Research Paper

The effect of HIIT and CGRP inhibition on EGF and EGFR gene expression in the hippocampal tissue of male Wistar rats

Asma Jafari Khooshan Abadi[1], Sajjad Ramezani[2*], Shila Nayebifar[1]

1. Faculty of Psychology and Educational Sciences, Department of Sports Sciences, University of Sistan and Baluchistan, Zahedan, Iran
2. Faculty of Educational Sciences and Psychology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

*** Corresponding author e-mail: sajjad_ramezanii@yahoo.com**

Citation: Jafari Khooshan Abadi A, Ramezani S, Nayebifar Sh. The effect of HIIT and CGRP inhibition on EGF and EGFR gene expression in the hippocampal tissue of male Wistar rats. Daneshvar Medicine 2022; 30(6):10-19.
doi: 10.22070/DANESHMED.2023.17102.1298

Abstract

Background and Objective: Growth factors are small peptide biomolecules that play an important role in increasing autoimmune diseases and are involved in the pathogenesis of many types of cancer. The main purpose of this study is to investigate the effect of 6 weeks of HIIT with inhibition of CGRP on EGF and EGFR gene expression in the hippocampal tissue of male Wistar rats.

Materials and Methods: In this experimental study, 32 Wistar male laboratory rats with an average weight of 205±15 grams and an age of 8 weeks were randomly divided into 4 groups of 8 series including 1-control (C), 2-inhibition of CGRP (CI), 3-HIIT (TH).) and 4-inhibition of CGRP+HIIT (CI+TH) were divided. In order to inhibit CGRP in groups 2 and 4, CGRP antibody was used intraperitoneally at a dose of 0.25 mg/kg. The HIIT training protocol was performed for 6 weeks and 5 days per week, which consisted of 10 bouts of intense 2-minute running. on the treadmill and 1 minute of slow running (active rest) was incremental. Finally, the desired tissue was extracted and the expression level of EGF and EGFR genes was evaluated by Real time-PCR $\Delta\Delta$ method and using $2^{\Delta\Delta Ct}$ formula. To analyze the findings, one-way analysis of variance was used along with Tukey's post hoc test in SPSS software version 26 ($p \leq 0.05$).

Results: The results of the present study showed that the levels of EGF in hippocampal tissue in group (TH) were significantly higher than groups (CI) (P=0.001) and (C) (P=0.006). It was also significantly higher in the (CI+TH) group than the (CI) group (P=0.007). EGFR gene expression levels in (CI+TH) group were significantly higher than (CI) (P=0.04) and (TH) (P=0.01).

Conclusion: Physiological changes caused by HIIT in the hippocampus can improve the functional state of the brain through positive regulation of EGF and EGFR gene expression as an effective non-pharmacological method. Furthermore, HIIT+CGRP inhibition may represent a novel approach through the EGF and EGFR pathways in the hippocampus.

Keywords: High-Intensity Interval Trainings (HIIT), Epidermal Growth Factor (EGF), Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP), Hippocampus

Received: 20 Nov 2022
Last revised: 14 Feb 2023
Accepted: 01 Mar 2023

مقاله پژوهشی

اثر تمرین تناوبی شدید (HIIT) همراه با مهار پپتید وابسته به کلسی تونین (CGRP) بر بیان ژن فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) و گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی (EGFR) در بافت هیپوکمپ موش‌های نر نژاد ویستار

نویسندگان: اسماء جعفری خوشن آبادی[1]، سجاد رمضانی[2*]، شیلا نایبی فر[1]

۱. دانشکده روان شناسی و علوم تربیتی،گروه علوم ورزشی،دانشگاه سیستان و بلوچستان،زاهدان ،ایران

۲. دانشکده علوم تربیتی و روانشناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

*نویسنده مسئول: سجاد رمضانی **Email: sajjad_ramezanii@yahoo.com**

چکیده

مقدمه و هدف: فاکتورهای رشد، بیوملکول های پپتیدی کوچکی اند که نقش مهمی در افزایش بیماری های خود ایمنی دارند ودر پاتوژنز بسیاری از انواع سرطان ها دخیل هستند. هدف اصلی این مطالعه بررسی تأثیر ٦ هفته تمرین تناوبی با شدت بالا (HIIT) همراه با مهار پپتید مرتبط با ژن کلسی‌تونین (CGRP) بر بیان ژن فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) و گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی (EGFR) در بافت هیپوکمپ موش های نر نژاد ویستار بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی ۳۲ سر موش بزرگ آزمایشگاهی نر نژاد ویستار با میانگین وزن ۱۵±۲۰۵ گرم و سن ۸ هفته طور تصادفی در ٤ گروه ۸ سری شامل: ۱) کنترل (C)، ۲) مهار CGRP(CI)، ۳) HIIT(TH) و ٤) مهار HIIT+CGRP(CI+TH) تقسیم شدند. جهت مهار CGRP در گروه ۲ و ٤ از آنتی بادی CGRP با دوز ۰/۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت درون صفاقی استفاده شد. پروتکل تمرین HIIT به مدت ٦ هفته و ٥ روز در هر هفته انجام شد، که به صورت ۱۰ وهله دویدن شدید ۲ دقیقه‌ای روی تردمیل و ۱ دقیقه دویدن آهسته (استراحت فعال) به صورت فزاینده بود. در نهایت بافت مورد نظر استخراج و میزان بیان ژن EGF و EGFR به وسیله روش Real time–PCR ΔΔ و با استفاده از فرمول $2^{\Delta\Delta Ct}$، مورد ارزیابی قرار گرفت جهت تجزیه و تحلیل یافته‌ها از آزمون آنالیز واریانس یکراهه به همراه آزمون تعقیبی توکی در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲٦ استفاده شد ($p\leq ۰/۰۵$).

نتایج: پژوهش حاضر نشان داد سطوح EGF بافت هیپوکمپ در گروه (TH) به طور معناداری بالاتر از گروه های (CI) (P=۰/۰۰۱) و گروه (C) (P=۰/۰۰٦) بود. همچنین در گروه (CI+TH) به طور معناداری بالاتر از گروه (CI) (P=۰/۰۰۷) بود. سطوح بیان ژنی EGFR در گروه (CI+TH) به طور معناداری بالاتر از (CI) (P=۰/۰٤) و (TH) (P=۰/۰۱) بود.

نتیجه‌گیری: تغییرات فیزیولوژیکی ناشی از **HIIT** در هیپوکمپ می تواند وضعیت عملکردی مغز را از طریق تنظیم مثبت بیان ژن **EGF** و **EGFR** به عنوان یک روش غیردارویی موثر بهبود بخشد. علاوه بر این، مهار **HIIT + CGRP** ممکن است یک رویکرد جدید را از طریق مسیرهای **EGF** و **EGFR** در هیپوکمپ نشان دهد.

واژه های کلیدی: تمرین تناوبی شدید (**HIIT**)، فاکتور رشداپیدرمی (**EGF**)، پپتیدوابسته به کلسی تونین (**CGRP**)، هیپوکمپ

دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۲۹
آخرین اصلاح‌ها: ۱۴۰۱/۱۱/۲۵
پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۱۰

مقدمه

فاکتورهای رشد، بیوملکول‌های پپتیدی کوچکی هستند که در تنظیم رشد، مهاجرت، تکثیر سلولی، تولید ماتریکس خارج سلولی و فعالیت آنزیمی و تولید عوامل رشدی مشارکت می‌کنند و اعتقاد بر این است که این فاکتورها روند بهبود را تا اندازه زیادی تنظیم می‌کنند (۱). فاکتور رشد اپیدرمی (*EGF*)[1] یکی از فاکتورهای رشدی است که نقش مهمی در تکثیر سلولی، تمایز و تومورزایی بافت‌های اپیتلیال دارد (۲). *EGF* یک پروتئین ۶۰۰۰ دالتونی است که در پلاکت، غدد عروق و غدد دوازدهه یافت می‌شود و باعث می‌گردد سلول‌های مزانشیال و اپی‌تلیال از حالت استراحت به حالت آماده برای تکثیر و تقسیم *DNA* درآیند و در نتیجه بازسازی اپیدرم را پس از آسیب تحریک کنند. همچنین باعث تحریک تقسیم و مهاجرت سلول‌های اپیدرمال و استرومال و تحریک آنژیوژنز می‌شود، ونیز یک میتوژن قوی برای سلول‌های سازنده روپوست[2] است (۳). مطالعات نشان داده‌اند بیان بیش از حد *EGF* همانند فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (*VEGF*) باعث افزایش فعالیت بیماری‌های خود ایمنی و تسهیل تومورزایی در بافت می‌شود (٤). از طرفی نشان داده شده است بیان بیش از حد *EGF* باعث افزایش گیرنده‌های فاکتور رشد اپیدرمی (*EGFR*)[3] می‌شود که در فعال شدن رشد تومور و پیشرفت بیماری سرطان موثر است (۵). *EGFR* نقش مهمی در بیولوژی تکامل، هموستاز بافتی، بقا، انتقال سیگنال، نفوذپذیری غشاء سلولی، کنترل تکثیر، مهاجرت و تمایز سلولی و بیولوژی سرطان دارد(٦). فعال شدن *EGFR* در مسیر *PI3K/Akt* باعث مقاومت سلول در برابر آپوپتوز می گردد (٦). *EGFR* در بسیاری از تومورها از جمله سینه، پروستات، تخمدان و سروگردن، فعالیتی بیش از حد بروز می‌دهد و در پاتوژنز بسیاری از انواع سرطان‌ها دخیل شناخته شده است. بیان بیش از حد ژن‌های مرتبط با *EGFR*، باعث حساسیت بیش از حد سلول‌ها به سطح طبیعی فاکتور رشد می‌گردد. در نتیجه جهش ، بیان بیش از حد *EGFR* با پیشرفت انواع سرطان مرتبط نشان داده شده است. حدود ۳۰ درصد تومورهای توپر* تغییرات ژنتیکی حاصل از عملکرد *EGFR* را نشان می دهند که این به معنای این است که سلول ها برای بقاء رشد به سیگنالینگ *EGFR* وابسته هستند (۷).

پپتید وابسته به کلسی تونین (*CGRP*)[4] نوروپپتیدی ۳۷ اسید آمینه‌ای است که در بدن انسان و حیوان به دوشکل (α و β) وجود دارد. *CGRPα* غالبا در دستگاه عصبی مرکزی و محیطی وجود دارد، در حالی که *CGRPβ* به طور عمده در دستگاه عصبی روده‌ای بیان می‌شود (۸). *CGRP* در بدن انسان و حیوان اعمال زیست شناختی بسیاری را انجام می‌دهد. *CGRP* گشادکننده بسیار قوی عروق پیرامونی است و در نتیجه، دارای توانایی حفاظتی است که برای برخی شرایط فیزیولوژیک و بیماری شناختی دستگاه قلب و عروقی و بهبود زخم مهم است (۹). همچنین این پپتید نقش مهمی در اتساع عروق خون مغزی دارد که نقش حفاظتی مهم آن را در سلول های عصبی متذکر می‌شود (۱۰). علاوه بر نقش‌های ذکر شده، *CGRP* در مسیرهای متابولیکی نظیر تنظیم متابولیسم گلوکز و چربی نقش دارد (۱۱)، برای مثال، سنتز گلیگوژن ناشی از انسولین را در عضله اسکلتی کاهش می‌دهد و در متابولیسم کربوهیدرات عضله اسکلتی نقش مهمی دارد (۱۱). افزون بر این، رهایش این پپتید در مدت هیپوگلیسیمی، سازوکار مهمی برای تسریع بازگشت گلوکز خون به سطح طبیعی است (۱۱). به نظر می رسد نوروپپتیدهایی مانند پپتید مرتبط با ژن کلسی تونین و گیرنده آن در هیپوکمپ (سلول‌های هرمی *CA3*) و سلول های گرانول شکنج دندانه‌دار (۱۲) پراکنده شده‌اند که در رشد طبیعی مغز نقش دارند (۱۳). از طرفی *CGRP* یک نوروپپتید تنظیمی است که سیگنالینگ ضد آپوپتوزی را در مغز، به ویژه در هیپوکمپ افزایش می دهد، از اندوتلیوم محافظت می‌کند و نوروژنز و رگ زایی را ترویج می‌کند (۱٤،۱۵). مطالعات نشان داده‌اند آزاد سازی *CGRP* متعاقب افزایس *NO* اندوتلیال است که منجر به اتساع عروق و افزایش جریان خون می شود (۱٦). از طرفی *EGF* از طریق مکانیسم

* تومور های توپر توده های غیر نرمال از بافت می باشد که معمولا شامل کیست یا مایع نمی باشد.

[1] Epidermal Growth Factor
[2] Keratinocyte
[3] Epidermal Growth Factor Receptor
[4] Calcitonin Gene-Related Peptide

وابسته به *NO* پرخونی را دربافت‌های مختلف القا می‌کند (۱۶). با این حال مکانیسم دقیق تحریک *EGF* در بافت هیپوکمپ توسط *CGRP* نامشخص است. این در حالی است که، مطالعات نشان داده‌اند اثر *CGRP* بر اندوتلیوم شامل سیگنال دهی رشد است، که در آن مهار *CGRP* می‌تواند التهاب را افزایش داده و بیان *VEGF* را کاهش دهد (۱۵،۱۷).

عدم تحرک برای مدت طولانی یک عامل خطر مهم برای عملکرد مغز از جمله هیپوکمپ است. از طرفی فعالیت بدنی باعث بهبود عملکرد مغز شده و ارتباط مغز و شبکه هیپوکمپ، قشر مغزی را تقویت می‌کند. از این رو میزان تغییر شبکه هیپوکمپ در الگوهای عملکردی بسیار مهم است زیرا ورزش بیشترین تاثیر را برساختار هیپوکمپ دارد. تمرینات ورزشی باعث تقویت سیستم عصبی مرکزی و بهبود آمادگی جسمانی می‌شود (۱۸). این درحالی است که تمرین تناوبی شدید (*HIIT*)[1] به عنوان یک رویکرد کارآمد برای بهبود سلامت جسمی و شناختی، توجه زیادی را کسب نموده است(۱۹). از طرفی مطالعات متعددی بر تاثیر تمرینات *HIIT* بر عضلات اسکلتی و بافت‌های مختلف در بیماری‌ها و شرایط سلامتی انجام شده است. با این حال، مطالعات انجام شده، به خوبی تاثیر تمرینات *HIIT* را بر سازگاری بافت مغز و میزان تاثیر این تمرینات بر سطوح *EGF* و*EGFR* به عنوان عوامل دخیل در فرآیند رگزایی در مناطق مختلف مغز بررسی نکرده است. بنابراین با توجه به در دسترس نبودن مطالعات در این زمینه و با توجه به مطالب ارائه شده، مطالعه حاضر باهدف بررسی تاثیر تمرینات *HIIT* همره با مهار *CGRP* بر تغییرات بیان ژن *EGF* و*EGFR* در بافت هیپوکمپ موش های نر نژاد ویستار انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی ۳۲ سر موش بزرگ آزمایشگاهی نر از نژاد ویستار با میانگین وزن ۱۵±۲۰۵ گرم و سن ۸ هفته از مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کرمان خریداری و به آزمایشگاه تخصصی فیزیولوژی ورزشی این واحد دانشگاهی منتقل شدند. پژوهش حاضر مطابق دستورالعمل های موسسه ملی بهداشت (NIH) انجام و با کد اخلاق (IR.USB.REC.1400.029) توسط کمیته اخلاق دانشگاه سیستان وبلوچستان تایید و انجام شد. تمامی موش‌های بزرگ آزمایشگاهی در قفس‌های تمیز و استریل شده شفاف تحت شرایط استاندارد با چرخه تاریکی و روشنایی ۱۲ ساعته و دمای ۲۲-۱۹ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.حیوانات با رژیم غذایی استاندارد آزمایشگاهی جوندگان (شرکت جوانه خراسان) و آب لوله کشی به صورت دسترسی نامحدود تغذیه شدند. پس از طی دوره یک هفته‌ای سازگاری با محیط آزمایشگاه، موش‌های بزرگ آزمایشگاهی به طور تصادفی به ٤ گروه ۸ سری شامل: ۱) کنترل(C)، ۲) مهار CGRP(CI)، ۳) HIIT(TH) و ٤) مهار HIIT+CGRP(CI+TH) تقسیم شدند. جهت مهار CGRP از آنتی بادی CGRP شرکت (BIBN4096BS-Merck Company Germany) با دوز ۰/۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت درون صفاقی استفاده شد (۲۰). جهت مهار CGRP در گروه (CI+H) ۳ ساعت قبل از اجرای پروتکل تمرینی، تزریق آنتی‌بادی انجام شد. ٤۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی موش‌های بزرگ آزمایشگاهی به وسیله کتامین با دوز ۹۰mg/kg و زایلازین با دوز ۱۰mg/kg به صورت داخل صفاقی و با سرنگ انسولین تزریق و بیهوش شدند و بافت هیپوکمپ موش‌های بزرگ آزمایشگاهی توسط متخصصین آزمایشگاه جداسازی و در ادامه جهت بررسی بیشتر بلافاصله در ازت مایع فریز شده و در دمای ۸۰- سانتی گراد نگهداری شد.

اندازه گیری مقادیر بیان ژن و سنتز cDNA

جهت بررسی‌های مولکولی در سطح بیان ژن، ابتدا استخراج RNA از بافت هیپوکمپ طبق پروتکل شرکت سازنده (Biobasic 50 prebs، بایوبیسیک کانادا)، انجام گرفت. برای سنتز cDNA ابتدا بافت‌ها به قطعات کوچک تقسیم شدند و با استفاده از روش Mortar and pestle (هاون کوبی) در نیتروژن مایع پودر شدند. سپس ۱۰-۱۲ میلی‌گرم از بافت پودری به ۰/۳ میلی لیتر بافرRLT اضافه شد. پس از آن مخلوط به طور کامل با ۰/۵۹ میلی لیتر آب بدون Rnase مخلوط شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانیگراد توسط دستگاهDry Bath انکوبه شد.

[1] High-Intensity Interval Training

سپس مخلوط حاصل به مدت ۳ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتیگراد با دور ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. پس از آن، مایع رویی به یک لوله عاری از RNase (۱/۵ میلی لیتر) منتقل شد و با نسبت ۱ به ۰/۵ میلی لیتر با اتانول مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق رها و سپس به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق با دور ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد و پس از خارج نمودن محلول رویی به رسوب RNA به میزان ۳۵۰ لاندا محلول DW رقیق شده اتانول اضافه شد و مجددا به مدت ۱ دقیقه در دمای اتاق با دور ۱۲۰۰۰ سانتریفیوز شد. پس از آن از RNA استخراج شده برای شروع مرحله سنتز cDNA استفاده شد. cDNA بر اساس خلوص RNA استخراج شده و پروتکل سنتز cDNA شرکت پارس طوس استفاده شد. cDNA سنتز شده جهت انجام واکنش رونویسی معکوس مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا پرایمرهای طراحی شده، مربوط به ژن ها مورد بررسی قرار گرفت، و سپس بررسی بیان ژن ها با استفاده از روش کمی q-RT PCR انجام پذیرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه در (جدول ۱) ارائه شده است. همچنین جهت بررسی بیان ژن های EGF، EGFR برای گروه های سلولی از مخلوط، RealQ 2x Master mix Green Dye و دستگاه Applied Biosystem Real-Time PCR (شرکت Amplicon) طبق دستورالعمل کیت استفاده شد. برنامه دستگاه Real-time PCR به صورت ۲ مرحله‌ای تنظیم گردید. پس از اتمام فعالیت دستگاه و مشاهده نمودارها مبنی بر افزایش تعداد قطعه مورد نظر و میزان نشر فلورسانس با محاسبه $\Delta\Delta C_t$ میزان تغییر در بیان ژن مورد نظر نسبت به genes Housekeeping (۱۸S) و گروه کنترل سنجیده شد و سپس با استفاده از فرمول $۲^{-\Delta\Delta Ct}$ میزان بیان آن محاسبه گردید(۲۱).

$$C_t = C_{t\ interets} - C_{t\ B2m}\ \Delta$$
$$\Delta\Delta C_t = \Delta\ C_{t\ Treat} - \Delta\ C_{t\ Un\ Treat}$$

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد مطالعه

Genes	Primer Sequences	Sizes (bp)	PubMed Accession
18S	Forward: 5'- GCAATTATTCCCCATGAACG -3' Reverse: 5'-GGCCTCACTAAACCATCCAA -3'	187	7MQ9_L1
EGF	Forward: 5'- GTGGCGTGTGCATGTATGTT-3' Reverse: 5'- CTCACGTTGCTGCTTGACTC -3'	689	BV166195.1
EGFR	Forward: 5'- CTGCCAAGGCACAAGTAACA -3' Reverse: 5'- ATTGGGACAGCTTGGATCAC -3'	808	BV209209.1

پروتکل تمرین تناوبی شدیدHIIT

پس از آشنایی دو هفته ای رت‌ها با تردمیل و نحوه انجام فعالیت ورزشی، برنامه تمرینی اصلی که شامل دویدن به مدت٦ هفته و هرهفته به مدت ۵ روز با تناوب‌های دو دقیقه‌ای برای زمان فعالیت شدید و تناوب ۱ دقیقه‌ای برای زمان استراحت فعال بود اجرا شد. مرحله گرم کردن و سرد کردن در ابتدا و انتهای مرحله اصلی تمرین با شدت ۳۰ درصد سرعت بیشینه (۵ متر در دقیقه) به مدت ۵ دقیقه روی نوارگردان انجام شد. تمرین اصلی شامل، انجام ۱۰ نوبت دویدن شدید با تناوب ۲ دقیقه‌ای با سرعت ۱۰ متر در دقیقه با شیب ۵ درصد و ۱۰ نوبت دویدن آهسته (استراحت فعال) با تناوب ۱ دقیقه‌ای با سرعت ۵ متر در دقیقه و شیب ٤ درصد در هفته اول و ۱۰ نوبت دویدن شدید با تناوب ۲ دقیقه‌ای با سرعت ۲۲ متر در دقیقه با شیب ۲۹ درصد و ۱۰ نوبت دویدن آهسته (استراحت فعال) با تناوب ۱ دقیقه‌ای با سرعت ۱۰ متر در دقیقه و شیب ۱۵ درصد در هفته ششم طبق جدول ۲ انجام شد. شدت تمرینات ورزشی با اندازه گیری سطح لاکتات خون

مستقیماً بعد از ورزش با دستگاه آنالوکس لاکتومتر (Lactate Scout Company/ Code:37، آلمان آنالیس، نامور، بلژیک) ارزیابی شد و سطوح بالاتر از ٦ میلی‌مول بر لیتر به عنوان شدت زیاد در نظر گرفته شد (۲۲). در طول آزمایش، گروه کنترل و گروه مهار CGRP هیچ گونه فعالیت ورزشی نداشتند و فقط برای القا استرس دستگاه تردمیل هر جلسه روی نوار نقاله ثابت نگه داشته شدند. برای تشویق موش‌های بزرگ آزمایشگاهی به ادامه دویدن روی تردمیل از یک ضربه آرام روی دم با برس نرم استفاده شد.

جدول ۲. پروتکل تمرین HIIT

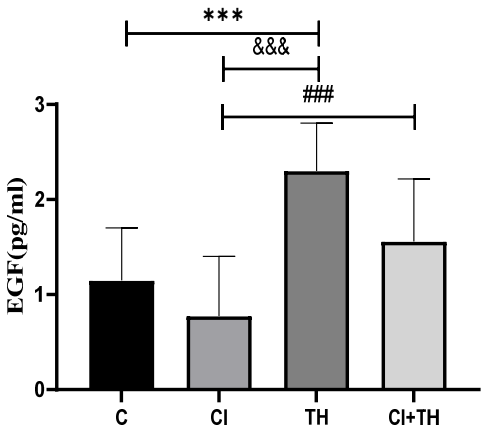
	تناوب شدید		تناوب آهسته(استراحت فعال)	
هفته های تمرین	تعداد نوبت(۲ دقیقه ای)	سرعت (متر/دقیقه)	تعداد نوبت(۱دقیقه ای)	سرعت(متر/دقیقه)
اول	۱۰	۱۰(شیب ۵)	۱۰	۵(شیب٤)
دوم	۱۰	۱۲(شیب۱۰)	۱۰	٦(شیب٦)
سوم	۱۰	۱۵(شیب۱۵)	۱۰	۷(شیب۸)
چهارم	۱۰	۱۷(شیب۲۰)	۱۰	۸(شیب۱۰)
پنجم	۱۰	۱۹(شیب۲۵)	۱۰	۹(شیب۱۲)
ششم	۱۰	۲۲(شیب۲۹)	۱۰	۱۰(شیب۱۵)

تجزیه و تحلیل آماری

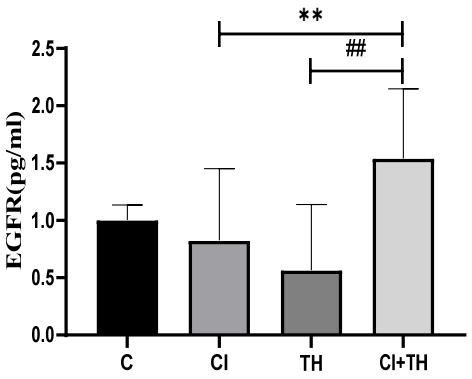
جهت بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف و جهت تجزیه و تحلیل یافته‌ها از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه همراه با آزمون تعقیبی توکی در نرم افزار SPSS نسخه ۲٦ استفاده شد (P<۰/۰۵).

نتایج

سطوح بیان ژنی EGF وEGFR به ترتیب در نمودارهای ۱ و ۲ ارائه شده است. نتایج آزمون آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد تفاوت معناداری در سطوح بیان ژنی EGF (F=۸/٦٤٤،P=۰/۰۰۱) و EGFR (F=٤/۳۱۵،P=۰/۰۱٤) در بافت هیپوکمپ موش‌های بزرگ آزمایشگاهی در گروه‌های چهارگانه تحقیق وجود دارد. نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد سطوح EGF بافت هیپوکمپ در گروه تمرین تناوبی شدید (TH) به طور معناداری بالاتر از گروه‌های مهار CGRP (CI)(P=۰/۰۰۱) و گروه کنترل (C)(P=۰/۰۰٦) بود. همچنین در گروه مهار CGRP+ تمرین تناوبی شدید(CI+TH) به طور معناداری بالاتر از گروه مهار CGRP (CI)(P=۰/۰۰۷) بود. سطوح بیان ژنی EGFR در گروه مهار CGRP+تمرین تناوبی (CI+TH) به طور معناداری بالاتر از گروه‌های مهار CGRP (CI) (P=۰/۰٤) و تمرین HIIT (TH) (P=۰/۰۱) بود.



نمودار ۱. نتایج آزمون تعقیبی توکی، سطوح بیان ژنEGF درگروه‌های چهارگانه تحقیق (اطلاعات در نمودار براساس انحراف استاندارد±میانگین)
*** افزایش معنادار نسبت به گروه کنترل(C) (P=۰/۰۰٦)
&&& افزایش معنادار نسبت به گروه مهار CGRP(CI) (P=۰/۰۰۱)
کاهش معنادار نسبت به گروه مهار CGRP(CI) (P=۰/۰۰۷)



نمودار۲. نتایج آزمون تعقیبی توکی، سطوح بیان ژنEGF درگروه های چهارگانه تحقیق(اطلاعات در نمودار براساس انحراف استانداردهمیانگین)
**افزایش معنادار نسبت به گروه مهار CGRP(CI) (P=۰/۰٤)
افزایش معنادار نسبت به گروه تمرینHITT(TH) (P=۰/۰۱)

بحث

نتایج بدست از مطالعه حاضر نشان داد ٦ هفته تمرین تناوبی شدید تاثیر معناداری بر سطوح EGF بافت هیپوکمپ موش‌های نر دارد. در همین راستا Yasar و همکاران (۲۰۲۱) در مطالعه خود نشان دادند که انجام تمرینات SIT اثر معناداری بر افزایش سطح EGF پلاسما در مردان سالمند دارد (۲۳). همچنین مطالعات نشان دادند EGF که براثر التهاب فعال می‌شود در بهبود زخم در مدل موش، تکثیر سلولی، بیماری‌های مزمن کلیوی و تورمورزایی در انسان دخالت دارد (۲٤،۲۵). با این حال مطالعه ذکر شده تنها مطالعه ای بود که به بررسی سطوح EGF پس از تمرینات طولانی مدت پرداخته بود و مطالعه‌ای یافت نشد که به بررسی تاثیر تمرینات بلند مدت (بیشتر از یک ماه) بر روی سطوح EGF پرداخته باشد و به نظر می رسد مطالعه حاضر جزو اولین مطالعه‌ها در این رابطه باشد . با این حال Accattato و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند یک جلسه تمرین استقامتی (۲۰ دقیقه دویدن با ۷۰ درصد Vo2peak) باعث سرکوب EGF در افراد جوان می شود (۲٦) درحالی‌که تمرینات مقاومتی، سطح EGF در مردان جوان سالم تمرین کرده را به شدت افزایش می‌دهد (۲۷). بنابراین واضح است که نوع و شدت ورزش بر پاسخ EGF بعد از یک دوره تمرین تاثیر بسزایی دارد. همچنین مطالعات نشان داده‌اند مهار گیرنده های EGF در تارهای عضلانی کند انقباض بیشتر از تارهای عضلانی با فنوتیب تند انقباض است (۲۸) و به نظر می رسد افزایش EGF پس از تمرینات مقاومتی با هیپرتروفی و افزایش سنتز پروتئین همراه است در حالی که کاهش EGF پس از تمرینات استقامتی با سازگاری اکسیداتیو مرتبط است. این در حالی است که تمرینات HIIT جزو تمرینات پر شدت و با تایم های تمرینی کم است که می‌توانیم آن را همراستا با تمرینات مقاومتی بدانیم و به نظر می‌رسد افزایش سطح EGF در تمرینات HIIT همانند تمرینات مقاومتی باشد. با این حال، اهمیت بالینی و مکانیسم اثر این تغییرات در EGF پس از تمرینات ورزشی مشخص نیست. از نتایج دیگر پژوهش افزایش سطح EGF درگروه مهار CGRP همراه با تمرین HIIT نسبت به گروه مهار CGRP به تنهایی بود. با توجه به بررسی‌های انجام شده مطالعه‌ای یافت نشد که بر روی مهار پپتید وابسته به کلسی تونین (CGRP) پرداخته باشد و مقایسه نتایج بدست آمده در پژوهش حاضر با محدودیت مواجهه بود. یافته‌های مطالعات نشان داده‌اند، CGRP نقش مهمی در اتساع عروق خونی مغزی دارد، که نقش حفاظتی آن را در سلول های عصبی نشان می دهد (۱۰). با این حال مهار CGRP باعث کاهش اتساع عروقی درمغز می شود، از طرفی به نظر می‌رسد تمرینات HIIT با افزایش جریان خون، درآنژیوژنزو نوروژنز مغز تاثیر بسزایی دارد. این در حالی است که مکانسیم دقیق تاثیر مهار CGRP بر فاکتور رشد اپیدرمی(EGF) مشخص نیست.

نتایج دیگر مطالعه حاضر نشان داد تمرین تناوبی شدید HIIT همراه با مهار CGRP باعث افزایش گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی (EGFR) در بافت هیپوکمپ موش‌های نر سالم می‌شود. با توجه به مطالعات انجام شده نتایجی یافت نشد که بر روی تاثیر مهار CGRP به تنهایی یا همراه با فعالیت ورزشی بر EGFR پرداخته باشد و مطالعه حاضر جهت بررسی دچار محدودیت بود. با این حال زارع و همکاران (۲۰۲۲) در مطالعه‌ای به بررسی تاثیر تمرینات استقامتی و مهار CGRP بر روی AKT بافت هیپوکمپ پرداختند و نشان دادند تمرینات استقامتی و مهار CGRP تاثیر معناداری بر AKT ندارد (۲۹). براری و همکاران (۲۰۱۷) نیز در مطالعه‌ای بر روی اثر تمرین شنا بر سطح گیرنده‌های رشد اپیدرمال موش‌های مبتلا به سرطان سینه

نشان دادند تمرینات شنا تاثیر معناداری بر سطح EGFR در موش‌های سرطانی ندارد (۳۰). مطالعات نشان می دهد EGFR یک پروتئین بین غشایی با فعالیت تیروزین کینازی است که در عملکردهای مختلف از قبیل رشد، تکثیر و تمایز سلولی نقش دارد. همچنین نشان داده شده است ژن EGFR با مراحل پیشرفته در سرطان‌های مختلف مرتبط است (۳۰). جهش در ژن EGFR سبب فعال شدن گیرنده آن در سطح سلول می‌شود و این گیرنده با مهار مسیرهای آپوپتوز باعث بقای سلول می شود (۳۱). تقریبا همه سلول‌ها EGFR را بیان می‌کنند ولی مشاهده شده است که در اکثر انواع سرطان‌ها EGFR بیش از حد نرمال بیان می‌شود (۳۲). از طرفی مطالعات نشان داده‌اند CGRP به طور گسترده در مغز توزیع شده و در فرایندهایی باعث ایجاد تغییرات در تحریک‌پذیری هیپوکمپ، مانند یادگیری و حافظه دخیل است . همچنین نقش حفاظتی در سرکوب استرس اکسیداتیو را نیز ایفا می کند (۳۳،۳٤). با توجه به پیشینه‌های مطالعات به نظر می رسد مهار CGRP باعث افزایش شاخص‌های استرس اکسیداتیو در بافت هیپوکمپ می‌شود و با توجه به نقش فعالیت ورزشی در کاهش شاخص‌های استرس اکسیداتیو و آپوپتوز در بافت‌های مختلف مانند هیپوکمپ (۳۵) و قلب (۳٦) به نظر می رسد تمرین HIIT با افزایش EGFR به عنوان عاملی جهت کاهش فرآیند آپوپتوزی در بافت هیپوکمپ افزایش داشته است. همچنین مطالعات نشان داده اند افزایش بیان EGF باعث افزایش گیرنده‌های رشدی فاکتور اپیدرمی شده و در مسیر PI3K/Akt باعث مقاومت سلول در برابر آپوپتوز می‌گردد (٦). با این حال مکانیسم دقیق تاثیر مهار CGRP به تنهایی و همراه با تمرینات ورزشی بر سطح بیان ژن EGFR بافت هیپوکمپ مشخص نیست و برای شناخت مکانیسم دقیق آن به پژوهش‌های بیشتری در این رابطه نیاز است. با این حال پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های آینده برروی مهار CGRP بر فاکتورهای EGF و EGFR همراه با پروتکل های تمرینی متفاوت مانند تمرینات مقاومتی، استقامتی و ترکیبی و بافت هایی مانند قلب،کلیه،کبد و عضلات اسکلتی مطالعه شود.

نتیجه‌گیری

به نظر می رسد تمرین تناوبی شدید باعث افزایش فاکتورهای EGF وEGFR در بافت هیپوکمپ موش های نر سالم می‌شود که درفرآیند آنژیوژنز دخالت دارند . از طرفی مهار CGRP باعث افزایش EGFR شد. با این حال برای شناخت دقیق مکانیسم‌های موجود نیازمند انجام پژوهش‌های بیشتری در این رابطه است.

ملاحظات اخلاقی

پژوهش حاضر مطابق دستورالعمل های موسسه ملی بهداشت (NIH) انجام و با کد اخلاق (IR.USB.REC.1400.029) توسط کمیته اخلاق دانشگاه سیستان وبلوچستان تایید و انجام شد.

تعارض و منافع

نویسندگان مقاله اعلام می دارند که هیچ گونه تضادی در منافع وجود ندارد.

منابع

1. Pouranvari S, Ebrahimi F, Javadi G, Maddah B. Production of recombinant human epidermal growth factor and assessment of its activity in cell viability. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences 2015;25(125):10-20.
2. Wang Q, Xu L, Wu Q, Zhang M, Zhang J. Association between the risk of hepatitis virus-related hepatocellular carcinoma and EGF polymorphism: A PRISMA-compliant updated meta-analysis. Medicine 2022;101(42):e31280.
3. Sirigireddy V. A comparative study of effect of epidermal growth factor on chronic leg ulcers with anti-septic dressing. International Surgery Journal 2021;8(10):2910-5.
4. Meybosch S, De Monie A, Anné C, Bruyndonckx L, Jürgens A, De Winter BY, et al. Epidermal growth factor and its influencing variables in healthy children and adults. PloS One 2019;14(1):e0211212.
5. Marinović S, Berković MC, Zjačić-Rotkvić V, Kapitanović S. Analysis of polymorphisms in EGF, EGFR and HER2 genes in pancreatic neuroendocrine tumors (PNETs). Cancer Genetics 2022;266:44-50.
6. Rajaram P, Chandra P, Ticku S, Pallavi B, Rudresh K, Mansabdar P. Epidermal growth factor receptor: Role in human cancer. Indian Journal of Dental Research 2017;28(6):687.
7. Shoorgashti R, Sadri D, Farhadi S. Expression of Epidermal Growth Factor Receptor by Odontogenic Cysts: A comparative Study of Dentigerous Cyst and Odontogenic Keratocyst. ournal of Research in Dental Sciences 2020;17(2):127-36.
8. Edvinsson L, Warfvinge K. The CGRP Family of Neuropeptides and their Receptors in the Trigeminovascular System. Monoclonal Antibodies in Headache: Springer 2021;1-12.
9. Russell FA, King R, Smillie S-J, Kodji X, Brain S. Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology. Physiological Reviews 2014;94(4):1099-142.
10. Aveseh M, Koushki Jahromi M, Nemati J, Esmaieli Mahani S. Acute and Chronic Effects of Endurance Training on CGRP Gene Expression in The Brain, CSF, And Serum of Male Wistar Rats. Sport Physiology 2019;11(41):137-52.
11. Rossetti L, Farrace S, Choi S, Giaccari A, Sloan L, Frontoni S, et al. Multiple metabolic effects of CGRP in conscious rats: role of glycogen synthase and phosphorylase. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism 1993;264(1):E1-E10.
12. Hashikawa-Hobara N, Ogawa T, Sakamoto Y, Matsuo Y, Ogawa M, Zamami Y, et al. Calcitonin gene-related peptide pre-administration acts as a novel antidepressant in stressed mice. Scientific Reports 2015;5(1):1-14.
13. Singh Y, Gupta G, Shrivastava B, Dahiya R, Tiwari J, Ashwathanarayana M, et al. Calcitonin gene-related peptide (CGRP): A novel target for Alzheimer's disease. CNS Neuroscience & Therapeutics 2017;23(6):457-61.
14. Russo AF. Calcitonin gene-related peptide (CGRP): a new target for migraine. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 2015;55:533.
15. Borkum JM. CGRP and brain functioning: cautions for migraine treatment. Headache:The Journal of Head and Face Pain 2019;59(8):1339-57.
16. Holzer P, Pabst M, Lippe IT, Peskar B, Peskar B, Livingston E, et al. Afferent nerve-mediated protection against deep mucosal damage in the rat stomach. Gastroenterology 1990;98(4):838-48.
17. Zhai L, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Tanaka M, et al. Endogenous calcitonin gene-related peptide suppresses ischemic brain injuries and progression of cognitive decline. Journal of Hypertension 2018;36(4):876-91.
18. Melo CS, Rocha-Vieira E, Freitas DA, Soares BA, Rocha-Gomes A, Riul TR, et al. A single session of high-intensity interval exercise increases antioxidants defenses in the hippocampus of Wistar rats. Physiology & Behavior 2019;211:112675.
19. Naghibzadeh M, Ranjbar R, TABANDEH M, Habibi A. Effect of High Intensity Exercise Preconditioning on the Prevention of Myelin damage in Hippocampus of Male C57BL/6 Mice. SJIMU 2019;27(1):122-136.
20. Rogoz K, Andersen HH, Kullander K, Lagerström MC. Glutamate, substance P, and calcitonin gene-related peptide cooperate in inflammation-induced heat hyperalgesia. Molecular Pharmacology 2014;85(2):322-34.
21. Sun P, Wei S, Wei X, Wang J, Zhang Y, Qiao M, et al. Anger emotional stress

influences VEGF/VEGFR2 and its induced PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. Neural Plasticity 2016;2016(10).41:1-12
22. Verboven M, Cuypers A, Deluyker D, Lambrichts I, Eijnde BO, Hansen D, et al. High intensity training improves cardiac function in healthy rats. Scientific Reports 2019;9(1):1-8.
23. Yasar Z, Elliott BT, Kyriakidou Y, Nwokoma CT, Postlethwaite RD, Gaffney CJ, et al. Sprint interval training (SIT) reduces serum epidermal growth factor (EGF), but not other inflammatory cytokines in trained older men. European Journal of Applied Physiology 2021;121(7):1909-19.
24. Choi SY, Lee YJ, Kim JM, Kang HJ, Cho SH, Chang SE. Epidermal growth factor relieves inflammatory signals in staphylococcus aureus-treated human epidermal keratinocytes and atopic dermatitis-like skin lesions in Nc/Nga mice. BioMed Research International 2018 15;2018:9439182. doi: 10.1155/2018/9439182. eCollection 2018..
25. Rayego-Mateos S, Rodrigues-Diez R, Morgado-Pascual JL, Valentijn F, Valdivielso JM, Goldschmeding R, et al. Role of epidermal growth factor receptor (EGFR) and its ligands in kidney inflammation and damage. Mediators of Inflammation 2018;2018(10).87:1-22.
26. Accattato F, Greco M, Pullano SA, Carè I, Fiorillo AS, Pujia A, et al. Effects of acute physical exercise on oxidative stress and inflammatory status in young, sedentary obese subjects. PloS one 2017;12(6):e0178900.
27. Diaz-Castro J, Moreno-Fernandez J, Chirosa I, Chirosa LJ, Guisado R, Ochoa JJ. Beneficial effect of ubiquinol on hematological and inflammatory signaling during exercise. Nutrients 2020;12(2):424.
28. Ciano M, Mantellato G, Connolly M, Paul-Clark M, Willis-Owen S, Moffatt MF, et al. EGF receptor (EGFR) inhibition promotes a slow-twitch oxidative, over a fast-twitch, muscle phenotype. Scientific Reports 2019;9(1):1-9.
29. Zare M, Nayebifar S, Aminizadeh S, Vahidian-Rezazadeh M. The Effects of Six Weeks of Endurance Training and CGRP Inhibition on Nrf2 and AKT Expression in the Hippocampal Tissue of Male Wistar Rats. Mediators of Inflammation. 2022;2022(10).16:1-9
30. Barari AR, Hadian S, Amini S. Effect of Aloe Vera and Swimming Training on Serum Levels of Epidermal Growth Receptors (HER2, EGFR), in mice with Breast Cancer. Iranian Quarterly Journal of Breast Disease 2017;10(3):31-40.
31. Cheng G, Mei Y, Pan X, Liu M, Wu S. Expression of HER2/c-erbB-2, EGFR protein in gastric carcinoma and its clinical significance. Open Life Sciences 2018;14(1):119-25.
32. Song M, Lee KM, Kang D. Breast cancer prevention based on gene–environment interaction. Molecular Carcinogenesis 2011;50(4):280-90.
33. Haug T, Storm JF. Protein kinase A mediates the modulation of the slow Ca2+-dependent K+ current, I sAHP, by the neuropeptides CRF, VIP, and CGRP in hippocampal pyramidal neurons. Journal of Neurophysiology 2000;83(4):2071-9.
34. Luo H-m, Wu X, Liu W-x, Wang L-y, Sun H-y, Zhu L-y, et al. Calcitonin gene-related peptide attenuates angiotensin II-induced ROS-dependent apoptosis in vascular smooth muscle cells by inhibiting the CaMKII/CREB signalling pathway. Biochemical and Biophysical Research Communications 2020;521(2):285-9.
35. Shamsi B, Abedi B, Ramezani S. The effect of eight weeks of resistance training with consumption of Tribulus terrestris extract on antioxidant indices of hippocampal tissue in male rats exposed to stanazol. Journal of Applied Health Studies in Sport Physiology 2022;9(1):48-60.
36. Arjmand A, Abedi B, Hosseini SA, Ramezani S. The Effect of Resistance Training with Tribulus terrestris Extract on Apoptosis of Heart Tissue in Rats. Journal of North Khorasan University of Medical Sciences 2021;13(2):70-6.