ورزشی، دکتری تخصصی فیزیولوژی ورزشی، واحد مربیان، دانشگاه آزاد اسلامی، مریوان، ایران
پست الکترونیکی: h.faraji@iaumarivan.ac.ir

تاریخ پذیرش: 95/5/18

تاریخ دریافت: 95/2/17

چکیده

سابقه و هدف: اثرات مکمل سازی مونوهیدرات کراتین بر آپوپتوزیس ناشی از فعالیت ورزشی مشخص نیست. هدف از این مطالعه بررسی اثر مکمل سازی کراتین بر آپوپتوز در فعالیت حاد مقاومتی مردان بود.

مواد و روش ها: در یک طرح تصادفی، دارونمای کنترل شده با کارآزمایی بالینی، بیست مرد میانسال بین 42 تا 49 ساله به طور تصادفی به دو گروه دریافت کننده کراتین و مالتودکسترین به طور مساوی با مصرف روزانه 20 گرم از هر کدام به مدت یک هفته تقسیم شدند. در روز هشتم، آزمودنی ها یک فعالیت حاد مقاومتی با شدت 80 درصد حداکثر یک تکرار بیشینه را انجام دادند. نمونه های خونی یک روز قبل از شروع دوره و بلافاصله پس از فعالیت حاد ورزشی جهت اندازه گیری غلظت های سرمی p53، کاسپاز 8 و فاکتور رشد شبه انسولینی (IGF-1) جمع آوری شد. داده ها با استفاده از آزمون تی مستقل و وابسته در سطح معنی داری ($p < 0/05$) تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها: سطوح سرمی P53 [(قبل: $486/41 \pm 40/98$ ، بعد: $842/20 \pm 170/86$ نانوگرم بر لیتر، ($p < 0/000$)] و کاسپاز 8 [(قبل: $8/36 \pm 1/26$ ، بعد: $11/66 \pm 4/15$ نانوگرم بر میلی لیتر، ($p = 0/031$)] در گروه دارونما به طور معنی داری بلافاصله پس از فعالیت حاد نسبت به قبل از دوره افزایش یافتند. همچنین، IGF-1 در هر دو گروه به طور معنی داری نسبت به قبل از دوره بالاتر بود. سطح P53 به طور معنی داری بلافاصله پس از فعالیت حاد از گروه کراتین بالاتر بود ($p < 0/05$).

نتیجه گیری: مکمل مونوهیدرات کراتین می تواند از ایجاد آپوپتوز ناشی از فعالیت مقاومتی حاد در مردان میانسال جلوگیری کند. بنابراین یک هفته مکمل سازی کراتین ممکن است استراتژی مفیدی جهت جلوگیری از آپوپتوزیس در فعالیت حاد شدید باشد.

واژگان کلیدی: آپوپتوزیس، مونوهیدرات کراتین، کاسپاز 8، p53، فعالیت ورزشی مقاومتی

• مقدمه

از فرایندهای التهابی و نکروتیک بوده است اما شواهد اخیر اهمیت آپوپتوز در حین و پس از فعالیت حاد ورزشی شدید بر آسیب اغلب بافت ها به ویژه عضلات اسکلتی، قلبی و لنفوسیت ها را نشان می دهد (2، 1). آپوپتوز سلولی به طور کلی از دو مسیر خارجی و داخلی سلول را تحت تأثیر قرار داده و از بین می برد. در مسیر خارجی پیام های مرگ نظیر IL-1 β (Interleukin 1 beta)، TNF- α (Tumor necrosis factor alpha) یا FasL (Fas ligand) به گیرنده های مرگ غشای سلول TNFR1، TNFR2، TNF-related apoptosis-inducing ligand (Fas TRAIL) متصل می شوند و موجب فعال سازی کاسپاز 8

انجام برنامه های تمرینی با کاهش خطر بیماری های قلبی عروقی، متابولیکی، هورمونی، سرطان و... در سنین مختلف همراه است. به هر حال برای تحریک سازگاری منظم در جهت رسیدن به اهداف اختصاصی تمرینی، اجرای وهله های فعالیت حاد ورزشی به صورت اضافه بار تدریجی و نسبتاً شدید ورزشی ضروری است. فعالیت حاد ورزشی می تواند سبب ایجاد واکنش های استرسی و تغییرات ناخواسته قابل ملاحظه پاتولوژیکی شامل واکنش های التهابی و آپوپتوزیسی، نه تنها در عضلات اسکلتی، بلکه در بافت های دیگری نظیر قلب، کلیه، کبد، لنفوسیت ها و روده نیز شود (1). مطالعات قبلی بر این باور بودند که آسیب ایجاد شده از فعالیت ورزشی حاد، ناشی

RNA را ایجاد کند (14) اخیراً از مکمل کراتین به عنوان کمک به درمان برخی بیماری‌های قلبی عروقی و عصبی عضلانی مثل دیستروفی، مک آردل، میاستنی گراویس، اسکروز جانبی آمیوتروفیک و بیماری پارکینسون نیز استفاده می‌شود (15). در خصوص اثر مکمل کراتین بر آپوپتوزیس مطالعات بسیار محدود است در دو مطالعه روی موش‌ها، مکمل کراتین از طریق کاهش کاسپاز-3 سبب کاهش آپوپتوز شد (16، 17) همچنین اخیراً در مطالعه‌ای روی ورزشکاران جوان در فعالیت شدید هوازی روی چرخ کارسنج تا خستگی، کراتین مانع از افزایش p53 بلافاصله بعد از فعالیت شده است (18).

با توجه به اینکه انجام فعالیت ورزشی با شدت بالای متوسط برای اغلب ورزشکاران در راستای رعایت اصل اضافه بار تمرینی و سازگاری‌های فیزیولوژیکی امری اجتناب ناپذیر است، تمرینات اکسنتریک نیز بخش اصلی فعالیت ورزشی مقاومتی و وزنه تمرینی را تشکیل می‌دهد، افزایش دانش در زمینه اثر فعالیت ورزشی حاد شدید بر آپوپتوزیس و نقش مکمل پرمصرفی مثل کراتین بر آن به نظر مهم می‌رسد. بنابراین هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر یک دوه کوتاه بارگیری کراتین بر شاخص‌های آپوپتوز سلولی مردان میانسال بود.

• مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر به صورت تجربی، دوگروهی (مکمل و دارونما) و دوسویه کور بود. جامعه آماری این پژوهش مردان فعال (داشتن فعالیت ورزشی تفریحی) سالم بودند که در دامنه سنی بین 42 تا 49 سال قرار داشتند. به منظور کنترل تفاوت احتمالی اثر جنسیت (19) و سطح آمادگی (20) بر آپوپتوز سلولی، جامعه آماری فقط مردان و افراد فعال را شامل شد. قبل از ارائه پرسشنامه یادآمد 24 ساعته تغذیه‌ای و فرم رضایت نامه شرکت در آزمون به آزمودنی‌ها، اطلاعات و آگاهی‌های لازم درباره چگونگی انجام پژوهش و مراحل آن در اختیار آنها قرار گرفت. سپس به وسیله پرسشنامه سوابق پزشکی - ورزشی و آزمون عملی، آزمودنی‌هایی که سابقه مصرف هرگونه مکمل یا دارویی در یک ماه گذشته داشتند یا دچار بیماری و اختلال خاصی بودند، از پژوهش حذف شدند. در نهایت از بین افراد داوطلب 20 نفر انتخاب و به طور تصادفی به دو گروه مکمل و دارونما تقسیم شدند (جدول 1). پس از جلسات آشناسازی با پروتکل مطالعه طی یک هفته (اغلب آزمودنی‌ها سابقه آشنایی با تمرینات مقاومتی را داشتند)، ترکیب بدنی آزمودنی‌ها اندازه‌گیری شد. درصد

(Cysteine-dependent aspartate-directed protease 8) و در نهایت آپوپتوز سلولی می‌گردند (4، 3). در مسیر داخلی، میتوکندری و رتیکلوم اندوپلاسمیک محوریت فرایند را دارند که تحت تأثیر عوامل استرسی مثل گلوکوکورتیکوئیدها، سیتوکین‌ها، اکسید نیتریک و ROS (Reactive oxygen species)، با فعال کردن کاسپازها، آپوپتوز را القا می‌کنند. فاکتورهای مهمی نیز آپوپتوز را کنترل می‌کنند که یا از ایجاد آن ممانعت کرده (مثل فاکتور رشدی IGF-1 [Insulin-like growth factor-1]) پروتئین Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) و HSP 70 (Heat shock protein 70) [و یا موجب تسریع القا (پروتئین Bax و p53) آن می‌شوند (5)]. پیشنهاد شده است که فعالیت ورزشی حاد می‌تواند از طریق تغییر و تعدیل فاکتورهای مختلف موجب تغییر روند آپوپتوزیس گردد (1). به عنوان مثال افزایش سطوح گلوکوکورتیکوئیدها، سایتوکاین‌ها، فاکتور نکروز توموری (TNF)، اکسید نیتریک و ROS ناشی از ورزش حاد می‌توانند مرگ برنامه‌ریزی شده سلول را القا کند و از طرفی افزایش کنترل نشده سطوح کلسیم داخل سلولی یا تغییرات نفوذپذیری میتوکندری، تحت تأثیر فاکتورهای مهمی مثل Bax و p53، آپوپتوز را ایجاد کنند (6، 7، 2، 1). در خصوص اثر فعالیت ورزشی حاد بر آپوپتوز سلولی، مطالعات انگشت شماری تاکنون انجام شده است که اغلب بیانگر ایجاد آپوپتوز سلولی در فعالیت ورزشی مقاومتی یا هوازی حاد، شدت‌های متوسط به بالا و اعمال انقباضات اکسنتریک هستند. افزایش کنترل نشده آپوپتوزیس ممکن است موجب از دست رفتن بیش از حد سلول شود، عملکرد بافت‌ها را تحت تأثیر قرار داده و روند ریکاوری بافتی را دچار اختلال کند (4). در این میان شناخت عاملی که بتواند آپوپتوزیس را با وجود انجام فعالیت نسبتاً شدید ورزشی تعدیل کند با ارزش است. مکمل کراتین، از پرمصرف‌ترین و کم‌عارضه‌ترین مکمل‌ها، با توجه به پتانسیل‌ها و اثرات فیزیولوژیکی شناخته شده آن می‌تواند کانون توجه را به فرایند فعالیت ورزشی و آپوپتوزیس جلب کند. مطالعات نشان می‌دهند که مکمل کراتین علاوه بر نقش نیروزایی و کاهش خستگی و آسیب عضلانی (8-10)، می‌تواند به عنوان یک آنتی‌اکسیدان در برابر ROS، RNS (Reactive nitrogen species) و رادیکال‌های آزاد مقابله کند (11) و موجب افزایش بیان mRNA فاکتورهای اصلی رشد مثل IGF-1 عضله (12)، حفظ سطوح ATP سلول، جلوگیری از افزایش کنترل نشده کلسیم سلول و سبب جلوگیری از افزایش سایتوکین‌هایی مثل TNF- α در فعالیت بدنی نیمه شدید تا شدید شود (13). همچنین کاهش آسیب به DNA

در فاکتورهای قبل و بعد از دوره بارگیری از آزمون t مستقل و برای مقایسه میانگین هر گروه با خود از t وابسته استفاده شد. از ضریب همبستگی پیرسون برای بررسی رابطه بین متغیرها استفاده گردید. از نرم افزار SPSS (نسخه 22) جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد. نتایج پژوهش در سطح آماری $p < 0/05$ مورد بررسی قرار گرفت.

• یافته‌ها

با توجه به نتایج آزمون تعیین نرمالیتیه انجام شده، داده‌های هر دو گروه دارای توزیع طبیعی بودند. داده‌های دو گروه واریانس‌های همسانی داشتند و اختلاف معنی‌داری بین هیچ یک از متغیرهای دو گروه مکمل و کنترل در اندازه‌گیری‌های پیش آزمون مشاهده نشد ($p > 0/05$). همان‌طور که در شکل شماره 1 نشان داده شده است، اگرچه کاسپاز 8 بلافاصله پس از فعالیت در گروه مکمل ($37 \pm 2/48$) 9 نانوگرم بر میلی‌لیتر، $16/43$ درصد نسبت به سطح استراحتی قبل دوره ($10/91 \pm 3/87$ نانوگرم بر میلی‌لیتر) افزایش یافت، اما این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($p = 0/107$) ولی غلظت کاسپاز 8 در گروه دارونما به طور معنی‌داری ($p = 0/031$) به میزان $39/47$ درصد پس از فعالیت حاد ($11/66 \pm 4/15$ نانوگرم بر میلی‌لیتر) نسبت به قبل از دوره ($8/36 \pm 1/26$ نانوگرم بر میلی‌لیتر) افزایش پیدا کرد. $p53$ در گروه مکمل پس از فعالیت حاد ($543/21 \pm 144/86$) نسبت به قبل از دوره ($516/32 \pm 55/40$) افزایش اندک $5/20$ درصدی داشت ($p = 0/262$) که این افزایش در گروه دارونما بلافاصله بعد از فعالیت حاد ($842/20 \pm 170/86$)، $73/14$ درصد بود و به طور معنی‌داری نسبت به سطوح استراحتی قبل از دوره ($486/41 \pm 40/98$) بالاتر بود ($p = 0/000$). سطوح استراحتی IGF-1 در هر دو گروه مکمل و دارونما به ترتیب $108/60 \pm 30/47$ و $101/28 \pm 28/77$ نانوگرم بر میلی‌لیتر بود که بلافاصله بعد از فعالیت حاد به طور معنی‌داری به ترتیب با مقادیر $125/69 \pm 29/45$ ($p = 0/007$) و $115/14 \pm 23/32$ ($p = 0/022$) بالاتر بود که میزان افزایش آن به ترتیب $15/73$ درصد و $13/68$ درصد بود. سطوح IGF-1 و $p53$ دارای یک رابطه منفی و غیر معنی‌دار قبل از دوره ($r = -0/10$)، ($p = 0/780$) و بلافاصله بعد از فعالیت ($r = -0/19$)، ($p = 0/491$) بود. همبستگی مثبت $p53$ و کاسپاز 8 از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($r = 0/879$)، ($p = 0/009$).

چربی، توده چربی و توده بدون چربی آزمودنی‌ها از طریق اندازه‌گیری ضخامت لایه چربی زیر پوستی هفت نقطه‌ای با استفاده از کالیپر لافایت اندازه‌گیری و با معادلات جکسون و پولاک و سائری محاسبه شد (22، 21). حداکثر قدرت آنها در هر ایستگاه بر اساس آزمون یک تکرار بیشینه فرمول برزیکی (Brzycki) مشخص گردید (23).

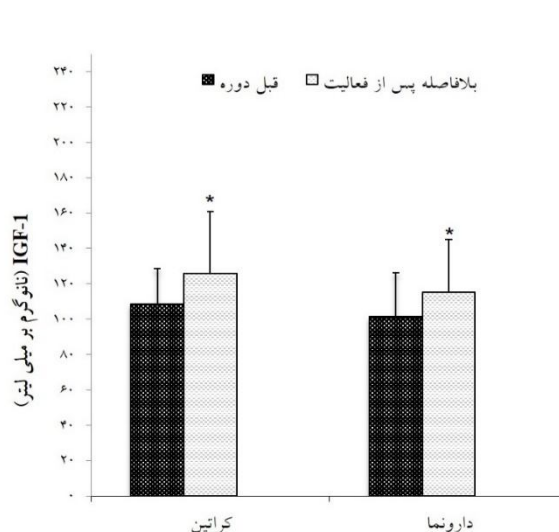
$$\text{وزنه جابه‌جا شده (کیلوگرم)} = \frac{\text{یک تکرار بیشینه}}{1/0278 \times \text{تعداد تکرار خستگی} - 1/0278}$$

سپس آزمودنی‌ها به مدت 7 روز به مصرف مکمل کراتین یا دارونما پرداختند که در این مدت طی سه جلسه به انجام فعالیت مقاومتی، که می‌تواند جذب کراتین را بالا ببرد، پرداختند (24). مکمل منوهیدرات کراتین (Creatin. VITAP Nutrition. Canada) یا دارونما (پودر مالتودکسترین) هر روز 20 گرم در چهار وهله (پس از صبحانه، نهار، شام و قبل از خواب) 5 گرمی به صورت ترکیب با آب پرتقال به آزمودنی‌ها داده شد. فعالیت مقاومتی شامل اجرای 4 ست در 6 ایستگاه (پرس سینه، پرس پا، پشت پا، سرشانه با هالتر، جلو بازو، زیر بغل با دستگاه) با شدت 80 درصد یک تکرار بیشینه تا خستگی (اجرای صحیح تکرار) بود. فاصله بین هر ست 90 ثانیه و بین هر ایستگاه 2 دقیقه بود. آزمودنی‌ها در روز هشتم یک جلسه فعالیت مقاومتی حاد با رعایت تغذیه پیش از دوره و الگوی مشابه غذایی انجام دادند. الگوی غذایی قبل از روز هفتم و هشتم مشابه الگوی غذایی قبل دوره بود. نمونه‌های خونی قبل از شروع دوره مکمل سازی (ساعات اولیه صبح) و بلافاصله پس از اجرای این جلسه فعالیت ورزشی جمع‌آوری شد. پروتکل مطالعه حاضر در مرکز ثبت کار آزمایشی بالینی ایران با کد IRCT2015091112386N2 تأیید و ثبت شده است. اندازه‌گیری سرمی کاسپاز 8 (با حساسیت $0/051$ نانوگرم در میلی‌لیتر) و $p53$ (با حساسیت $5/59$ نانوگرم در لیتر) با روش الایزا و از کیت شرکت Bioassay Technology laboratory (با CV درون سنجی و برون سنجی کمتر از 8 و 10 درصد) انجام شد. کیت IGF-1 نیز از شرکت Mediagnost آلمان (با حساسیت $0/09$ نانوگرم در میلی‌لیتر) با CV درون سنجی و برون سنجی کمتر از $6/8$ و $6/7$ درصد تهیه و با روش الایزا اندازه‌گیری شد.

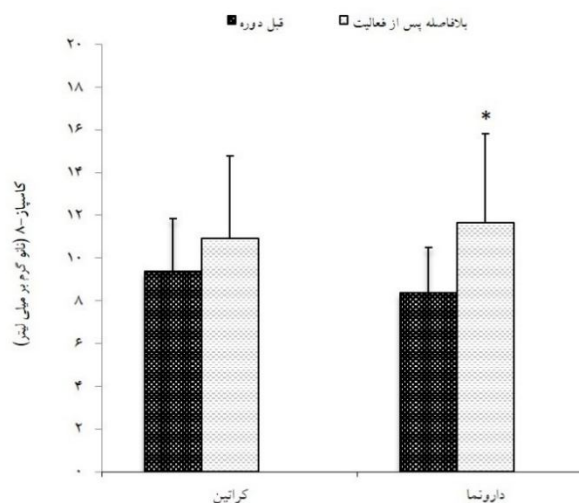
روش‌های آماری: برای بررسی توزیع طبیعی داده‌ها از آزمون شاپیرو-ویلک و از آزمون لون برای بررسی همسانی واریانس‌ها استفاده شد. در آمار استنباطی برای مقایسه متغیرهای دوگروه

جدول 1. ویژگی فیزیولوژیکی آزمودنی‌های مورد مطالعه گروه مکمل و دارونما قبل از شروع دوره‌ها

| سن | وزن | قد | درصد چربی |
|-----------|------------|-------------|------------|
| مکمل | 78/36±6/92 | 172/25±3/15 | 18/67±3/17 |
| دارونما | 76/54±6/38 | 173/86±3/82 | 19/11±3/43 |
| معنی‌داری | 0/275 | 0/139 | 0/147 |

* تفاوت معنی‌دار با سطوح استراحتی ($p > 0/05$)

شکل 3. تغییرات IGF-1 گروه مکمل و دارونما در مراحل پیش و پس از آزمون

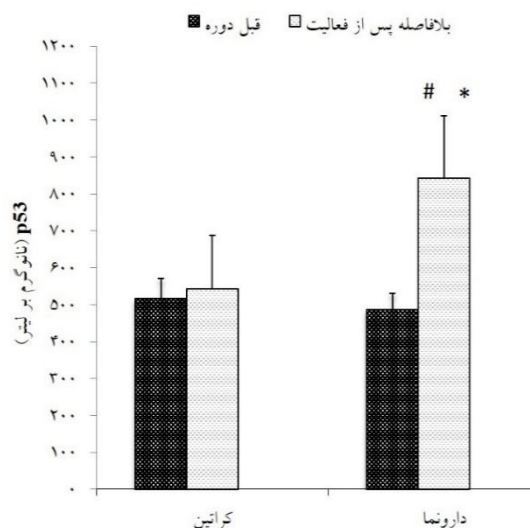
* تفاوت معنی‌دار با سطوح استراحتی ($p < 0/05$)

شکل 1. تغییرات کاسپاز 8 گروه مکمل و دارونما در مراحل پیش و پس از آزمون

• بحث

در مطالعه حاضر اثر یک هفته بارگیری مکمل کراتین بر فاکتورهای سیستمیک آپوپتوزیس در مردان میانسال ناشی از فعالیت حاد مقاومتی بررسی شد که اولاً افزایش دانشی در خصوص اثر فعالیت حاد مقاومتی بر فاکتورهای اندازه‌گیری شده باشد و ثانیاً اثر احتمالی مکمل کراتین بر فاکتورهای مورد نظر سنجیده شود. یکی از نتایج پژوهش حاضر این بود که فعالیت مقاومتی حاد اعمال شده در تحقیق حاضر می‌تواند آپوپتوز را در سلول‌های بدن ایجاد کند که با افزایش سطوح p53 و کاسپاز 8 مشخص گردید.

p53، سرکوب‌کننده تومور، یک حسگر عمومی برای استرس سلول و تشخیص آسیب DNA است (25) و قابل اعتبارترین مارکر سرمی آپوپتوزیس سلولی است (26). p53 در حالت کم و یا فیزیولوژیکی یک عامل محافظتی سلول محسوب می‌شود ولی اگر آسیب از آستانه گذشته باشد، یک فاکتور پیش آپوپتوزی خواهد بود و در آن صورت باعث تغییر و آغاز نسخه برداری فاکتورهای کمک کننده آپوپتوز خواهد شد. همچنین p53 با افزایش پروتئین Bax و رهاسازی

* تفاوت معنی‌دار با سطوح استراحتی ($p < 0/05$)
#: تفاوت معنی‌دار با گروه دارونما

شکل 2. تغییرات p53 گروه مکمل و دارونما در مراحل پیش و پس از آزمون

آپوپتوز می‌گردد. در این رابطه و در مطالعه‌ای روی رت‌های جوان، مکمل کراتین از افزایش کاسپاز 3 ناشی از فعالیت حاد ورزشی جلوگیری کرده است ولی از مکانیسم این ممانعت از افزایش کاسپاز 3 توسط کراتین پیشنهادی ارائه نشده است (16). اگرچه مکانیسم عدم افزایش کاسپاز 8 در گروه مکمل کراتین مشخص نیست، اما با توجه به اثر کراتین در سرکوب $TNF-\alpha$ (33)، احتمالاً از این طریق در افزایش نیافتن کاسپاز 8 نقش داشته است و در نتیجه کراتین مانع از ایجاد آپوپتوز از مسیر خارجی سلول شده است.

IGF-1 سیستمیک و یا موضعی سنتز شده از عضله، مهم‌ترین عامل از میان فاکتورهای رشد سرکوب آپوپتوز سلولی است. IGF-1 می‌تواند از طریق افزایش HSPs (Heat shock proteins) و مسیر PI-3K (Phosphoinositide 3-kinase) و Akt (Akt Murine Thymoma Viral Oncogene) مانع از ایجاد آپوپتوز می‌گردد (7). در مطالعه حاضر IGF-1 با توجه به نقش در تنظیم القای آپوپتوز اندازه‌گیری شد و ارتباط آن با متغیرهای تحقیق سنجیده شد. نتیجه مطالعه حاضر مشابه با برخی مطالعات قبلی (2، 20، 18) نشان داد که فعالیت حاد مقاومتی شدید موجب افزایش معنی‌دار IGF-1 گردشی در افراد می‌شود. سطوح IGF-1 در هر دو گروه مکمل و دارونما به طور تقریباً مشابه و به میزان به ترتیب 15/73 درصد و 13/68 درصد بود. به‌رحال در مطالعه‌ای که روی جوانان ورزشکار انجام شده است، بارگیری یک هفته‌ای کراتین موجب افزایش IGF-1 سرمی بیشتری پس از فعالیت هوازی تا واماندگی نسبت به گروه دارونما شده است (18). دلیل اختلاف مشخص نیست اما تفاوت در فاکتورهایی مثل سن، سطح آمادگی، تغذیه و پروتکل ورزشی ممکن است در این تفاوت نقش داشته باشد. اگرچه ارتباط منفی IGF-1 با p53 در این مطالعه نیز به چشم می‌خورد اما بی‌ارتباط بودن افزایش آن با عدم جلوگیری از ایجاد آپوپتوز در گروه دارونما ممکن است بیانگر این امر باشد که با وجود اثر IGF-1 در رشد عضله، نقش ضد آپوپتوزی IGF-1 بیشتر در سلول‌های عضلات صاف (34)، عضلات قلبی (35) و سایر بافت‌ها گزارش شده است در حالی که غلظت سیستمیک مارکرهای مطالعه ما، با توجه به درگیر بودن توده‌های عضلانی بزرگ و انقباض اکسنتریک در فعالیت مقاومتی، بیشتر بیانگر آپوپتوز عضلات اسکلتی در حین فعالیت حاد است. علاوه بر این، ممکن است شدت بالای فعالیت ورزشی (80 درصد یک تکرار بیشینه) در مطالعه حاضر با اثرگذاری غالب بر مسیرهای داخلی آپوپتوز (1)، اثر تک

سیتوکروم c از میتوکندری و فعال نمودن فاکتور 1 پروتئاز فعال کننده آپوپتوزیس Apaf-1 (Apoptosis protease-activating factor)، موجب القای آپوپتوز از مسیر غیر کاسپازی گردد (26) و با کاهش Bcl-2 آپوپتوز را گسترش می‌دهد (25). افزایش p53 در این مطالعه با نتایج مطالعه‌ای روی مردان جوان که اثر فعالیت مقاومتی (4 ست $6 \times$ حرکت \times با شدت 85 درصد یک تکرار بیشینه و هر ست تا آستانه واماندگی) را بر سطح سرمی p53، کاسپاز 3 و 9 مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان دهنده بالاتر بودن سطح سرمی p53 و کاسپاز 9 پس از فعالیت مقاومتی در افراد بود، همسو است (20). در پژوهشی دیگر نیز نتایج حاکی از افزایش معنی‌دار سطح سرمی p53 بلافاصله و سه ساعت بعد از پروتکل فعالیت مقاومتی حاد در ورزشکاران جوان بود (27، 28). اما نتیجه دیگر مطالعه حاضر این بود که افزایش p53 تنها در گروه دارونما معنی‌دار و در حد 39/47 درصد بود در حالی که در گروه کراتین این افزایش تنها 5/20 درصد بود. این نتیجه با گزارش مطالعه‌ای که اخیراً با اعمال فعالیت هوازی افزایشی تا واماندگی، روی جوانان ورزشکار انجام شده است، همخوانی دارد که در آن پس از یک هفته بارگیری کراتین، افزایشی در p53 سرمی متعاقب فعالیت حاد نسبت به قبل از دوره مشاهده نشده است (18). این عمل بیانگر اثر مفید مونوهیدرات کراتین در تعدیل آپوپتوزیس در شرایط اجرای ورزش شدید است. اگرچه مطالعه حاضر جهت بررسی مکانیسم احتمالی این اثر طراحی نشده بود، اما بنظر می‌رسد با توجه به نقش مستقیم آنتی‌اکسیدانی کراتین (29)، این مکمل کاهش سطوح ROS را به همراه داشته (30) و در کاهش آسیب DNA مؤثر بوده (31) که در نهایت سطح p53 افزایش نیافته است.

در این مطالعه نشان داده شد که ورزش مقاومتی حاد موجب افزایش سطوح سرمی کاسپاز 8 در گروه دارونما شد ولی در گروه کراتین افزایش معنی‌داری مشاهده نگردید. این اولین مطالعه‌ای است که به بررسی سطوح سرمی کاسپاز 8 پس از فعالیت مقاومتی حاد پرداخته است که مضاف بر افزایش p53 (با همبستگی معنی‌دار باهم) بیانگر اثر فعالیت حاد بر ایجاد آپوپتوز سلولی است. به هر حال این نتیجه همسو با مطالعات قبلی است که افزایش سطوح کاسپازهای 3 و 9 را به دنبال فعالیت مقاومتی شدید در مردان ورزشکار گزارش کرده‌اند (20، 28). با توجه به افزایش $TNF-\alpha$ در فعالیت شدید (32)، احتمالاً کاسپاز 8 از طریق افزایش $TNF-\alpha$ (3) و اتصال آن به گیرنده مرگ غشای سلول (TNFR1, TNFR2) افزایش یافته است که در نهایت با فعال‌سازی کاسپاز 3 موجب

تعدیل آپوپتوزیس با وجود انجام فعالیت حاد مقاومتی شدید می‌گردد. بر این اساس پیشنهاد می‌شود ورزشکارانی که انجام فعالیت‌های شدید ورزشی برای آنها اجتناب ناپذیر است، می‌توانند جهت تعدیل آپوپتوز از این خاصیت مکمل کراتین بهره‌مند شوند. به‌هرحال نیاز به اطلاعات بیشتری در خصوص اثر کراتین در شرایط تمرینی و ویژگی‌های آزمودنی‌های دیگر بر فرایندهای کنترل مولکولی آپوپتوز وجود دارد.

مسیری بازدارنده از مسیر خارجی پیام مرگ IGF-1 بر آپوپتوزیس را تعدیل کرده باشد که در مطالعات آینده این موضوع باید بیشتر مورد بررسی قرار گیرد. به‌هرحال ممکن است با سرکوب یا کاهش سطوح آن (مثل دوره سالمندی) آپوپتوز بیشتری در اثر استرس بر سلول ایجاد شود (7). مطالعه حاضر به‌طور کلی نشان داد که فعالیت مقاومتی حاد شدید منجر به افزایش p53 به‌عنوان معتبرترین شاخص آپوپتوزیس و کاسپاز 8 می‌شود ولی بارگیری کراتین موجب

• References

- Phaneuf S, Leeuwenburgh C. Apoptosis and exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2001;33(3):393-6.
- Krüger K, Mooren FC. Exercise-induced leukocyte apoptosis. *Exerc Immunol Rev.* 2014;20:117-34.
- Wang Z-B, Liu Y-Q, Cui Y-F. Pathways to caspase activation. *Cell Biol Int.* 2005;29(7):489-96.
- Cooper D. The balance between life and death: Defining a role for apoptosis in aging. *J Clin Exper Pathol.* 2012;4:2161-0681.
- Söti C, Sreedhar AS, Csermely P. Apoptosis, necrosis and cellular senescence: chaperone occupancy as a potential switch. *Aging Cell.* 2003;2(1):39-45.
- Podhorska-Okołów M, Dzięgiel P, Murawska-Ciałowicz E, Krajewska B, Ciesielska U, Jethon Z, et al. Exercise-induced apoptosis in renal tubular cells of the rat. *Folia Morphol.* 2004;63(2):213-6.
- Kwak H-B. Effects of aging and exercise training on apoptosis in the heart. *J Exerc Rehabil.* 2013;9(2):212-9.
- Cooper R, Naclerio F, Allgrove J, Jimenez A. Creatine supplementation with specific view to exercise/sports performance: an update. *J Int Soc Sports Nutr.* 2012;9(1):33.
- Rahimi R, Faraji H, Sheikholeslami-Vatani D, Qaderi M. Creatine supplementation alters the hormonal response to resistance exercise. *Kinesiology.* 2010;42(1):136-43.
- Faraji H, Arazi H, Vatani DS, Hakimi M. The effects of creatine supplementation on sprint running performance and selected hormonal responses. *S Afr J Res Sport Phys Edu Recr (SAJR SPER).* 2010;32(2).
- Sestili P, Martinelli C, Colombo E, Barbieri E, Potenza L, Sartini S, et al. Creatine as an antioxidant. *Amino Acids.* 2011;40(5):1385-96.
- Deldicque L, Louis M, Theisen D, Nielens H, Dehoux M, Thissen J-P, et al. Increased IGF mRNA in human skeletal muscle after creatine supplementation. *Med Sci Sports Exerc.* 2005;37(5):731-6.
- Deminice R, Jordao AA. Creatine supplementation reduces oxidative stress biomarkers after acute exercise in rats. *Amino Acids.* 2012;43(2):709-15.
- Mirzaei B, Rahmani-Nia F, Salehi Z, Rahimi R. Effects of creatine monohydrate supplementation on oxidative DNA damage and lipid peroxidation induced by acute incremental exercise to exhaustion in wrestlers. *Kinesiology.* 2013;45(1):30-40.
- Wyss M, Schulze A. Health implications of creatine: can oral creatine supplementation protect against neurological and atherosclerotic disease? *Neuroscience.* 2002;112(2):243-60.
- Caretti A, Bianciardi P, Sala G, Terruzzi C, Lucchina F, Samaja M. Supplementation of creatine and ribose prevents apoptosis in ischemic cardiomyocytes. *Cell Physiol Bioch.* 2010;26(6):831.
- Zhu S, Li M, Figueroa BE, Liu A, Stavrovskaya IG, Pasinelli P, et al. Prophylactic creatine administration mediates neuroprotection in cerebral ischemia in mice. *J Neur.* 2004;24(26):5909-12.
- Rahimi R, Mirzaei B, Rahmani-Nia F, Salehi Z. Effects of creatine monohydrate supplementation on exercise-induced apoptosis in athletes: A randomized, double-blind, and placebo-controlled study. *J Res Med Sci.* 2015;20(8):733.
- Mallat Z, Fornes P, Costagliola R, Esposito B, Belmin J, Lecomte D, et al. Age and gender effects on cardiomyocyte apoptosis in the normal human heart. *Biol Sci Med Sci.* 2001;56(11):M719-M23.
- Sharafi H, Rahimi R. The effect of resistance exercise on p53, caspase-9, and caspase-3 in trained and untrained men. *J Strength Cond Res.* 2012;26(4):1142-8.
- Jackson AS, Pollock ML. Practical assessment of body-composition. *Phys Sports Med.* 1985;13:76-82.
- Siri W. Body composition from fluid spaces and density: analysis of methods. 1961. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif).* 1993;9(5):480.
- Brzycki M. Strength testing—predicting a one-rep max from reps-to-fatigue. *J Phys Educ Recreat Dance.* 1993;64(1):88-90.
- Demant T, Rhodes E. Effects of creatine supplementation on exercise performance. *Sports Med.* 1999;28(1):49-60.
- Attardi LD. The role of p53-mediated apoptosis as a crucial anti-tumor response to genomic instability: lessons from mouse models. *Mut Res/Fund Mol Mech Mutagen.* 2005;569(1):145-57.

26. Dincer Y, Himmetoglu S, Bozcali E, Vural VA, Akcay T. Circulating p53 and cytochrome c levels in acute myocardial infarction patients. *J Thromb Thrombolysis*. 2010;29(1):41-5.
27. Boroujerdi S, Rahimi R. The apoptotic response to resistance exercise with different intensities in athletes. *Med del Sport*. 2011;64(1):31-44.
28. Faraji H, Rahimi R., Sheikholeslami, V.D., Jafaari, A. Apoptosis response to different rest periods after resistance exercise in athletes. *Med del Sport*. 2016;69(2):173-83.
29. Lawler JM, Barnes WS, Wu G, Song W, Demaree S. Direct antioxidant properties of creatine. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;290(1):47-52.
30. Rahimi R. Creatine supplementation decreases oxidative DNA damage and lipid peroxidation induced by a single bout of resistance exercise. *J Strength Cond Res*. 2011; 25(12):3448-55.
31. Schwartz JL, Antoniades DZ, Zhao S. Molecular and biochemical reprogramming of oncogenesis through the activity of prooxidants and antioxidants. *An New York Aca Sci*. 1993;686(1):262-78.
32. Moldoveanu AI, Shephard RJ, Shek PN. Exercise elevates plasma levels but not gene expression of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in blood mononuclear cells. *J Appl Physiol*. 2000;89(4):1499-504.
33. Deminice R, Rosa FT, Franco GS, Jordao AA, de Freitas EC. Effects of creatine supplementation on oxidative stress and inflammatory markers after repeated-sprint exercise in humans. *Nutrition*. 2013;29(9):1127-32.
34. Okura Y, Brink M, Zahid AA, Anwar A, Delafontaine P. Decreased expression of insulin-like growth factor-1 and apoptosis of vascular smooth muscle cells in human atherosclerotic plaque. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33(10):1777-89.
35. Castellano G, Affuso F, Di Conza P, Fazio S. The GH/IGF-1 axis and heart failure. *Cur Cardiol Rev*. 2015; 203:(3) 5-9

The Effect of Creatine Monohydrate Supplementation on Apoptosis at Acute Resistance Exercise in Middle-aged Men

Sari-Sarrafi¹, Amirsasan R¹, Sheikholeslami-Vatani D², Faraji H^{3*}

1-Associated Prof, Dept. of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

2-Associated Prof, Dept. of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Science, University of Kurdistan, Kurdistan, Iran

3- *Corresponding author: PhD in Exercise Physiology, Dept. of Physical Education and Sports Science, Marivan Branch, Islamic Azad University, Marivan, Iran. E-mail: h.faraji@iaumarivan.ac.ir

Received 6 May, 2016

Accepted 8 Aug, 2016

Background and Objectives: The effect of creatine monohydrate loading on exercise-induced apoptosis is unclear. The purpose of this study was to examine the effect of creatine supplementation on apoptosis at acute resistance exercise in men.

Materials and Methods: In a randomized, placebo controlled, clinical trial study, twenty 42-49 middle-aged year men were randomly assigned to supplement with 20 g per day of creatine monohydrate or placebo (maltodextrin) similarly for one week. On the 8th day, the subjects performed an acute resistance exercise with 80% of one repetition maximum. Blood samples were collected a day before supplementation loading (Pre) and immediately post-acute exercise (Post) for the measurement of serum p53, caspase 8 and Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) concentrations. Data were analyzed by Student's paired and unpaired *t* tests at the significant level of $P < 0.05$.

Results: P53 serum [Pre: 486.41 ± 40.98 , Post: 842.20 ± 170.86 ng/L ($p = .000$)] and caspase 8 [Pre: 8.36 ± 1.26 , Post: 11.66 ± 4.15 ng/ml ($p = .031$)] levels were significantly increased in the placebo group immediately post-acute exercise. Also IGF-1 was significantly increased in both groups. The p53 level was significantly higher in the placebo group as compared to the creatine group immediately post-acute exercise ($P < 0.05$).

Conclusion: The results indicated that creatine monohydrate loading can inhibit acute resistance-induced apoptosis in middle-aged. Thus, one week creatine supplementation may be a useful strategy for preventing apoptosis by extensive acute exercise.

Keywords: Apoptosis, Creatine monohydrate, Caspase 8, p53, Resistance exercise