

The effect of exercise on cellular and molecular mechanisms (regulation of calcium and cell growth) of heart tissue in the rat

Mostafa Setamdideh, Kamal Azizbeigi*, Zaher Etemad, Khalid Mohammadzadeh

Department of Physical Education, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran

* Corresponding author e-mail: kazizbeigi@gmail.com

Citation: Setamdideh M, Azizbeigi K*, Etemad Z, Mohammadzadeh Kh. The effect of exercise on cellular and molecular mechanisms (regulation of calcium and cell growth) of heart tissue in the rat. *Daneshvar Medicine* 2021; 29(5):14-25.
doi: 10.22070/DANESHMED.2021.14385.1070

Abstract

Objective: The aim of this study was to investigate the effect of exercise on cellular and molecular mechanisms (regulation of calcium and cell growth) of heart tissue.

Materials and Methods: The research method was experimental and for this purpose, 24 male Wistar rats with a weight range of 200 ± 20 g and age of eight-weeks were prepared and randomly divided into three groups: control, intense periodic training and continuous training. Intense periodic training protocol; 30 minutes of intermittent running and sub-maximum continuous group (30 to 60 minutes) were performed five days a week for 8 weeks. Gene expression of the desired variables was measured in cardiac tissue.

Results: There was a significant difference between the eight-weeks of intense and sub-maximum intermittent training compared to the control group in the amount of gene expression changes in all three variables (TGF- β 1, SERCA2a, PI3K)($p < 0.05$). Intermittent and continuous exercise (both relative to control) leads to a significant increase in TGF-1 gene expression in the heart of male Wistar rats. The results showed that the amount of PI3K enzyme in the sub-maximal continuous and intense periodic training had a significant increase compared to the control group, there was no difference between the severe periodic group and the control group and there was no significant difference between the two training groups in the amount of SERCA2a.

Conclusion: According to the findings of the present study, higher training intensity can better perform cellular and molecular regulation, which requires more research in the future. The findings of the present study have been cautiously expressed and further research is needed in the future.

Keywords: Endurance training, Intense periodic training, Calcium deficiency, Heart tissue

Received: 15 Jul 2021
Last revised: 08 Nov 2021
Accepted: 22 Nov 2021

بررسی اثر فعالیت های ورزشی بر مکانیسم های سلولی و مولکولی (تنظیم کلسیم و رشد سلولی) بافت قلب در موش بزرگ آزمایشگاهی

نویسندگان: مصطفی ستم دیده، کمال عزیزبگی*، ظاهر اعتماد، خالد محمد زاده

گروه تربیت بدنی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران

*نویسنده مسئول: کمال عزیزبگی Email: kazizbeigi@gmail.com

مقاله پژوهشی

چکیده

هدف: این مطالعه با هدف بررسی اثر فعالیت های ورزشی بر مکانیسم های سلولی و مولکولی (تنظیم کلسیم و رشد سلولی) بافت قلب صورت گرفت.

مواد و روش ها: روش تحقیق تجربی بوده و به همین منظور تعداد ۲۴ سر موش بزرگ آزمایشگاهی نژاد ویستار با محدوده وزنی 20 ± 200 گرم و سن هشت هفته، تهیه و به صورت تصادفی به سه گروه کنترل، تمرین تناوبی شدید و تمرین تداومی تقسیم شدند. پروتکل تمرینی تناوبی شدید: ۳۰ دقیقه دویدن تناوبی و گروه تداومی زیر بیشینه (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) پنج روز در هفته و به مدت ۸ هفته اجرا شد. بیان ژن متغیرهای مورد نظر در بافت قلب اندازه گیری شد.

نتایج: بین هشت هفته اجرای تمرین تناوبی شدید و تداومی زیر بیشینه به نسبت گروه کنترل در میزان تغییرات بیان ژن در هر سه متغیر ($PI3K$, $SERCA2a$, $TGF-\beta 1$) تفاوت معناداری وجود دارد ($p < 0.05$). تمرینات ورزشی تناوبی و تداومی (هر دو نسبت به کنترل) منجر به افزایش معنادار بیان ژن $TGF-\beta 1$ در قلب موش های بزرگ آزمایشگاهی نژاد ویستار می شود. نتایج نشان داد میزان آنزیم $PI3K$ در تمرین تداومی زیر بیشینه و تناوبی شدید افزایش معناداری نسبت به گروه کنترل دارد، اختلافی بین گروه تناوبی شدید و کنترل وجود ندارد و تفاوت معناداری بین دو گروه تمرینی در میزان $SERCA2a$ مشاهده نشد.

نتیجه گیری: با توجه به یافته های پژوهش حاضر شدت تمرین بالاتر می تواند تنظیم سلولی و مولکولی را بهتر انجام دهد که نیاز به تحقیقات بیشتری در آینده دارد. لذا یافته های پژوهش حاضر با احتیاط بیان شده است و نیاز به تحقیقات بیشتری در آینده می باشد.

واژه های کلیدی: تمرین استقامتی، تمرین تناوبی شدید، اختلال کلسیمی، بافت قلب

دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۲۹

آخرین اصلاح ها: ۱۴۰۰/۰۸/۱۷

پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۰۱

مقدمه

مسیر سیگنال دهی اثر گذار بر تنظیم کلسیم و عملکرد قلب شناخته شده که در پی انجام فعالیت های ورزشی منظم راه اندازی می شود (۴). از میان عوامل یاد شده در این مسیر نقش ایزوفرم های PI3K بر تنظیم عملکرد قلب مهم و ضروری به نظر می رسد (۵). Lu و همکاران (۲۰۱۵) به بررسی اثر هشت هفته تمرین تناوبی و تناوبی بر نشانگرهای فشار اکسایشی و پروتئینهای آپوپتوزی در ۴۰ رت نر پرداختند. نتایج پژوهش آنها نشان داد میزان آیزیم های PI3K و AMPK در هر دو گروه تمرین کرده افزایش نشان دادند. در حالی که بهبود ظرفیت عملکرد قلب در گروه تناوبی بیش از گروه تداومی بود (۶). یکی دیگر از متغیرهایی که بر تنظیم سلولس ملکولی عضلات و همچنین تغییرات رشد سلولی اثرگذار است $TGF-\beta^5$ می باشد. $TGF-\beta$ قوی ترین فعال کننده بیان کلاژنی است که تا امروز شناخته شده است و بر اثر نیروهای مکانیکی فعال می شود. بنابراین، به احتمال زیاد تحریک نسخه برداری کلاژنی ریشه در بار مکانیکی دارد که از راه تحریک اتوکراین $TGF-\beta$ صورت می گیرد (۷). تأثیر فعالیت ورزشی بر ترشح $TGF-\beta$ و تحریک ساخت کلاژن در مقالات مختلف در تضاد است. شاید شدت بار تمرینی این تضاد را به چالش می کشد. این پرسش از جمله پرسش های همیشگی پژوهشگران بوده است که چه فعالیت ورزشی می تواند تولید $TGF-\beta_1$ (به عنوان قوی ترین محرک ساخت کلاژن که خود وابسته به بار مکانیکی است) را کاهش دهد (۸). گلباشی و همکاران (۱۳۹۶) در پژوهشی به بررسی نقش تمرینات تناوبی شدید بر تغییرات $TGF-\beta_1$ و عملکرد عضله قلب بدنبال ایسکمی-ریپرفیوژن مجدد عضله قلب پرداختند. نتایج پژوهش آنها نشان داد که این نوع تمرینات می تواند منجر به بهبود شرایط قلب بدنبال ایسکمی میوکارد شود (۹). فعالیت های ورزشی شکلی های مختلفی دارد و بر اساس شدت و مدت تمرین و فعالیت به دسته های مختلفی تقسیم می شوند. مشهورترین مدل تمرینی تمرینات استقامتی و یا تداومی می باشد. اما امروزه در محیط های ورزشی (باشگاه ها) کمتر به این نوع تمرینات می پردازند. جامعه

اختلالات درگیر در حفظ یا تنظیم هموستاز کلسیم درون سلولی از نظر سلولی و مولکولی بخش های مختلفی از قلب را تحت تأثیر قرار می دهد. یکی از مهم ترین سازوکارهای متأثر، فرآیند بنیادی سلولی تحریک-انقباض است که ضربان قلب را به شیوه ای منظم حفظ می کند. بازگشت به مقادیر دیاستولی کلسیم برای آرامش عضله در چرخه کلسیم از راه پمپ ATPase کلسیمی شبکه سارکوپلاسمی (SERCA2a) و کاهش مقادیر کلسیم توسط پمپ مبادله گر سدیم-کلسیم (NCX) سارکولمایی کنترل می شود. آرامش عضله قلب متعاقب فرایند تأخیر کلسیم آغاز می شود، که به وسیله جمع آوری کلسیم و سازوکار انتشار کلسیم کنترل می شود. در فرایند جمع آوری کلسیم، پمپ SERCA، کلسیم را از سیتوزول به درون شبکه سارکو-اندوپلاسمی پمپ می کند. مشابه این سازوکار انتشار، کلسیم را از راه غشای پلاسمایی پمپ های کلسیمی ATPase (PMCA) و پمپ مبادله گر سدیم-کلسیم به بیرون می راند (۱). به احتمال زیاد اختلال عملکرد قلب به علت تغییر در بیان و یا ساز و کارهای سلولی که در چرخه قلبی، کلسیم درون سلولی را تنظیم می کنند، ناشی می شود (۲). محرک های مختلفی مانند فعالیت ورزشی، استرس های مکانیکی، هورمون ها و غیره بر تنظیم کلسیم (رها سازی و جمع کردن) مؤثر هستند. این تنظیم ملکولی به گفتمان های درون سلولی بر میگردد. در واقع شبکه سارکوپلاسمی (SERCA2a) از طریق مسیرهای بالادستی فعال شده و به تنظیم کلسیم می پردازد (۳). یکی از این مسیرها مربوط به مسیر پیام رسانی فسفاتیدیل اینوزیتول ۳ کیناز^۱ می باشد. فسفاتیدیل اینوزیتول ۳ کیناز بعنوان تنظیم گر رشد و تکثیر سلولی در قلب فعال می شود و در هایپرتروفی نیز نقش دارد. سیگنال دهی PI3K به پروتئین کیناز بی^۲ (AKT) به واسطه تغییرات در غلظت کلسیم درون سلولی، تنظیم کننده ای مهم در رشد سلولی است. سازوکارهای پیام دهی سلولی از مسیر IGF-1^۳/PI3K/AKT/^۴GSK به عنوان اصلی ترین

1. Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)
2. Protein kinase B/Akt
3. Insulin-like growth factor-1
4. Glycogen synthase kinase

استفاده کردند نمونه‌ها علاوه بر یکسان بودن به لحاظ سنی، در شروع پروتکل به لحاظ وزنی نیز همگن‌سازی شدند (محدوده وزنی 20 ± 20 گرم)، سن موشهای بزرگ آزمایشگاهی هشت هفته بود و در شرایط یکسان و تحت دما، رطوبت، تهویه و چرخه روشنایی تاریکی مطلوب برای نگهداری حیوانات آزمایشگاهی نگهداری شدند. آشناسازی موش‌ها با پروتکل ورزشی تناوبی شدید و تداومی زیر بیشینه با ۵ جلسه تمرین در یک هفته انجام شد. به این صورت که در روز اول تمرین، موش‌ها را با نهایت دقت و آرامش بر روی تردمیل گذاشته و با سرعت بسیار پایین و یکنواخت شروع به تمرین کردند و در جلسات بعد که موش‌ها به خوبی و همگام با برنامه پیش می‌آمدند جهت آشنایی با پروتکل تناوبی و تداومی مورد نظر با سرعت‌های کم از تمرین تناوبی و تداومی استفاده گردید تا موش‌ها به نوع تمرین عادت کنند و با پروتکل آشنا شوند. این کار تا پایان جلسه ۵ آشنایی انجام شد و همه موش‌ها با این پروتکل‌ها آشنا شدند و بدون هیچ نوع مشکلی در پروتکل و آشنایی موش‌ها پس از آن، تمرین اصلی به مدت هشت هفته شروع و به پایان رسید.

تمرین ورزشی و روش اجرای آزمون ورزشی

برنامه تمرینی روی تردمیل طراحی شده ویژه حیوان (ساخت شرکت دانش سالار ایرانیان. ایران. تهران)، ۳ روز در هفته به مدت ۴۰ دقیقه بود که شامل ۵ دقیقه گرم کردن و سرد کردن با شدت ۴۰ تا ۵۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی (VO_{2max})^۲ و ۳۰ دقیقه دویدن تناوبی بود. هر تناوب شامل ۴ دقیقه دویدن با شدت خیلی بالا (تقریباً ۸۵ تا ۹۰ درصد VO_{2max}) و ۲ دقیقه ریکاوری فعال (تقریباً با شدت ۵۰ تا ۶۰ درصد VO_{2max}) بود. شدت تمرین در طی هفته‌ها بر اساس پژوهش‌های گذشته و ارتباط بین سرعت دویدن و VO_{2max} تنظیم شد. بنابراین، شدت تمرینی در هر هفته 0.02 m/sec افزایش می‌یافت (۱۲). در گروه تمرین تداوم زیر بیشینه نیز براساس درصدی از حداکثر اکسیژن مصرفی (که به متر بر دقیقه تبدیل گردید) سه جلسه در هفته در هشت هفته (شدت فعالیت معادل ۵۰ تا ۵۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی) به تمرین پرداختند. کلیه جلسات تمرین ساعت ۸

به سمت تمرینات جدیدی تحت عنوان تمرینات تناوبی شدید روی آورده‌اند و مجدد نیاز به بررسی روش‌های تمرینی جدید می‌باشد که اکثر عموم جامعه به سمت این روش‌های تمرینی گرایش دارند. یکی از این نوع روش‌های تمرینی تمرینات تناوبی با شدت بالا می‌باشد که به راحتی می‌توان اجرا نمود و در دسترس می‌باشد. از فعالیت ورزشی خیلی شدید هر چند معمولاً به دلیل خطری که برای بیماران دارد پرهیز می‌شود، Rogmno و همکارانش (۲۰۱۲)، نشان دادند دامنه وقایع ناسازگار وابسته به این نوع تمرین کم است (۱۰). Kami و همکارانش (۲۰۰۷) نشان دادند تمرین خیلی شدید روی نوارگردان باعث افزایش معنادار اندازه کاردیومیوسیت‌ها شده است و عملکرد قلبی و انقباضی نیز تقویت شده است (۱۱). شاید تمرینات تناوبی با شدت بالا (HIIT)^۱ به عنوان پروتکل ورزشی بتواند عامل درمانی مثبت و مناسبی در پیشگیری از بیماری‌های قلبی و از طرف دیگر تغییر در ساختار سلولی و تنظیم رشد سلولی فیزیولوژیک قلب باشد. با توجه به این موضوع، هدف این پژوهش بررسی اثر فعالیت‌های ورزشی بر مکانیسم‌های سلولی و مولکولی (تنظیم کلسیم و رشد سلولی) بافت قلب می‌باشد.

مواد و روش‌ها

روش پژوهش حاضر از نظر روش اجرا تجربی و از نظر هدف یک مطالعه کاربردی می‌باشد. این مطالعه تجربی در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کردستان با شناسه اخلاق IR.MUK.REC.1398.256 تصویب و بر اساس راهنمای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام شد. در این مطالعه ۲۴ سر موش بزرگ آزمایشگاهی نژاد ویستار مورد استفاده قرار گرفتند. حیوانات ۳ گروه ۸ تایی: کنترل، تمرین تناوبی شدید و تمرین تداومی زیر بیشینه در آزمایشگاه استاندارد جوندگان (چرخه ۱۲ ساعت روشنایی-تاریکی و میانگین درجه حرارت 22 ± 2 درجه سلسیوس) با دسترسی آزادانه به آب و غذا در بیمارستان علوم پزشکی لرستان نگهداری می‌شدند. کلیه نمونه‌ها از غذای یکسان به صورت پلت، خریداری شده از موسسه تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران

روی کاغذ فیلتر گذشته شدند تا رطوبت آن گرفته شود و آماده وزن‌کشی شوند. قلب موش در ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن‌کشی شده سپس بلافاصله با استفاده از ت مایع منجمد شده برای تلخیص RNA به فریزر با دمای ۸۰- منتقل شدند. در این مطالعه به منظور بررسی تغییرات بیان ژن متغیر وابسته تحقیق از تکنیک qRT-PCR استفاده شد. بدین منظور ابتدا RNA سلول‌ها استخراج شد و سپس طی مراحل به نام DNase I treatment. با DNaseI تیمار شد. در این روش در صورت وجود DNA اضافی در نمونه، DNA حذف می‌شود. در نهایت cDNA ساخته شد و واکنش‌های qRT-PCR انجام شد. استخراج RNA از بافت نمونه با استفاده از Qiazol (کیت Qiagen، آلمان) با توجه به توصیه سازنده استخراج شد. به منظور از بین بردن احتمالی آلودگی RNA با DNA از آنزیم DNase عاری از RNase استفاده شد. مقادیر لازم برحسب غلظت RNA استخراج شده تعیین شد. بدین ترتیب به ازای یک میکروگرم RNA استخراج‌شده یک میکرو لیتر DNase (Fermentase, 1µl) و یک میکرو لیتر بافر x 10 اضافه شد و حجم محلول با آب تیمار شده با DEPC به ۱۰ میکرو لیتر رسانده شد. محلول حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد، سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد تا آنزیم غیرفعال شود. غلظت RNA به روش اسپکتروفتومتری UV (Eppendorff، آلمان) تعیین شد. جهت ساخت cDNA به ۱-۰/۲ میکروگرم RNA استخراج‌شده ۱ میکرو لیتر Oligo dt اضافه شد. حجم نهایی این مرحله باید ۱۲ میکرو لیتر باشد. بدین ترتیب اگر RNA غلیظ‌تر بود مقدار کمتری از آن برداشته شد و با آب تیمار شده با DEPC به حجم نهایی ۱۲ میکرو لیتر رسانده شد. واکنش به مدت ۵ دقیقه در ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس بلافاصله درون یخ گذاشته شد. به میکروفیوژ، ۴ میکرو لیتر بافر X5، ۲ میکرو لیتر dNTP و ۱ میکرو لیتر RNasin اضافه شد تا حجم نهایی به ۱۹ میکرو لیتر برسد. محلول واکنش به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. یک میکرو لیتر آنزیم RT به واکنش اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در ۴۲ درجه سانتی‌گراد

تا ۱۳ انجام شد. زمان تمرین (علاوه بر سرعت تردمیل که هر هفته ۰/۰۲ m/sec افزایش می‌یافت) در هفته های اول ۳۰ دقیقه و در هفته‌های پایانی به ۶۰ دقیقه رسید (۱۳).

روش اندازه‌گیری VO2max در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نژاد ویستار

بر اساس مطالعه Hovidal و همکاران، هر موش ابتدا به مدت ۱۰ دقیقه با شدت ۱۰ متر در دقیقه مرحله گرم کردن را سپری می‌کردند، سپس آزمون فزاینده ورزشی آغاز شد، هر دو دقیقه سرعت تردمیل 0.03 m/sec به صورت خودکار افزایش می‌یافت تا زمانی که موش‌ها قادر به ادامه فعالیت ورزشی نبودند. با توجه به سرعت نهایی به دست آمده در انتهای آزمون بیشینه و بر اساس مطالعه هویدال و همکاران سرعت مورد نظر در شدت‌های برنامه تمرینی به دست آمد (۱۲، ۱۳).

اندازه گیری غلظت فسفاتیدیل اینوزیتول-۳- کیناز (PI3K)

پلاسمای برداشتی به میزان تقریبی ۱/۵ میلی لیتر که در دمای ۲۰- سانتی گراد فریز شده بود، جهت انجام الایزا از یخچال خارج و در دمای اتاق تا رسیدن به حالت محلول، انکوبه شد. برای اندازه گیری غلظت PI3K در پلاسمای از روش الایزا (دستگاه الایزا ریدر ساخت کمپانی بیوتک آمریکا) بهره گرفتیم. کیت مورد نیاز از شرکت ایست بیوفارم آمریکا خریداری گردید. الایزا در دستگاه الایزا ریدر مطابق پروتکل ارائه شده توسط شرکت ایست بیوفارم آمریکا و در آزمایشگاه نبض تهران اجرا گردید. نمونه‌ها در ۲ مرحله برای اطمینان خاطر از صحت اندازه گیری و نمونه برداری و تزریق در کیت های مد نظر، مورد ارزیابی قرار گرفتند و میانگین اندازه‌ها (واحد نانوگرم بر میلی لیتر) در ۲ مرحله به عنوان اندازه مد نظر محقق در نظر گرفته شد. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین موش‌ها پس از ۱۴ ساعت ناشتایی شبانه نمونه‌برداری بافت قلبی انجام شد و برای جمع‌آوری نمونه‌ها ابتدا حیوان با ترکیبی از داروی زایلازین (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و کتامین (۷۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) به صورت تزریق درون صفاقی بی‌هوش می‌شد. سپس قلب موش‌ها از بدن آن‌ها جدا و در سرم فیزیولوژیک شست‌وشو داده شدند تا خون موجود در آن همراه با کمی فشار دادن به طور کامل خالی گردد و سپس

NCBI استخراج شد. پرایمرها توسط نرم‌افزار کامپیوتری Allel ID ساخته شد و سپس هر پرایمر توسط نرم‌افزار BLAST جهت اطمینان از یکتا بودن محل جفت شدن پرایمرها مورد ارزیابی قرار گرفت. پرایمرها توسط شرکت سیناکولن ساخته شد. در این تحقیق از ژن بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

انکوبه شد. برای متوقف کردن واکنش، میکرو تیوب به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. cdNA حاصل روی یخ قرار داده شد و تا زمان انجام واکنش PCR در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای طراحی پرایمرها ابتدا توالی mRNA مربوط به ژن TGFB1، β -actin و SERCA2a با استفاده از سایت

جدول ۱. توالی پرایمرهای موردنظر

Name	Seq. (5-3)
TGFB1	Rat TGFB1 F: 5'- CAACAACGCAATCTATGACAA-3'
	Rat TGFB12R: 5'- CAAGGTAACGCCAGGAAT-3'
SERCA2a	Rat SERCA2a F: 5'- ACTACCTGGAGCCTGCAATAC -3'
	Rat SERCA2a R: 5'- TCTCTTTCCCAAGCTCAGTC -3'
β - actin	Rat β - actin F: 5'- GGAGAAGATTTGGCACCACAC-3'
	Rat β - actin R: 5'- GGATGGCTACGTACATGGCTG-3'

تجزیه و تحلیل آماری

از آمار توصیفی برای دسته‌بندی داده‌های خام و توصیف داده‌ها استفاده شد. آزمون شاپیرو-ویلک برای بررسی نرمال بودن داده‌ها در گروه‌های مورد مطالعه و آزمون تحلیل واریانس یک راهه و آزمون تعقیبی LSD جهت بررسی تغییرات بین گروهی و جفتی گروه‌ها استفاده شد. سطح معنی‌داری برای کلیه آزمون‌های آماری $\alpha \leq 0.05$ در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS21 و ترسیم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel 2007 انجام گرفت.

نتایج

بیان ژن

نتایج آزمون آنالیز واریانس یک‌راهه، برای بیان ژن SERCA2a، TGF- β و PI3K در جدول شماره ۲، آورده شده است. برای بررسی میزان تغییرات بیان ژن TGF- β ، SERCA2a و PI3K در گروه‌های مختلف به صورت جفتی از آزمون LSD استفاده شد که نتایج آن در نمودارهای ۱ تا ۳ نشان داده شده است. نتایج آزمون تعقیبی LSD نشان داد که بیان ژن TGF- β به ترتیب در تمرین‌های تناوبی شدید و تداومی زیربیشینه افزایش معناداری نسبت به گروه کنترل داشتند ($p=0.01$) و

هر واکنش PCR با استفاده از (PCR master mix) SYBR Green و (Applied Biosystems) طبق پروتکل (Applied Biosystems, Sequence) شرکت سازنده انجام گرفت. ۴۰ سیکل برای هر چرخه Real-time PCR در نظر گرفته شد و دماهای هر سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه تنظیم شدند. برای تمامی ژن‌های مورد مطالعه نیز ژن رفرنس یعنی بتا اکتین جهت به دست آوردن دمای مناسب Anneling گرادیان دمایی انجام گردید. همچنین جهت بررسی efficiency پرایمرها، منحنی استاندارد اختصاصی هر ژن (سری‌های رقیق‌شده DNA) رسم گردید. نمودار Melting نیز جهت بررسی صحت واکنش‌های PCR انجام شده به صورت اختصاصی برای هر ژن و در هر بار از واکنش به همراه نمودار کنترل منفی جهت بررسی وجود آلودگی در هر واکنش مورد ارزیابی قرار گرفت. ژن مرجع تقریباً برابر بود. با استفاده از قرار دادن داده‌ها در فرمول‌های $\Delta \Delta Ct$ و $\Delta \Delta Ct-2$ میزان بیان ژن هدف با ژن مرجع نرمال‌سازی شد. همچنین برای تحلیل داده‌ها و اطلاعات از روش‌های آماری تحلیل واریانس یک راهه و آزمون تعقیبی LSD جهت بررسی تغییرات بین گروهی و جفتی گروه‌ها استفاده شد.

تناوبی، تداومی نسبت به گروه کنترل پس از ۸ هفته را نشان می دهد. نتایج آزمون LSD نشان داد که میزان PI3K در تمرین تداومی زیربیشینه ($p=0.023$) و تناوبی شدید ($p=0.006$) افزایش معناداری نسبت به گروه کنترل دارد. همچنین نتایج نشان داد که اختلافی بین گروه تناوبی شدید و کنترل وجود ندارد ($p=0.56$). نمودار ۳ تفاوت میزان PI3K در گروه تمرین تناوبی، تداومی نسبت به گروه کنترل پس از ۸ هفته را نشان می دهد.

($p=0.04$). همچنین نتایج نشان داد که اختلافی بین گروه تداومی زیر بیشینه و تناوبی شدید وجود ندارد ($p=0.6$) (نمودار ۱). تفاوت میزان بیان ژن TGF- β در گروه تمرین تناوبی، تداومی نسبت به گروه کنترل پس از ۸ هفته را نشان می دهد. همچنین نتایج آزمون LSD نشان داد که میزان بیان ژن SERCA2a در تمرین تداومی زیربیشینه ($p=0.01$) و تناوبی شدید ($p=0.009$) افزایش معناداری نسبت به گروه کنترل دارد. همچنین نتایج نشان داد که اختلافی بین گروه تناوبی شدید و کنترل وجود ندارد ($p=0.8$). نمودار ۲ تفاوت میزان بیان ژن در گروه تمرین

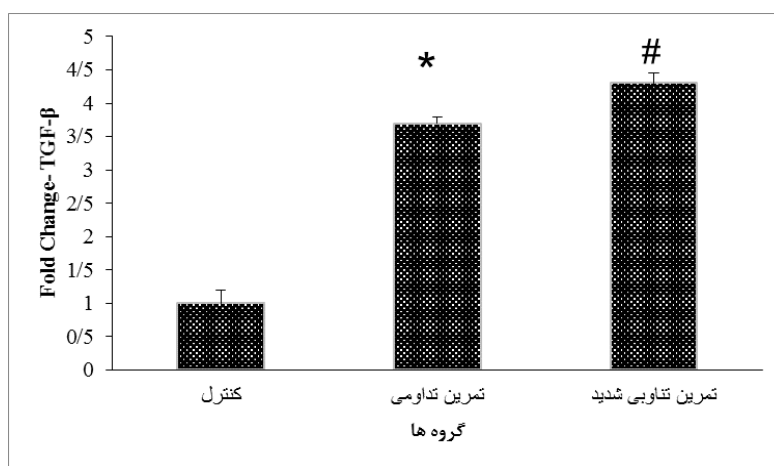
جدول ۲. بیان ژن متغیرهای پژوهش در سه گروه کنترل، تداومی زیربیشینه و تناوبی در انتهای پروتکل

متغیر	میانگین مجذورات	F	سطح معناداری
TGF- β	۲۰/۰۷	۳/۸	*۰/۰۳۸
SERCA2a	۶۱/۲	۳/۸	*۰/۰۲۳
PI3K (نانوگرم بر میلی لیتر)	۵/۸	۵/۲	*۰/۰۱۴

*تفاوت معنی دار در $p < 0.05$

۹۵٪ اطمینان تایید شد.

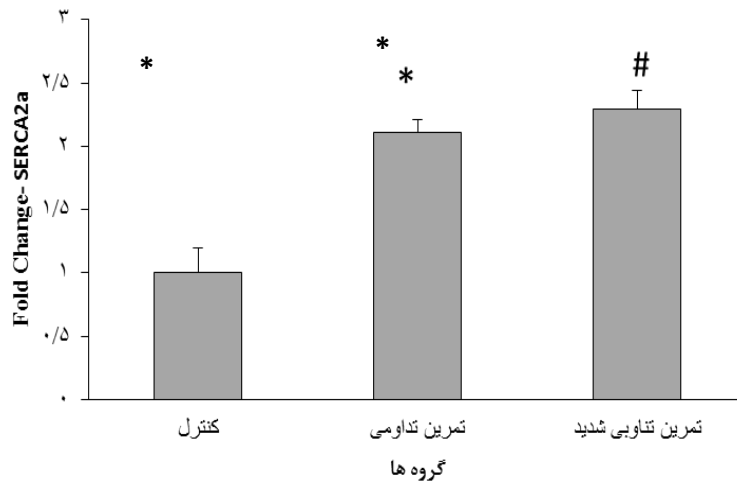
با توجه به مقدار F محاسبه شده و معنی دار بودن آنها تفاوت معناداری بین بیان ژن SERCA2a، TGF- β و میانگین غلظت PI3K در گروه‌های مختلف پژوهش با



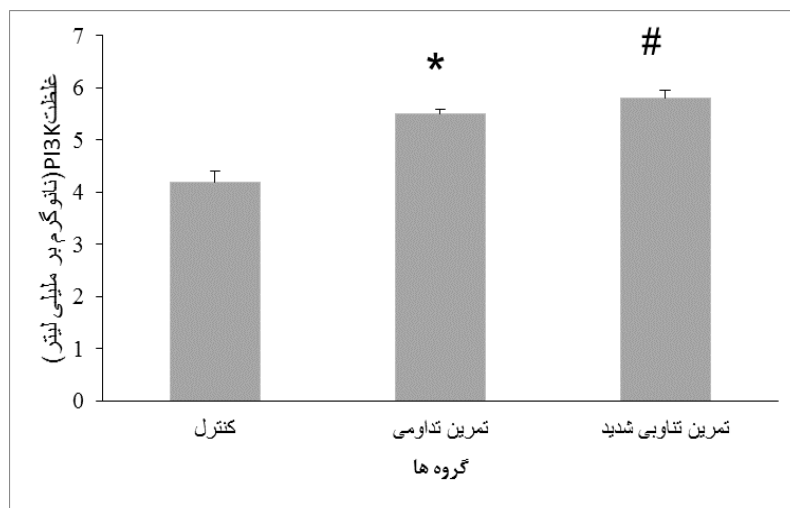
نمودار ۱. تفاوت میزان بیان ژن TGF- β در گروه تمرین تناوبی، تداومی نسبت به گروه کنترل پس از ۸ هفته

برای بررسی میزان بیان ژن TGF- β در گروه‌های مختلف به صورت جفتی از آزمون LSD استفاده شد.

* کنترل- تداومی زیر بیشینه $P < 0.001$ # کنترل- تناوبی شدید $P < 0.001$



نمودار ۲. تفاوت میزان بیان ژن **SERCA2a** در گروه تمرین تناوبی، تداومی نسبت به گروه کنترل پس از ۸ هفته برای بررسی میزان بیان ژن **SERCA2a** در گروه های مختلف به صورت جفتی از آزمون **LSD** استفاده شد. * کنترل- تداومی زیر بیشینه $P < 0/001$ # کنترل- تناوبی شدید $P < 0/001$



نمودار ۳. تفاوت میزان غلظت میانگین **pi3k** در گروه تمرین تناوبی، تداومی نسبت به گروه کنترل پس از ۸ هفته برای بررسی میزان بیان ژن **pi3k** در گروه های مختلف به صورت جفتی از آزمون **LSD** استفاده شد. * کنترل- تداومی زیر بیشینه $P < 0/001$ # کنترل- تناوبی شدید $P < 0/001$

بحث

حاضر نشان داد تمرینات ورزشی موجب افزایش معنادار شبکه سارکوپلاسما میک در گروه های ورزشی به نسبت گروه کنترل می شود ($p < 0.05$). هر چند نتایج، نشان از افزایش در بیان ژن **SERCA2a** در گروه تمرین ورزشی تناوبی شدید به نسبت تمرینات استقامتی بود اما این افزایش، یک افزایش غیر معنادار می باشد. در واقع این

اختلالات همودینامیک از جمله کاهش کسر تزریقی، اختلال سرعت عضله قلبی در ابتدای دیاستول، آرامش غیرطبیعی در مرحله اولیه پرشدن، طولانی شدن هم حجمی مرحله آرامش، پایین تر آمدن اوج سرعت اولیه سیستولی و دیاستولی، اختلال در آرامش دیاستولی می باشد که بسته به سن و طول مدت بیماری فرق می کند (۱۴). نتایج پژوهش

باعث رشد سلول های قلبی می شود که بوسیله راه سیگنالینگ محوری GH/IGF از طریق PI3K/AKT یا AKT/mTOR¹ تنظیم می شود. فعالیت پروتئین AKT سوبستراهای متفاوت درون سلولی را در تنظیم رشد، متابولیسم و ابقاء سلولی فسفوریله می کند. بیان زیاد گیرنده IGF-1 باعث فعالیت AKT می شود که در نتیجه به هیپرتروفی فیزیولوژیکی بوسیله افزایش جریان کلسیم از طریق کانال کلسیم L-type و SERCA منتهی می شود (تغییرات SERCA در این پژوهش ارزیابی شده است که در ادامه به شرح آن پرداخته می شود). رشد فیزیولوژیکی و سازگاریهای همودینامیکی زمانی که AKT-1 سرکوب شود کند می شود. گلیکوژن سنتتاز کیناز-3، تنظیم کننده مهم منفی سنتز پروتئین است که بوسیله AKT جلوگیری می شود. میتوز فعال کننده پروتئین کیناز (MAPK)² درگیر در کنترل رشد، کارکرد و سازگاری سلولی است و پروتئین سیگنالی است که در همه جا وجود دارد. مکانیسم کشش باعث فعالیت سیگنالی MAPK می شود. در نتیجه آن بیان ژنی c-fos، c-jun و c-myc³ شروع می شود و متعاقباً این افزایش بیان ژنی هایپرتروفی شکل می گیرد (17، 18). تمرینات ورزشی تناوبی و تداومی (هر دو نسبت به کنترل) منجر به افزایش معنادار بیان ژن TGF-β1 در قلب موش های بزرگ آزمایشگاهی نژاد ویستار می شود. نتایج پژوهش حاضر در رابطه با تغییرات TGF-β1 با نتایج پژوهش لو و همکاران (2016) موافق و همسوست. LU و همکاران (2016) در پژوهشی به بررسی نقش تمرینات ورزشی بر سطوح سرمی عوامل درگیر در هایپرتروفی بطنی پرداختند. نتایج پژوهش آنها نشان داد که فعالیت ورزشی می تواند منجر به افزایش عوامل درگیر در هایپرتروفی قلبی شود (21) و با نتایج پژوهش، گلباشی و همکاران (1396)، حبیبیان و همکاران (1395) و فتحی و همکاران (2016) مخالف و ناهمسوست (10، 19، 20). گلباشی و همکاران (1396) نشان دادند که فعالیت ورزشی منجر به کاهش سطوح TGF-β1 در موش های مسن و ایسکمی شده است. حبیبیان و همکاران (1394) در پژوهشی به بررسی اثر 8 هفته تمرین شنا بر سطوح قلبی

نتیجه نشان می دهد که زمانی که تمرینات ورزشی می توانند به عنوان یک تعدیل کننده باشند. در واقع پمپ SERCA2a که بخشی از کانال های آزاد کننده کلسیم درون سلولی و پمپ کننده کلسیم به درون شبکه سارکوپلاسمی هستند بدنبال تمرینات ورزشی دستخوش تغییر در حساسیت این گیرنده ها و همچنین NCX در فعالیت های وابسته به کلسیم (یعنی تنظیم منفی) می شود. این تغییرات مشاهده شده در این گیرنده ها که مسئول بخشی از کاهش سرعت و انقباض عضله قلبی است بدنبال تمرینات ورزشی و همچنین مداخله تمرینات ورزشی مشاهده می شود (15). لازم به ذکر است که در این پژوهش NCX بررسی نشده است، در صورتی که می تواند یکی از متغیرهای مهم در پژوهش های آینده باشد. مطالعات بالینی و همچنین تجربی نشان داده اند برنامه تمرینی یکی از مؤثرترین راهبردهای کاهش پیشرفت کاردیومیوپاتی و کاهش دهنده بروز عوارض قلبی عروقی و مرگ و میرهای ناشی از بیماری است. فعالیت ورزشی می تواند فرایندهای نقصان پذیر ناشی از این نقیصه را جبران کند. نتایج نشان داد که بین گروه های مختلف در میزان پلاسمای PI3K تفاوت معناداری وجود دارد. میزان غلظت PI3K در گروه تمرین تناوبی و تداومی افزایش معناداری به نسبت گروه کنترل (p=0.001) داشت. همچنین نتایج نشان داد که میزان غلظت PI3K بین گروه های تناوبی و تداومی تفاوت معناداری وجود ندارد. PI3K در ایجاد محافظت قلبی حاصل از فعالیت ورزشی اثر مثبت و معناداری دارد. در واقع در گروهی که تمرین ورزشی نداشته اند این میزان تغییری نداشته است. افزایش ترشح PI3K در پی فعالیت ورزشی می تواند به بهبود عملکرد قلب منتهی شود. در پژوهش حاضر هم در گروه تمرین تداومی و هم در گروه تمرین تناوبی شدید افزایش داشته است. اما این افزایش منجر به ایجاد تفاوت معنادار نشده است. نتایج پژوهش حاضر با نتایج پژوهش Natan و همکاران (2012) موافق و همسوست (16). نقش ضروری مسیر سیگنال دهی IGF1/PI3K/AKT در ایجاد اثرات محافظتی بر قلب با افزایش فعالیت تلومراس میوکاردیت در پی افزایش IGF-1 و تنظیم هموستاز و بیان ژن های هایپرتروفی دهنده قلب بوسیله افزایش بیان پروتئین AKT وجود دارد (6). تمرین

1. Mammalian target of rapamycin
2. Mitogen-activated protein kinase
3. The nuclear protooncogenes

نتیجه گیری

اختلال در تعادل بین فعالیت متالوپروتئینازها و مهارکننده‌های آنها، اختلال در کارکرد نظم کلسیم و عوامل درگیر در ساختار قلبی منجر به بروز مشکلات پاتولوژیک در افراد عادی می‌شود، به طوریکه افزایش فعالیت آنها به تخریب بافتی و افزایش مهارکننده‌های آنها موجب فیبروز می‌گردد. همچنین تنظیم سلولی ملکولی عملکرد و ساختار سلولی به تنظیم صحیح پیام‌رسان‌های سلولی و محرک‌های مستقیم و غیر مستقیم دارد. به نظر می‌رسد فعالیت ورزشی می‌تواند یکی از این تنظیم‌کننده‌ها باشد که البته نقش شدت تمرین نیز مهم می‌باشد. با توجه به یافته‌های پژوهش حاضر شدت تمرین بالاتر می‌تواند تنظیم سلولی و ملکولی را بهتر انجام دهد که نیاز به تحقیقات بیشتری در آینده دارد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مدیریت محترم تمامی مسئولین و کارشناسان آزمایشگاه مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران و سایر کسانی که ما را در انجام مطلوب این پژوهش یاری دادند؛ سپاسگزار می‌نماییم. این مقاله از رساله دکتری مصطفی ستم دیده استخراج شده است.

تعارض منافع

تعارض منافع وجود ندارد.

فاکتور رشد تبدیل-بتا یک ($\beta 1$ -TGF) در موشهای دیابتی پرداختند. نتایج پژوهش آنها نشان داد که ورزش شنا می‌تواند در موش‌های دیابتی منجر به کاهش معنادار $\beta 1$ -TGF شود. از دلایل احتمالی اختلاف نتایج پژوهش حاضر احتمالاً به نوع آزمودنی‌ها برگردد. در پژوهشهای ذکر شده از موش‌های بیمار استفاده شده بود، در صورتی که در پژوهش حاضر از موش‌های سالم به عنوان نمونه استفاده شده است. نتایج در رابطه با فاکتور رشد بتا نشان داد که در هر دو گروه مداخله ورزشی این افزایش معنادار است. عامل رشدی تغییر شکل بتا، سایتوکاینی چند عملکردی است که نقش مهمی در جابجایی، تکثیر، تمایز، مرگ سلولی و تولید پروتئین‌های ECM دارد و محرک قوی سنتز کلاژن است. همچنین، سنتز کلاژن را با افزایش ترجمه آن و کاهش تجزیه کلاژن را با کاهش Mmps و افزایش Timps میانجی‌گری می‌کند، بنابراین، تراکم ECM به ویژه کلاژن را افزایش می‌دهد. فعالیت ورزشی با بار فشار متابولیکی و مکانیکی بالا (همانند تمرینات تناوبی شدید) می‌تواند، سنتز β -TGF ماهیچه‌های صاف، ماهیچه‌های اسکلتی و جریان خون را به عنوان یک پاسخ فیزیولوژیایی در قلب تحریک کند (۸). فعالیت $\beta 1$ -TGF با ترشح از مجموعه‌ای پروتئینی متصل به β -TGF، توسط پروتئین‌ها صورت می‌گیرد. آبتار با اتصال $\beta 1$ -TGF با گیرنده نوع II خودش ($\text{T}\beta\text{RII}$) شروع می‌شود. و مجموعه $\text{T}\beta\text{RI}$ - $\text{T}\beta\text{RII}$ شکل می‌گیرد. با فسفریله کردن Smad2/3^۱ و اضافه شدن Smad4 به مجموعه وارد هسته و جایگاه تنظیم رونویسی ژن می‌شود. Smad7 به عنوان یک پروتئین مهارکننده این مسیر می‌باشد. در مسیر غیروابسته، MAPK توسط مسیر $\text{Ras}^{\text{G}}\text{-RaF}^{\text{G}}\text{-MEK}^{\text{E}}\text{-ERK}^{\text{O}}$ و کیناز-۱ فعال شده با β -TGF (TAK1) توسط پروتئین ۱ متصل به TAK1-TAK1 ، (TAB1) مجموعه‌ای را تشکیل می‌دهد، فعالیت TAK1 با مسیرهای MKK4 - JNK - AP-1 و MKK3-p38 ATF2^{I} و $\text{NF-K}\beta^{\text{V}}$ پاسخ پیش فیبروز شدن را میانجی‌گری می‌کند (۱۷).

1. Mothers Against Decapentaplegic

2. Rat sarcoma virus

3. Rapidly accelerated fibrosarcoma

4. Mitogen-activated protein kinase

5. Extracellular signal-regulated kinase

6. Activating transcription factor 2

7. Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

1. Dhondup Y, Sjaastad, I, Scott H, Sandanger, Zhang, L. Sustained Toll-Like Receptor 9 Activation Promotes Systemic and Cardiac Inflammation, and Aggravates Diastolic Heart Failure in SERCA2a KO Mice. *PloS One* 2015;10(10):e0139715.
2. Zhao G, Li T, Brochet DX, Rosenberg PB, Lederer WJ. STIM1 enhances SR Ca²⁺ content through binding phospholamban in rat ventricular myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2015;112(34):E4792-801. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423295112>
3. Santoso NG, Cebotaru L, Guggino WB. Polycystin-1, 2, and STIM1 interact with IP3R to modulate ER Ca²⁺ release through the PI3K/Akt pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry* 2011;27(6):715-26. <https://doi.org/10.1159/000330080>
4. Flück M, Ziemiecki A, Billeter R, Müntener M. Fibre-type specific concentration of focal adhesion kinase at the sarcolemma: influence of fibre innervation and regeneration. *Journal of Experimental Biology* 2002;205(16):2337-48. <https://doi.org/10.1242/jeb.205.16.2337>
5. Nordlie M, Wold L, Kloner R. Genetic contributors toward increased risk for ischemic heart disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2005;39(4):667-79. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2005.06.006>
6. Lu K, Wang L, Wang C, Yang Y, Hu D, Ding R. Effects of high-intensity interval versus continuous moderate intensity aerobic exercise on apoptosis, oxidative stress and metabolism of the infarcted myocardium in a rat model. *Molecular Medicine Reports* 2015;12(2):2374-82. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3669>
7. Gharaat MA, Kashef M, Jameie B, Rajabi H. Effect of endurance and high intensity interval swimming training on cardiac structure and Hand2 expression of rats. *Shahid Sadoughi University of Medical Sciences* 2017;25(9):748-58.
8. Wisloff U, Loennechen J, Currie S, Smith G, Ellingsen O. Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca²⁺-sensitivity and SERCA2 in rat after myocardial infarction. *International Cardiovascular Research* 2002;54:162-174. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(01\)00565-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(01)00565-X)
9. Golbashi R, Gaeini A, Kordi MR, Aboutaleb N, Ghardashi Afousi A. Effect of one period of high-intensity interval training on myocardial collagen-1 and TGF- β 1 and cardiac function in post ischemia-reperfusion rats. *Daneshvar Medicine* 2018;25(135):65-74.
10. Rognmo O, Moholdt T, Bakken H, Hole T, Molstad P, Myhr N and et al. Cardiovascular risk of high - versus moderate -intensity aerobic exercise in coronary heart disease patients. *Circulation* 2012; 126 (12): 1436-1440.

11. Kemi J, Ellingsen O, Ceci M, Grimaldi S, Smith G, Condorelli G and et al. Aerobic interval training enhances cardiomyocyte contractility and Ca²⁺ cycling by phosphorylation of CaMKII and Thr-17 of phospholamban. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2007;43:354-361. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2007.06.013>
12. Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen Ø. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation* 2007;14(6):753-60. <https://doi.org/10.1097/HJR.0b013e3281eacef1>
13. Wisløff U, Loennechen JP, Currie S, Smith GL, Ellingsen Ø. Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca²⁺ sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction. *Cardiovascular Research* 2002;54(1):162-74. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(01\)00565-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(01)00565-X)
14. Jessup M, Greenberg B, Mancini D, Cappola T, Pauly DF, Jaski B, et al. Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in cardiac disease (cupid) clinical perspective. *Circulation* 2011;124(3):304-13. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.022889>
15. Jorge, L. Rodrigues, B. Rosa, K. Cardiac and peripheral adjustments induced by early exercise training intervention were associated with autonomic improvement in infarcted rats: role in functional capacity and mortality. *European Heart Journal* 2010 ehq244. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehq244>
16. Natan DA SILVA JR, Fernandes T, Soci UP, Monteiro AW, Phillips MI, et al. Swimming training in rats increases cardiac MicroRNA-126 expression and angiogenesis. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 2012;44(8):1453-62. doi: 10.1249/mss.0b013e31824e8a36
17. Tao L, Bei Y, Zhang H, Xiao J, Li X. Exercise for the heart: signaling pathways. *Oncotarget* 2015;6(25):20773. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4770>
18. Hyo- B. Aging, exercise, and extracellular matrix in the heart. *Journal of Exercise Rehabilitation* 2013;9(3):338-347. doi: 10.12965/jer.130049
19. Habibian M, Saghafi M, Farzanegi P. The effect of regular swimming exercise on the levels of renal matrix metalloproteinase-2 and transforming growth factor- β 1 in rats with diabetes 2016;23(4):446-456.
20. Fathi M. The effect of endurance exercise on myh6 gene expression and structural and functional changes of left ventricular. *Qom University of Medical Sciences Journal* 2016;9(11): 22-32.