حرکت
شمارهٔ ۱۸ - ص ص : ۱۱۵ - ۹۷
تاریخ دریافت : ۸۲/۰۴/۲۶
تاریخ تصویب: ۸۲/۰۸/۰۳

تأثیر تمرینات هوازی با شدت‌های مختلف بر حذف mtDNA عضله نعلی موش‌های صحرایی

دکتر افشار جعفری[1] - *دکتر محمدعلی حسین پورفیضی* - *دکتر مسعود هوشمند* - *دکتر علی‌اصغر رواسی* - *مریم منتظری*

استادیار دانشگاه تبریز - استادیار دانشگاه تبریز - استادیار مرکز ملی تحقیقات ژنتیک و تکنولوژی زیستی - استادیار دانشگاه تهران - مربی مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی

چکیده

باتوجه به نظریهٔ پیری میتوکندریایی و افزایش استرس اکسیداتیو حین فعالیت‌های هوازی، فرض شد که این نوع تمرینات ممکن است در بروز حذف mtDNA عضلات اسکلتی و پیری زودرس دخالت داشته باشد. بدین منظور ۶۰ سر موش صحرایی (wistar 14848) نر دوماهه در شش گروه ده تایی جایگزین شدند. برای کنترل عوامل مداخله‌گر، دو گروه از آزمودنی‌ها در دوماهگی (con_1) و پنج‌ماهگی (con_2) کشته شدند. دو گروه نیز در یک برنامهٔ تمرینی سه‌ماهه (پنج روز در هفته دویدن روی نوار گردان الکتریکی با شیب ۶ درصد) (E_{20}=20m/min, 40min, E_{40}=40m/min, 20min) شرکت داشتند. در انتهای دوره، دو گروه به عنوان آزمودنی‌های تمرین‌نکرده در پنج‌ماهگی، فقط برای یک‌بار روی نوار گردان دویدند (CE_{20}=20m/min, 40min, CE_{40}=40m/min, 20min, slob=6%). یافته‌های حاصله از روش‌های Multiplex PCR و توالی‌خوانی نشان می‌دهد تمرینات هوازی شدید می‌تواند سبب بروز حذف ۴/۶ کیلوبازی در mtDNA عضلهٔ نعلی شود.

واژه‌های کلیدی

تمرینات هوازی، استرس اکسیداتیو، پیری، ژنوم میتوکندریایی (mtDNA) وحذف‌های میتوکندریایی.

1- Email : afsharjafari@hotmail. com

مقدمه

یکی از چالش‌هایی که از دیرباز ذهن بیشتر دانشمندان علوم بیولوژی مولکولی را به خود مشغول ساخته، پیری و بیماری‌های مربوط به آن است. اهمیت این مسئله در سطح جهانی به حدی است که سازمان یونسکو هزارهٔ سوم را هزارهٔ پیری معرفی کرده است.

افت شدید توانایی‌های فیزیولوژیکی، مکانیکی و افزایش بیماری‌های استحاله‌ای دوران سالخوردگی، از عمده‌ترین مسایل مربوط به فرایند پیری بشمار می‌روند، زیرا چالش فوق، در بالا رفتن هزینه‌های نگهداری و درمان دستگاه‌های دولتی، خانواده‌ها و خود فرد دخالت اساسی دارند و موجب از کارافتادگی و منزوی شدن فرد سالخورده می‌شوند.

تغییرات ایجاد شده در هوموستاز موجودات مسن، احتمالاً در نتیجهٔ برنامه‌های ژنتیکی و تحت تأثیر پاسخ عوامل برون‌زاد رخ خواهد داد. با این حال، براساس نظریه‌های رویدادهای اتفاقی، پیری در نتیجهٔ آسیب‌های اتفاقی در مولکول‌های حیاتی رخ می‌دهد. در واقع، تجمع آسیب‌های ناشی از بالا رفتن سن می‌تواند در افت عملکردهای فیزیولوژیکی و فرایند پیری دخالت اساسی داشته باشد (۱، ۲، ۳، ۶، ۱۵ و ۲۲).

نظریهٔ پیری بنیان‌های آزاد هارمان[1] به این نکته اشاره دارد که تولید درون‌زادگونه‌های فعال اکسیژن (*ROS*)[2] در موجودات هوازی با برهم زدن تعادل اکسیدانی / آنتی اکسیدانی سبب بروز تغییرات عمده در بیشتر مولکول‌های زیستی از جمله *DNA* هسته‌ای و میتوکندریایی می‌شود (۲۵ و ۳۶).

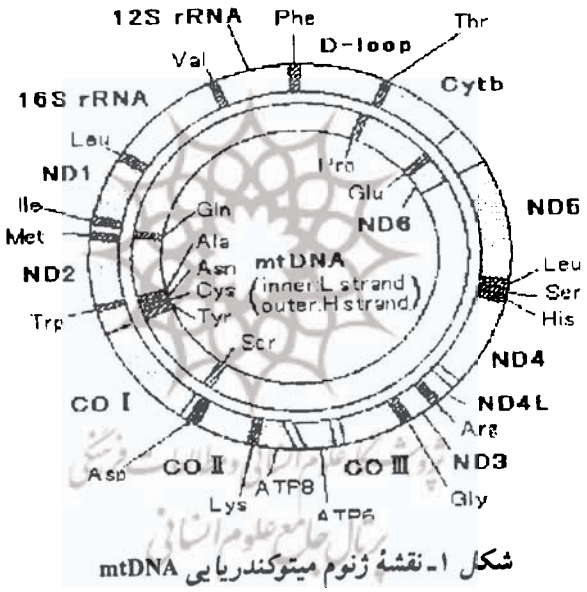
ژنوم میتوکندری، یک *DNA* فوق کروموزومی و حلقوی است. در هر سلول هسته‌دار انسانی، هزاران نسخهٔ *DNA* میتوکندریایی (۳ الی ۱۰ مولکول در هر میتوکندری) وجود دارد. سهم این مولکول از کل *DNA* سلولی، در حدود نیم درصد است. ژنوم میتوکندری یا *mtDNA* انسانی، یک مولکول حلقوی دو رشته‌ای با ۱۶۵۶۹ جفت باز آلی (*bp*)[3] است. رشته‌های

1- Harman

2- Reactive Oxygen Species

3- Base pair

حلقوی این ژنوم از لحاظ ترکیب بازهای آلی متفاوتند. رشتهٔ خارجی و سنگین[1] غنی از بازهای آلی پورین، یعنی آدنین و گوانین ($A+G$)، در حالی که رشتهٔ داخلی و سبک[2] بیشتر محتوی بازهای آلی پریمیدین، یعنی سیتوزین و تیمین ($C+T$) است. ژن‌های کدکنندهٔ پلی‌پپتیدهای میتوکندریایی، از جمله ۱۳ زیرگروه زنجیرهٔ تنفسی، دو ژن خاص *rRNAs* (*rRNAs, 12s,16s*) و ۲۲ ژن *tRNAs* ضروری برای سنتز پروتئین‌های میتوکندریایی، ۹۳٪ ساختار *mtDNA* را به خود اختصاص داده‌اند (شکل ۱)(۱۶).



شکل ۱ـ نقشهٔ ژنوم میتوکندریایی mtDNA

در اثر واکنش اکسیژن با بیومولکول‌های جانداران هوازی، بنیان‌هایی مانند سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و هیدروکسیل ساخته می‌شود (۹). حدود ۲-۵ درصد اکسیژن مصرفی طی فرایندهای زنجیرهٔ تنفسی به صورت فعال به بنیان‌های آزاد سوپراکسید تبدیل می‌شود. بنیان سوپر اکسید تقریباً در تمام سلول‌های هوازی ساخته می‌شود. عمده‌ترین منبع تولید این بنیان،

1- Heavy chain or H

2- Light chain or L

در زنجیرهٔ تنفسی و شبکهٔ آندوپلاسمی قرار دارد (۸). طی واکنش دسموتاز سوپراکسید، مولکول‌های اکسیژن و بنیان پراکسید هیدروژن آزاد می‌شود (۸و ۱۱). مولکول پراکسید هیدروژن خیلی فعال نیست، لیکن می‌تواند به گونهٔ خیلی فعال (هیدروکسیل) تبدیل شود. اگر پراکسید هیدروژن با یون‌های آهن موجود در بدن جانداران واکنش دهد، محصول نهایی بنیان هیدروکسیل خواهد بود (۳۰). بنیان هیدروکسیل از قدرت خیلی زیادی برخوردار است (۲۸). همهٔ عناصر فعال بویژه هیدروکسیل، می‌تواند آسیب‌های اکسیداتیو را به صورت پراکسیداسیون فسفولیپیدهای غشایی، بروز تغییرات اسید دزواکسی ریبونوکلئیک، یا تغییرات پروتئینی ناشی از تغییرات آنزیمی و پروتئولیزی، ایجاد کند (۱۲، ۲۹ و ۳۱). اما آسیب‌های وارد به بیومولکول‌ها از ویژگی خاصی برخوردارند. محل آسیب‌های مولکولی، به ویژگی ساختار پیوندهای بین یون‌های آهن یا مس و ماکرومولکول‌ها وابسته است (۲۱ و ۳۲). برای مثال تولید بیش از حد بنیان هیدروکسیل در کنار *DNA*، می‌تواند موجب تغییر بازهای آلی و شکسته شدن رشته‌های *DNA* شود (۱۹). مولکول *DNA* تحت تأثیر گونه‌های فعال اکسیژن،، اکسید می‌شود، از این‌رو می‌توان با استفاده از نسبت ۸- هیدروکسی ۲-دی اکسی گوانوزین به ۲ دی اکسی گوانوزین (*8-ohdg/dg*)، میزان *DNA* اکسیدشده را برآورد کرد.

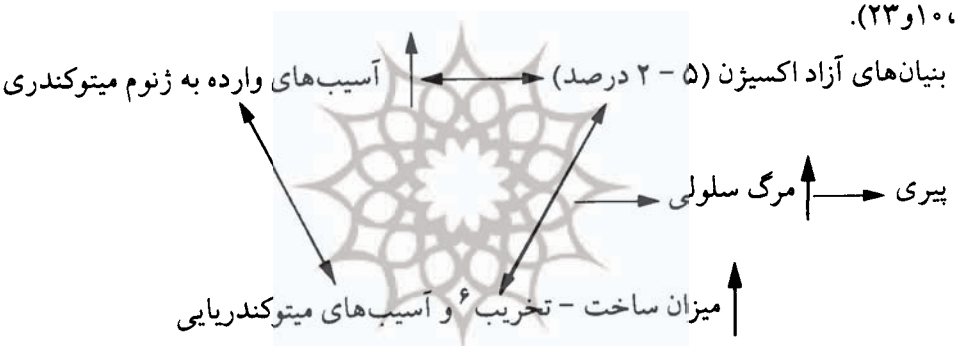
با مطالعهٔ *mtDNA* بافت‌های مختلف موش‌های صحرایی و خانگی، مشخص شد میزان *oxo8dG* با بالا رفتن سن افزایش می‌یابد (۱۳). گروه تحقیقاتی آمز[1]، میزان *oxo8dG* ژنوم میتوکندریایی (*mtDNA*) کبد موش‌های صحرایی نر پیر را در حدود ۳-۲ برابر همتایان جوان گزارش کرده‌اند (۱)، درحالی که مشاهدات گروه همیلتون[2] نشان داد میزان *oxo8dG* در *mtDNA* بافت کبدی موش‌های صحرایی تقریباً ۵۰ تا ۱۲۴ درصد بیشتر از همتایان جوان است (۱۳). بررسی وضعیت استرس اکسیداتیو با استفاده از میزان *oxo8dG* میتوکندریایی، فقط یک روش تخمینی است. از این‌رو برای تشخیص و تعیین دقیق میزان آسیب‌ها و جهش‌های *mtDNA* باید از روش‌های مولکولی معتبر *PCR*[3]، *RFLP*[4]، *SSCP*[5]، توالی‌خوانی[6]، و

1- Ames

2- Hamilton

3- Polymerase Chain Reaction

RFLP[1]، *SSCP*[2]، توالی‌خوانی[3]، و لکه‌گذاری ساترن[4] استفاده کرد. حذف معمولی $mtDNA_{4977}$[5]، از جمله جهش‌های شناخته شده‌ای است که با بالا رفتن سن در بیشتر بافت‌های پیکری انسان تجمع پیدا می‌کند. تجمع این جهش می‌تواند بر واکنش‌های فسفریلاسیون اکسیداتیو و افت میزان *ATP* تأثیر بسزایی بگذارد. از طرفی، کاهش مداوم تأمین انرژی بر عملکردهای سلول، آسیب وارد کرده و موجب افزایش بروز بیماری‌های مختلف و در نهایت بالا رفتن مرگ و میر می‌شود (شکل ۲) (۷،۱۸،۲۸و۳۵). در برخی مطالعات، میزان جهش *mtDNA* را در حدود ۱۰ برابر *nDNA* گزارش کرده‌اند. دلیل عمدهٔ این مطلب به میزان مصرف اکسیژن در میتوکندری (بیش از ۹۰ درصد اکسیژن سلولی)، ساز و کارهای ناکارامد ترمیمی *mtDNA* و مجاورت غشای میتوکندریایی با گونه‌های فعال اکسیژن برمی‌گردد (۴، ۱۰و۲۳).



شکل ۲ - تعامل بین بنیان‌های آزاد و DNA میتوکندریایی

تولید بنیان‌های آزاد در عضلات اسکلتی، حین انجام فعالیت‌های بدنی، نسبت به هنگام

1- Random Fragment Length Polymorphism

2- Single Stranded Conformation Polymorphism

3- Sequencing

4- Southern blotting

۵- Common deletion - حذف ۴۹۷۷ جفت بازی است که معمولاً با بالا رفتن سن در *mtDNA* اکثر بافت‌های انسان، بخصوص بافت‌های پیکری، دیده می‌شود.

6- Turn-over

استراحت بدلیل افزایش ۱۰۰ برابری مصرف اکسیژن، خیلی بیشتر است (۲۰). علاوه بر تنفس میتوکندریایی، واکنش‌های انتین اکسیداز، سوخت و ساز پروستانوئیدی و فعالیت اکسیدازی نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید فسفات[1]، به‌عنوان منابع اصلی تولید بنیان‌های آزاد در حین فعالیت‌های ورزشی می‌توانند عمل کنند. افزایش فرایندهای ریزه‌خواری گلبول‌های سفید پس از آسیب‌های عضلانی، به‌عنوان منبع فرعی در تولید بنیان‌های آزاد دخالت خواهد داشت. با این حال، فعالیت‌های بدنی مشخص ممکن است بر میزان تولید بنیان‌های آزاد، اثرهای متفاوتی بر جای بگذارند. فعالیت بنیان‌های آزاد و بویژه گونه‌های فعال اکسیژن در عضلات اسکلتی، باتوجه به عواملی چون شدت، مدت و نوع فعالیت بدنی یا نوع انقباض، متفاوت است. به عبارتی، نیازمندی‌های متفاوت انرژی، اکسیژن مصرفی و بارهای مکانیکی وارد به بافت‌های نرم درگیر در انواع فعالیت‌های بدنی بر میزان تولید بنیان‌های آزاد تأثیر می‌گذارند. از این‌رو می‌توان نتیجه گرفت فعالیت‌های بدنی به‌عنوان یکی از منابع اصلی تولید بنیان‌های آزاد، ممکن است در بروز استرس اکسیداتیو دخالت اساسی داشته باشد (۲۶). البته نباید فراموش کرد که تعامل بین سه مؤلفهٔ استرس اکسیداتیو (اکسیدان‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها و فرایندهای ترمیمی) به‌صورت بازخوردهای مثبت و منفی، تعیین‌کنندهٔ اصلی میزان صدمات اکسیداتیو و در نهایت پیری و بیماری‌های مربوط به آن خواهد بود (۵، ۱۴ و ۳۳). باتوجه به موضوع تحقیق و آنچه گفته شد، سؤالات قابل طرح عبارتند از: فعالیت‌های ورزشی هوازی چه تأثیری بر تجمع صدمات *mtDNA* از جمله حذف معمولی به‌عنوان یکی از شاخص‌های اصلی روند پیری دارد؟ آیا یک وهله فعالیت ورزشی هوازی با شدت‌های مختلف می‌تواند سبب بروز جهش در *mtDNA* شود؟ در صورت وقوع جهش در *mtDNA* چه تفاوتی بین آثار فعالیت ورزشی هوازی شدید و متوسط وجود دارد؟ آیا تمرینات ورزشی منظم می‌تواند از بروز جهش در *mtDNA* جلوگیری کند؟ در صورت مثبت بودن پاسخ، کدامیک از تمرینات هوازی می‌تواند در کاهش جهش *mtDNA* دخالت اساسی داشته باشد؟

تا هنگام شروع تحقیق حاضر، هیچ‌گونه گزارشی دربارهٔ آسیب‌های اکسیداتیو وارد به

1- NADPH

نشده بود. ساکایی و همکارانش[1] (۱۹۹۹) برای اولین بار دریافتند افزایش استرس اکسیداتیو ناشی از اجرای یک وهله فعالیت هوازی شدید، موجب جهش *mtDNA* عضلات اسکلتی موش‌های صحرایی می‌شود. این گروه تحقیقاتی برای تأیید فرضیهٔ خود از دو گروه موش صحرایی (گروه آزمون = ۴، و گروه کنترل = ۵) استفاده کردند.

برنامهٔ فعالیت بدنی برای گروه آزمون شامل دویدن به مدت ۲۰ دقیقه روی نوار گردان با شدت حدود ۴۰ متر در دقیقه بود. پس از بررسی یافته‌های بدست آمده از *PCR*، آن‌ها دریافتند یک وهله فعالیت بدنی می‌تواند سبب بروز حذف‌های بزرگ میتوکندریایی (۷۰۲۵*bp*) در عضلهٔ نعلی شود، اما هیچ‌گونه گزارشی دربارهٔ بروز جهش در *mtDNA* عضلهٔ درشت نی قدامی ارایه ندادند. در نهایت، نتیجه‌گیری کردند که فعالیت‌های بدنی شدید می‌تواند در بروز حذف‌های بزرگ میتوکندریایی دخالت داشته باشد، اما در مورد آسیب‌های اکسیداتیو *mtDNA* باید ویژگی تارهای عضلانی را نیز در نظر گرفت (۲۷).

گروه تحقیقاتی ای وایی[2] (۲۰۰۳) نیز با بررسی *mtDNA* گلبول‌های سفید خون پنج زن جوان سالم (با میانگین سنی ۲، ۲۰ سال) دریافتند ۳۰ دقیقه دوچرخه‌سواری با شدت ۶۰-۵۰ وات و سرعت پدال‌زنی ۶۰ دور در دقیقه برای سه روز متوالی موجب بروز حذف معمولی (۴۹۷۷) در *mtDNA* گلبول‌های سفید آزمودنی‌های فوق می‌شود. حذف مشاهده‌شده پس از ۲-۴ روز ناپدید و ۵-۶ روز پس از آخرین وهلهٔ فعالیت مجدداً آشکار شد. توجیه آنها برای ناپدید شدن حذف *mtDNA* در ۲-۴ روز پس از فعالیت بدنی، با توجه به ضعف سیستم ترمیمی میتوکندریایی به فعالیت آنزیم تخریب کننده[3] مرتبط دانستند. اما برای ظهور مجدد حذف *mtDNA* هیچ‌گونه توجیهی ارائه ندادند. بنابراین نتیجه گرفتند که حذف *mtDNA*۴۹۷۷ در گلبول‌های سفید خون، روندی پویا[4]ست (۱۷). گروه تحقیقاتی هالر[5] با

1- Sakai
2- Iwai
3- Decomposition Enzyme
4- Dynamic
5- Haller

دریافت پروژه تعویض ژن میتوکندریایی[1] ، تلاش کردند تا با کمک تمرینات قدرتی، به روش تازه‌ای برای درمان بیماران میتوکندریایی دست پیدا کنند. این گروه تحقیقاتی با بررسی آثار تمرینات هوازی روی ۱۰ فرد مبتلا به بیماری‌های میتوکندریایی پس از ۱۴ هفته اعلام کردند سهم *mtDNA* جهش‌یافته در شش نفر از شرکت کنندگان تحت بررسی، افزایش پیدا کرد (۳۴). با این حال، توصیهٔ گروه هالر به این صورت نبوده که بیماران میوپاتی میتوکندریایی، به‌هیچ‌وجه فعالیت بدنی نداشته باشند، زیرا وضعیت این بیماران با عدم تحرک بدتر خواهد شد (شکل ۳).

شکل ۳- تأثیر تمرینات هوازی در بدتر شدن وضعیت میوپاتی میتوکندریایی
(خاکستری = سالم و سیاه = جهش یافته)

از سوی دیگر باتوجه به بالا بودن سهم *mtDNA* سالم در سلول‌های ماهواره‌ای بیماران مبتلا به میوپاتی میتوکندریایی، این گروه تحقیقاتی فرضیهٔ تازه‌ای را ارائه کردند، مبنی بر اینکه سهم ژنوم میتوکندریایی سالم در اثر تمرینات قدرتی با تحریک سلول‌های ماهواره‌ای و بیوژنز میتوکندریایی، افزایش می‌یابد. از این‌رو، با استفاده از یک برنامهٔ ۱۰ هفته‌ای تمرینات قدرتی یک‌طرفه در شش بیمار مبتلا به نقص عملکرد میتوکندریایی (که سهم *mtDNA* سالم در آن‌ها

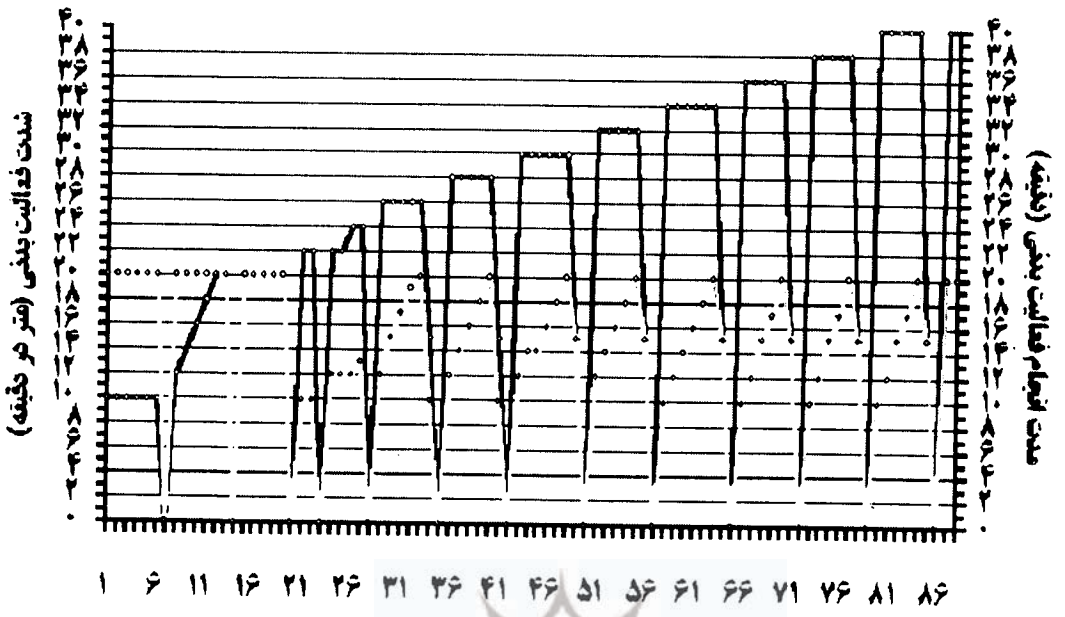
1- Mitochondrial Gene Shifting

بیشتر بود) و چهار بیمار مبتلا به جهش‌های نقطه‌ای ارثی مادرزادی (با سهم ۵۰ درصدی *mtDNA* جهش‌یافته) فرضیهٔ خود را بررسی کردند. آن‌ها براساس یافته‌های به دست آمده نتیجه گرفتند تمرینات قدرتی علاوه بر توسعهٔ قدرت جسمانی، با تحریک ساز و کار درگیر در بیوژنز میتوکندریایی سلول‌های ماهواره‌ای و انتقال *mtDNA* سالم به درون تارهای موجود، می‌تواند در توسعهٔ عملکرد میتوکندریایی افراد مبتلا به جهش‌های خود به خودی نقش مهمی را ایفا کند (۳۴).

باتوجه به نبود اطلاعات کافی در مورد نقش استرس اکسیداتیو (حین فعالیت‌های بدنی) در بروز آسیب‌های *mtDNA* و همچنین اهمیت آن در بروز فرایند پیری، تصمیم بر آن شد تا تأثیر فعالیت‌های هوازی مختلف روی جهش‌های *mtDNA* مورد مطالعه قرار بگیرد.

روش تحقیق

در مطالعهٔ حاضر ۶۰ سر موش صحرایی $Wistar_{14848}$ دو ماههٔ نر انتخاب و به‌صورت تصادفی در شش گروه مختلف جایگزین شدند. برای کنترل عوامل و شاخص‌های فیزیولوژیکی پایه، ۱۰ سر در قالب گروه Con_1 در دوماهگی کشته شدند. دو گروه ۱۰ تایی از آزمودنی‌ها در دو برنامهٔ تمرینی مختلف (برنامهٔ سه ماهه، پنج جلسه در هفته) شرکت داشتند. برنامهٔ تمرینی این دو گروه با شدت ۱۰ متر در دقیقه و مدت ثابت ۲۰ دقیقه (دویدن روی نوارگردان الکتریکی با شیب ۶ درجه) شروع شد (شیب دستگاه تا انتهای برنامه ثابت بود). برنامهٔ تمرینی این دو گروه تا رسیدن به شدت ۲۰ متر در دقیقه (انتهای هفتهٔ سوم) مشابه بود. پس از آن هریک از گروه‌ها در برنامه‌های خاص خود تمرین داده می‌شدند. شدت برنامهٔ گروه E_{20} تا پایان دورهٔ تمرین ثابت بود، اما مدت فعالیت این گروه بنابر برنامهٔ تعیین شده به‌تدریج به حدود ۴۰ دقیقه رسید . درحالی‌که آزمودنی‌های گروه E_{40} با پیروی از برنامهٔ خود توانستند در انتهای دوره شدت فعالیت دویدن ۴۰ متر در دقیقه را برای ۲۰ دقیقه تحمل کنند (افزایش ۲ متر در دقیقه در هر هفته) (شکل ۴).



شکل ۴- برنامهٔ سه‌ماههٔ تمرینات بدنی موش‌های صحرایی گروه E_{40} و E_{20} هنگامی‌که خطوط سیاه رنگ به‌عنوان فعالیت در نظر گرفته شود، خطوط خاکستری معرف مدت فعالیت‌بندی خواهد بود و برعکس.

سایر آزمودنی‌ها به صورت تصادفی در سه گروه غیرفعال جایگزین شدند. آزمودنی‌های گروه Con_2 برای کنترل شرایط نگهداری در ۵ ماهگی کشته شدند. دو دسته از سه گروه فوق در انتهای دوره فقط برای یک‌بار روی نوارگردان دویدند. شدت فعالیت گروه CE_{20} مشابه گروه E_{20} بود، درحالی که آزمودنی‌های گروه CE_{40} با شدت ۴۰متر در دقیقه روی نوارگردان دویدند. پس از جراحی کلیهٔ آزمودنی‌ها و برداشت عضلهٔ اسکلتی نعلی به‌عنوان بافت پیکری غیرقابل تقسیم، آزمایش‌های مولکولی انجام شد.

حیوانات مورد آزمایش در این تحقیق نیز در قفس‌های پلی کربنات نگهداری شدند. دمای مطلوب سالن نگهداری حیوانات در حدود ۲۴-۲۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی نیز در حدود ۶۰-۵۵ درصد کنترل می‌شد. در این تحقیق سعی شد تا میزان نوردهی به صورت ۱۲-۱۲ ساعت رعایت شود.

برای تغذیهٔ آزمودنی‌ها، روزانه ۱۰۰ گرم پلت[1] همراه با یک بطری ۵۰۰ میلی‌لیتری آب در اختیار هر قفس (۵ سر موش صحرایی نر، بالغ دو ماهه با میانگین وزن ۲۰۰ گرم) قرار داده می‌شد که با افزایش وزن حیوانات به مرور زمان به میزان غذای آن‌ها افزوده می‌شد.

در تحقیق حاضر برای تشخیص و تعیین میزان جهش *mtDNA* عضلات اسکلتی از روش‌های *Multiplex PCR* و توالی‌خوانی و برای بررسی محصولات *Multiplex PCR* از ژل آگارز دو درصد استفاده شد. واکنش *Multiplex PCR* به صورت زیر تهیه شد:

Taq 0.5u	OMSO	ONP_{f1} 10 pmol/μl	ONP_{12}10 10 pmol/μl	ONP_{R1} 10 pmol/μl	ONP_{R2} 10 pmol/μl	DNA 50 ng/μl	dNTP 10 mmol	PCR buffer10x +Mgcl2	H_2O
1 μl	1.3 μl	0.7 μl	1 μl	0.7 μl	1 μl	1 μl	0.5μl	2.5μl	15.3μl

در واکنش *Multiplex* از پرایمرهای *L4395* و *H5164* به‌عنوان کنترل داخلی و پرایمرهای *Rat.L7454* و *Rat.H12946* برای تشخیص حذف معمولی *mtDNA* استفاده شد.

نام آغازگر	موقعیت نوکلئوتیدی	توالی آغازگر
$L4395_{f1}$	4395-4418	5'-AGGACTTAACCAGACGCCAAACACG-3'
$H5164_{R1}$	5164-5145	5'-CCTCTTTTCTGATAGGCGGG-3'
$Rat.L7454_{f2}$	7454-7475	5'-CATCCGAAGACGTCCTGCACTC-3'
$Rat.H12946_{R2}$	12946-12925	5'-AGGGCTCAGGCGTTGGTGTTAC-3'

برنامهٔ *Multiplex PCR* به‌صورت ذیل انجام شد:

1- Pellet

واسرشتی[1] اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه

تعداد چرخه‌ها[2] ۳۵ دور
- واسرشتی ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه
- اتصال[3] ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه
- طویل شدن[4] ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه

طویل شدن نهایی ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه

توالی نمونه‌های *mtDNA* به روش خودکار[5] تعیین شد. برای کنترل شرایط تحقیق، برخی از پارامترهای فیزیکی اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری حجم قلب با استفاده از تغییرات حجم جابه‌جا شده (سرم فیزیولوژیکی) حین غوطه‌ور کردن این اندام در دستگاه اندازه‌گیر، انجام شد. در بررسی متغیرهای فوق از آزمون‌های (آنالیز واریانس)[6] و کروسکال والیس[7] استفاده شد.

نتایج و یافته‌های تحقیق

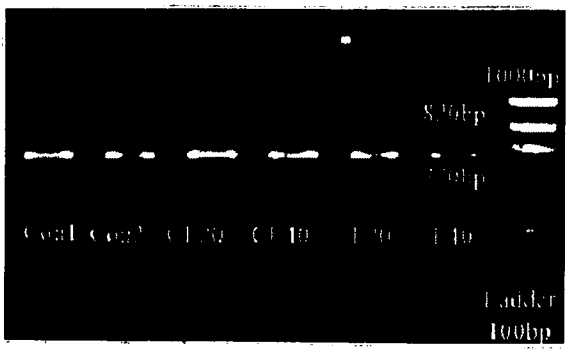
تفاوت‌های مشاهده شده در متغیرهای کنترل، به این نکته اشاره دارد که استقامت قلبی - عروقی هر دو گروه تمرین‌کرده (E_{40}&E_{20}) بیشتر از سایر گروه‌های مورد مطالعه است. این تفاوت در گروه E_{20} بسیار بیشتر بود. با مقایسهٔ میانگین کار انجام شده در گروه‌های مختلف، هیچ‌گونه اختلافی بین دو گروه E_{40} و E_{20} دیده نشد. ولی هنگام مقایسهٔ گروه‌های شرکت‌کننده در فعالیت‌های هوازی شدید، مشخص شد میانگین کار انجام شده در گروه E_{40} ۴/۳ برابر گروه CE_{40} است. در صورتی که میانگین میزان کار انجام شده در گروه E_{20}، ۱/۲ برابر گروه CE_{20} است. علت عمدهٔ اختلاف مشاهده شده در دو دستهٔ فوق، به میزان شدت فعالیت انجام شده برمی‌گردد، زیرا تحمل شدت ۴۰ متر در دقیقه برای آزمودنی‌های غیرفعال بسیار مشکل است.

1- Denaturation
2- Cycles
3- Annealing
4- Extension
5- Automate
6- ANOVA
7- Kruskal - Wallis

در کل این اختلاف بیانگر تأثیر مثبت تمرینات هوازی بر توانایی انجام فعالیت بدن در گروه‌های فعال است.

نتایج حاصل از بررسی میانگین حجم قلب گروه‌های مختلف، تقریباً مشابه نتایج کار انجام شده بود. میانگین حجم قلب گروه E_{20} در حدود ۴/۲ درصد بیشتر از گروه E_{40} است. این در حالی است که میانگین حجم قلب گروه E_{40} در حدود ۱/۸۸ برابر گروه CE_{40} و گروه E_{20} ۱/۹۳ برابر گروه CE_{20} می‌باشد. این اختلاف نشان دهندهٔ تأثیر مثبت تمرینات هوازی روی حجم قلب گروه‌های تمرین‌کرده است (تفاوت ۸۸ درصدی در مقایسهٔ فعالیت ۴۰ متر در دقیقه و ۹۳ درصدی در فعالیت ۲۰ متر در دقیقه). البته تأثیر فعالیت‌های هوازی با شدت متوسط نسبت به فعالیت‌های شدید بیشتر احساس شد. علت اختلاف مشاهده شده را باید در مدت انجام فعالیت‌های هوازی جست و جو کرد، زیرا مدت انجام فعالیت‌های متوسط تقریباً دو برابر فعالیت‌های شدید بود. از این‌رو می‌توان نتیجه گرفت هر دو نوع فعالیت‌های هوازی در ارتقای استقامت قلبی - عروقی تأثیر مثبت دارند. اما با توجه به نتایج به دست آمده از بررسی‌های وزن و حجم قلب، استنباط می‌شود که تأثیر مثبت فعالیت‌های هوازی با شدت متوسط بیش از فعالیت‌های شدید است (جدول ۱).

پس از بررسی ژل آگارز (۲ درصد) مربوط به محصولات برنامهٔ *Multiplex PCR* مشخص شد حذف ۴/۶ کیلوبازی فقط در گروه E_{40} رخ داده است. به عبارتی، در هیچ یک از گروه‌ها حذف یادشده مشاهده نشد. از این یافته می‌توان نتیجه گرفت که یک وهله فعالیت بدنی هوازی با شدت‌های مختلف نمی‌تواند موجب بروز حذف معمولی *mtDNA* عضلهٔ اسکلتی در موش‌های صحرایی نوع $Wistar_{14848}$ شود. علاوه بر آن، تمرینات بدنی هوازی با شدت متوسط نیز در بروز حذف *mtDNA* عضلهٔ نعلی هیچ‌گونه دخالتی ندارد، در حالی که تحت تأثیر تمرینات هوازی شدید (۴۰ متر در دقیقه)، حذف ۴/۶ کیلوبازی در *mtDNA* عضلهٔ نعلی آزمودنی‌های مورد مطالعه دیده شد (شکل ۵).



شکل ۵ - ژل دو درصد آگارز مربوط به محصولات Multiplex PCR

جدول ۱ - متغیرهای اندازه‌گیری شده در گروه‌های مختلف

گروه‌ها / پارامترهای اندازه‌گیری شده	Con_1	Con_2	CE_{20}	CE_{40}	E_{20}	E_{40}
میانگین وزن بدن آزمودنی‌ها (g)	۱۹۱/۱۰	۳۱۵/۰۰	۳۰۴/۰۰	۳۲۱/۶۰	۳۳۵/۲۰	۳۳۶/۰۰
میانگین وزن عضلهٔ نعلی آزمودنی‌ها (mg)	۱۱۰/۰۰	۱۹۲/۲۰	۱۸۵/۴۰	۱۹۶/۲۰	۲۰۹/۴۰	۲۰۵/۰۰
میانگین وزن قلب آزمودنی‌ها (g)	۰/۶۸	۱/۱۱	۱/۱۴	۱/۱۱	۱/۳۵	۱/۲۹
میانگین حجم قلب آزمودنی‌ها (ml)	۰/۷۶	۱/۱۲	۱/۱۵	۱/۱۳	۲/۲۲	۲/۱۳
میانگین کار انجام شده (kg/m)	-	-	۲۲/۵۵	۶/۴۲	۲۸/۰۲	۲۸/۰۹
میزان حذف mtDNA عضلهٔ نعلی (bp)	-	-	-	-	-	۴۶۷۲

بحث و نتیجه‌گیری

هرگونه افزایشی در تولید درون‌زاد گونه‌های فعال اکسیژن می‌تواند با برهم زدن تعادل اکسیدانی / آنتی اکسیدانی موجبات بروز استرس اکسیداتیو و آسیب‌های وارده به مولکول‌های زیستی، بویژه ژنوم میتوکندریایی را فراهم آورد (۷، ۱۸، ۲۵، ۲۸، ۳۵ و ۳۶). باتوجه به اهمیت آسیب‌های ژنوم میتوکندریایی در کاهش تولید انرژی زیستی و روند پیری و نقش فعالیت‌های هوازی در بروز استرس اکسیداتیو، فرض شد فعالیت‌های هوازی سنگین می‌تواند در بروز و

تجمع حذف‌های میتوکندریایی دخالت داشته باشد.

نتایج حاصل از مطالعهٔ حاضر نشان می‌دهد تأثیر تمرینات هوازی با دو شدت متفاوت در ارتقای استقامت قلبی - عروقی قابل توجه است، با این حال نباید از تأثیر منفی تمرینات هوازی شدید در بروز حذف ۴/۶ کیلوبازی در ژنوم میتوکندری در عضلهٔ نعلی چشم‌پوشی کرد این یافته تأییدکنندهٔ نتایج گروه هالر (۲۰۰۲) در مورد آثار منفی تمرینات هوازی در بروز حذف‌های میتوکندریایی است (۳۴). از سوی دیگر، برخلاف مطالعات ساکایی (۱۹۹۹) (۲۷) و ای وای (۲۰۰۲) (۱۷)، هیچ‌گونه حذفی در اثر شرکت در یک وهله فعالیت هوازی با شدت‌های مختلف مشاهده نشد. تفاوت مشاهده شده بین یافته‌های این دو تحقیق، می‌تواند به دلیل حجم فعالیت‌های ورزشی باشد. از آنجاکه شدت فعالیت بدنی در این تحقیق مشابه مطالعهٔ ساکایی و همکارانش است، از این‌رو احتمالاً مدت فعالیت بدنی عامل بروز جهش در *mtDNA* عضلات اسکلتی بشمار می‌رود. زیرا آزمودنی‌های مطالعهٔ ساکایی و همکارانش تا حد واماندگی فعالیت داشتند، اما مدت فعالیت در تحقیق حاضر فقط ۲۰ دقیقه طول می‌کشید.

به طور کلی می‌توان گفت شرکت در تمرینات شدید هوازی می‌تواند در بروز و تراکم حذف‌های بزرگ *mtDNA* دخالت داشته باشد، در حالی که تمرینات هوازی با شدت متوسط، نه تنها موجب بروز حذف‌های بزرگ در *mtDNA* عضلات اسکلتی نمی‌شود، بلکه در توسعهٔ توان هوازی تا حد قابل توجهی مؤثر است. از طرفی، یک وهله فعالیت بدنی هوازی با شدت‌های مختلف نمی‌تواند موجب بروز حذف معمولی *mtDNA* در عضلهٔ موش‌های صحرایی نوع $Wistar_{14848}$ شود. بدین ترتیب نباید از تأثیر مخرب تمرینات هوازی سنگین در تسریع فرایند پیری و بروز بیماری مربوط به آن و نقش این گونه تمرینات در بدتر شدن وضعیت برخی از بیماران، بویژه بیماران میوپاتی میتوکندریایی، چشم‌پوشی کرد. باتوجه به مطالب فوق، برای روشن شدن تأثیر تمرینات ورزشی مختلف بر آسیب‌های وارده به ژنوم میتوکندریایی، تحقیقات بیشتری پیشنهاد می‌شود.

تقدیر و تشکر

در پایان، از همکاری مراکز پژوهشی مختلف از جمله دانشکدهٔ تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه تهران، مرکز ملی تحقیقات ژنتیک و تکنولوژی زیستی، پژوهشکدهٔ تربیت بدنی و ورزش، انستیتو پاستور و دانشگاه تبریز در پیشبرد مطالعهٔ حاضر قدردانی می‌شود.

منابع و مآخذ

1- Ames, B.N., M.K. Shinegawa, and T.M. Hagen. "Oxidants,antioxidants, and the degenrative diseases of aging" Proceeding of National Academy of Sciences of USA 1993, 90: PP: 7915-7922.

2- Beckman, K.B. and B.N. Ames. "The free radical theory of aging matures", Physiological Reviews 1998, 78, PP: 547-557.

3- Bruce, RT. "The Biolog of Aging", the mount sinai journal of medicine. 2003, Vol. 70(1).

4- Clayton, D.A., J.N. Doda and E.C. Friedberg. "The absence of a pyrimidine dimmer repair mechanism in mammalian mtochondria", Proceeding of the National Academy of Sciences USA 1974,71: PP: 2777-2781.

5- Dennog, C., A. Hartmann, G. Frey, and G. Speit. "Detection of DNA damage after hyperbaric oxygen (HBO) therapy "Mutagenesis 1996, 11: PP: 605-609.

6- Finch, C.E., and R.R., Tanzi. "Genetics of aging" Science;1997, 278: PP: 407-411.

7- Fleming, J.E., J. Miquel, S.F. Cottrell, et al. "Is cell aging caused by respiration - dependent injury to the mitochondrial genome?" Gerontology 1982, 28: PP: 44-53.

8- Fridovich, I. "Superoxide radical: An endogenous toxicant" Annual Review

of Pharamacology and Toxicology 1983, 23: PP: 239-257.

9- Fridovich, I., and B.A. Freeman. "Antioxidant defenses in the lung" Annual Review of Physiology 1986, 8: PP: 693-702.

10- Gross, N.J., G.S. Getz and M. Rabinowitz. "Apparent turnover of tissues of the rat" Journal of Biological Chemistry 1969, 244: PP: 1552-1562.

11- Halliwell, B., and J.M.C. Gutteridge. "Free Radicals in Biology and Medicine" 2nd ed. Oxford University Press (Clarendon), New York.1984.

12- Halliwell, B., J.M.C. Gutteridge. Role of free radicals and catalytic metalions in human diseas: An overview" Methods in Enzymology 1990, 186: PP: 1 - 85.

13- Hamiltion, M., "Does oxidative damage to DNA icrease with age?" Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001,Vol. 98, Issue 18,PP: 10469-10474.

14- Hardmeier, R., H. Hoeger, S. Fang - Kircher, A. Khoschsorur, and G. Lubec. "Transcription and activity of antioxidant enzmymes after ionizing irradiation in radiation - resistant and radiation - sensitive mice" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997, 94: PP: 7572-7576.

15- Harman, D. "Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry" Journal of Gerontology 1956, 11: PP: 298-300.

16- Houshmand, M., "Mitochondrial DNA Mutation pathogenicity and inheritnce"Ph.D. thesis in GOTEBORG University, Sweden.1999.

17- Iwai, K., M. Miyao, Y. Wadano, and Y. Iwamura. "Dynamic changes of deleted mitochondrial DNA in human leucocytes after endurance exercise" Eur J Appl Physiol 2003, 88: PP: 515-519.

18- Linnane, A.W., C. Zhang, A. Baumer, and P. Nagley. "Mitochondrial DNA mutation and the ageing process" In: bioenergy and pharmacological

intervention. Mutal Res 1992, 27: PP: 195-208.

19- Mello Filho, A.C., M.E. Hoffmann, and R. Meneghini. " Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron" Biochemical Journal 1984, 218: PP: 273-275.

20- Meydani, M., and W.J. Evans. "Free radicals, exercise, and aging" In: free radicals aging, B.P. Yu, (ed) 1993, PP: 183-204, CRC Press, Boca Raton, FL.

21- Mitsuyoshi, M., and T. Kaneko. "The chemistry of reactive oxygen species and related free radicals" In: Free radicals in exercise and aging, Z. Radak (ed.),2000, PP: 1- 34.

22- Ozawa, T. "Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutations associated with age and diseases" Biochem Biophys Acta 1995, 1271: PP: 177-189.

23- Ozawa, T. "Genetic and functional changes in mitochondria associated with aging" Physiological Reviews 1997, 77: PP: 425-464.

24- Quantaniha, A.T., L. Packer, J.M.S. Davies, T. Racanelli, and K.J.A. Davies. "Membrane effects of vitamin E deficiency Bioenegetics and surface charge density studies of skeletal muscle and liver mitochondria" Annual of the New York Academy of Sciences 1982, 399: PP: 32-47.

25- Radak, Z. and S. Goto. "The effects of exercise, aging and caloric restriction on protein oxidation and DNA damage in skeletal muscle" In: Oxidative stress in skeletal muscle, A.Z. Reznick, L. Packer, C.K. Sen, J.O. Holloszy, and M.J. Jackson (eds.),1998, PP: 89-103. Birkhauser, Basel, Switzerland.

26- Reznick, A.Z., E. Carmeli, and G. Lavian. "The role of antioxidant nutrition in exercise and aging". In: Free radicals in exercise and aging, Z.

Radak, (ed), 2000, PP: 73-117.

27- Sakai, Y., Y. Iwamura, J. Hayashi, N. Yamamoto, N. Ohkoshi and H. Nagata. Acute exercise cause mitochondrial DNA deletion in Rat restriction, and aging" Science 1999,273: PP: 59-63.

28- Sawyer, D.T. "Oxygen Chemistry" Oxford University Press, New York. 1991.

29- Sohal, R.S., and R. Weindruch. "Oxidative stress, caloric restriction, and aging" Science 1996, 273: PP: 59-63.

30- Stadtman, E.R. "Metal ion catalyzed oxidation of protein: Biochemical mechanism and biological consequences" Free Radical Biology and Medicine 1990, 9: PP: 315-325.

31- Stadtman, E.R."Protein oxidation and aging" Science 1992, 257: PP: 1220-1224.

32- Stadtman, E.R. and C.N. Oliver. "Metal ion - catalyzed oxidation of proteins" Journal of Biological Chemistry 1991, 266: PP: 2005-2008.

33- Stroz, G., L.A. Tartaglia. S.B. Fsrr, and B.N. Ames. "Bacterial defensess against oidative stress" Trends Genet. 1990, 6: PP: 363-368.

34- Taivassalo T, Shoubridge E, Tarnopolsky M, lofberg M, Arnold D, Haller RG. "Resistance exercise training as therapy in patients with sporadic mtDNA mutations" 2002. http://www.mdausa.org/publications

35- Wallance, D.W. "Mitochondrial genetic" A paradigm for aging and degenerative disease? Science 1992, 256: PP: 628-632.

36- Yu, B.P. "Free Radicals in Aging" CRC Press, Boca Raton, FL. 1993.

پژوهشگاه علوم انسانی و مطالعات فرهنگی
پرتال جامع علوم انسانی