فیزیولوژی ورزشی شماره ۲۲، تابستان ۱۳۹۳، صص ۶۸-۵۵

تاثیر تمرین استقامتی بر بیان ژن های مبادله گر سدیم هیدروژن۱ (NHE1) و هم انتقال دهنده سدیم بی کربنات۱ (NBC1) در عضلات اسکلتی رت

امیرعباس منظمی[۱]، حمید رجبی[۲]، رضا قراخانلو[۳]

۱. استادیار دانشگاه رازی کرمانشاه*

۲. دانشیار دانشگاه تربیت معلم تهران

۳. دانشیار دانشگاه تربیت مدرس تهران

تاریخ دریافت:۱۳۹۲/۰۴/۳۱ تاریخ پذیرش:۱۳۹۲/۰۷/۰۷

چکیده

هدف از مطالعه حاضر تعیین تاثیر تمرین استقامتی بر بیان ژن های مبادله گر سدیم هیدروژن۱ (NHE1) و هم انتقال دهنده سدیم بی کربنات۱ (NBC1) در عضلات اسکلتی باز کننده طویل انگشتان پا (تندانقباض) و نعلی (کند انقباض) رت نر بود. تعداد ۲۰ رت نژاد ویستار در سن ۴ هفتگی با میانگین وزن ۱۰/۸±۹۵/۷گرم انتخاب و به طور تصادفی به دو گروه کنترل وتمرینی تقسیم شدند. تمرین استقامتی (دویدن روی نوار گردان با سرعت۲۰m/minومدت ۲۰دقیقه و تدریجاً رسیدن به سرعت ۳۰ m/min و مدت ۳۵ دقیقه در هفته آخر) به مدت هفت هفته،بر گروه های تمرینی اعمال شد. ۴۸ساعت پس از اتمام پروتکل تمرینی، رت ها تشریح و عضله نعلی و باز کننده طویل انگشتان پااستخراج شدند. میزان بیان ژن mRNA (NHE1 وNBC1) از طریق تکنیک Real time-PCR انجام گرفت.میزان بیان ژنmRNA (NHE1 وNBC1) با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه گردید. جهت تعیین معنادار بودن تفاوت بین متغیرهای گروه های تحقیق از آزمون آماری t مستقل و با استفاده از نرم افزار REST (permutation test) استفاده گردید. سطح معناداری در تمامی مراحل برابر با ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.یافته های تحقیق نشان داد اختلاف معناداری بین میزان بیان NHE1 mRNA عضله باز کننده طویل انگشتان پا (۷۴٪) و عضله نعلی (۵۱٪) درگروه تمرینی نسبت به گروه کنترل وجود دارد (P<۰/۰۵). همچنین میزان بیان ژن NBC1 mRNA عضله باز کننده طویل انگشتان پا (۶۲٪) و عضله نعلی (۴۱٪) گروه تمرینی نسبت به گروه کنترل افزایش داشت اما این افزایش در عضله نعلی معنادار نبود (P<۰/۰۵). در مجموع نتایج تحقیق نشان داد تمرین استقامتی موجب افزایش بیان ژنmRNA (NHE1 وNBC1) در هر دو تار کند وتند انقباض درگروه تمرینی گردید. بنابراین تمرین استقامتی از طریق مسیر غیر وابسته به لاکتات ظرفیت pH درون سلولی را افزایش می دهد واین الگوی افزایش بیان مختص ترانسپورتر هایی است که از لحاظ متابولیکی نقش مهم تری را در تنظیم و نگهداری pH درون سلولی در عضلات اسکلتی بر عهده دارند.

واژگان کلیدی: تنظیم pH درون سلولی، بیان ژن، هم انتقال دهنده سدیم بی کربنات، مبادله گر سدیم هیدروژن، تمرین استقامتی.

* نویسنده مسئول Email: monazzami.amirabbas@gmail.com

مقدمه

کنترل و تنظیمpH_i[1] سلول عضلانی جهت حفظ انقباض های مکرر عضلانی و جلوگیری از افت عملکرد درحین تمرین و فعالیت بدنی از اهمیت خاصی برخوردار است (۳-۱). بسیاری از تحقیقات نشان داده اند تجمع یون هیدروژن و در پی آن اسیدوز طی فعالیت های ورزشی در کاهش عملکرد ورزشی از طریق تغییر در ساختار پروتئین ها وکانال های یونی و اختلال در عملکرد آنها و همچنین اختلال در فعالیت آنزیم های کلیدی مسیر گلیکولیز و نهایتاً اختلال در سرعت سنتز ATP انجام می گیرد (۳). لذا جلوگیری از تجمع پروتون جهت جلوگیری از کاهش pH_i در شرایط تمرین و فعالیت بدنی‌خصوصاً در سلول های عضلانی، حیاتی به نظر می رسد (۳-۱). مهمترین مکانیسم هایی که برای کنترل و یا تعدیل حالت اسیدوز (کاهشpH_i) فعال‌می شوند،سیستم تامپونی و تنظیم کننده‌های درون سلولی هستند (۴،۵). سیستم تامپونی از طریق حذف پروتون در سلول و تنظیم کننده های درون سلولی از طریق انتقال پروتون و لاکتات (انتقال دهنده ها) به کنترل وتعادلpH_i کمک می نمایند (۶-۴). از مهمترین تامپون های بدن، سیستم تامپونی بی کربنات و سیستم تامپونی غیر بی کربنات (شامل فسفات ها و پروتئین ها) هستند. سیستم تامپونی بی کربنات حدود ۷۵درصد کل سیستم بافر کردن پروتون را در کل بدن بر عهده دارد؛ درحالی که نقش سیستم تامپونی غیر بی کربنات (سلول و خون) جهت بافرکردن پروتون به ۲۵درصد می رسد (۴،۵،۷،۸). در این مجموعه انتقال دهنده ها،MCT^2ها یا انتقال دهنده های لاکتات و پروتون به عنوان تنظیم کننده های وابسته به لاکتات و NBC^3ها (انتقال دهنده سدیم و بی کربنات که دارای ۴ایزوفرم وابسته به بافت هستند) وNHE^4 ها (مبادله گر سدیم و هیدروژن که دارای ۱۰ ایزوفرم وابسته به بافت هستند) هر دو به عنوان تنظیم کننده های غیر وابسته به لاکتات شناسایی شده اند (۱۳-۲،۹) بنابراین به نظر می رسد در شرایط استراحتی و تمرین زیر بیشینه (هوازی یا استقامتی) که تجمع لاکتات پایین است، بخش اصلی دفع پروتون به وسیله مکانیسم های غیر وابسته به لاکتات (NBC ها وNHE ها) تعدیل می گردد؛ ولی طی تمرین با شدت زیاد نقش سیستم وابسته به لاکتات (MCT ها) برجسته تر است. به گونه ای که در این شرایط سیستم دفعی غیر وابسته به لاکتات تنها حدود دو برابر شرایط استراحتی افزایش پیدا می کند در حالی که سیستم دفعی وابسته به لاکتات می تواند تا حدود پنج برابر حالت استراحتی افزایش پیدا کند (۲،۹،۱۳). بنابرین در شرایط استراحت و تمرین زیر بیشینه (استقامت

1. Intracellular pH
2. Monocarboxylate cotransporter
3. Na+/HCO3 cotransporter
4. Na+/H+ exchanger

هوازی) NHE ها (به ویژه ایزوفرم ۱و۳) وNBCها (به ویژه ایزوفرم ۱و۴) مهمترین انتقال دهنده های انتقال پروتون سلول های عضلانی به شمار می روند، در حالی که در شرایط تمرین بیشینه (استقامت بی هوازی) نقش اصلی به MCTها واگذار می گردد (۱۳-۲،۹).

از آنجاییکه عضلات مهمترین جایگاه تولید لاکتات و پروتون هنگام فعالیت بدنی هستند و همچنین تنوع شدت های تمرینی زیربیشینه و بیشینه موجب به کارگیری واحد های حرکتی کند و تند می شود (۲،۱۲،۱۳)، لذا تصور می شود تمرین زیر بیشینه بتواند بیان ژن این انتقال دهنده ها را در عضلات کند و تند تغییر دهد (۱۲-۹). مطالعه تغییراتNHE1 وNBC1 در عضله اسکلتی فقط به تعدادی تحقیق در زمینه فعالیت و بیان پروتئین محدود می شود و در زمینه بیان ژن این انتقال دهنده ها در شرایط تمرین و فعالیت بدنی تحقیقات محدودی صورت گرفته است. نیکویی و همکاران (۱۳۸۹) در یک مطالعه اثر تمرینات استقامتی بر بیان ژن و محتوی پروتئینی MCT1 و MCT4 در عضلات اسکلتی رت های دیابتی و سالم را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد تمرین استقامتی بیان ژن و محتوی پروتئینی MCT1 و MCT4 را در گروه تمرینی دیابتی و سالم افزایش داده است (۱۴). علاوه بر این منظمی و همکاران (۱۳۹۱) در تحقیقی دیگر نشان دادند تمرین استقامتی موجب افزایش بیان ژن mRNA (NHE1 وNBC1) در عضله قلب رت های دیابتی می گردد (۱۵). همچنین در تحقیق دیگری که توسط بیکر و همکاران[1] (۱۹۹۸) بر روی رت ها انجام گرفت نشان داده شد تمرینات با شدت پایین موجب افزایش بیان mRNA (MCT1) درعضله قلب و تمرینات با شدت بالا فقط در عضلات اسکلتی اکسیداتیو موجب افزایشmRNA (MCT1) می شوند (۱۶). علاوه بر این سندمن و همکاران[2] (۲۰۰۱) در تحقیق دیگر گزارش کردند که در اثر انسداد عروق کرونری قلب، بیان ژن وپروتئین هر دو مبادله گر و انتقال دهندهNHE1 و NBC1 افزایش پیدا می کند (۱۷). جاندلیت و همکاران[3] (۲۰۰۰) در تحقیقی دیگر نشان دادند بیان ژنmRNA (NHE1) نیز در عضلات عروق رت های دیابتی افزایش می یابد (۱۸).

در تحقیق دیگر راسموسن و همکاران [4] (۲۰۱۱) نشان دادند یک جلسه تمرین سرعتی موجب افزایش معنادار در بیانmRNA (NHE1) عضلات اسکلتی رت می شود .آن‌ها همچنین گزارش کردند سه هفته تمرین استقامتی موجب افزایش معنادار بیانRNA (NHE1) در عضلات

1. Baker S and et al
2. sandman S and et al
3. Jandeleit-dahm K and et al
4. RasmussenM and et al

اسکلتی کند می‌گردد، اما این افزایش در سطح پروتئین NHE1 در عضلات اسکلتی معنادار نبود (۱۹). در یکی دیگر از این تحقیقات، جول[1] (۱۹۹۸) اثر تمرینات با شدت زیاد و تمرینات استقامتی بر محتوی NHE1 درعضلات رت ها را مورد بررسی قرار داد و نشان داد محتوی NHE1 بعد از تمرین با شدت زیاد افزایش می یابد. اما تمرین استقامتی تاثیری بر محتوی آن نداشته است (۲۰). جول و همکاران (۲۰۰۰) در تحقیق دیگری اثر تمرین با شدت زیاد را بر محتوی NHE1 عضلات کند و تند رت ها مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند ایزوفرم NHE1 در عضلات بیان می شود. همچنین تمرین با شدت زیاد موجب افزایش محتوی این انتقال دهنده به میزان ۳۶ و ۲۹درصد به ترتیب در تارهای گلیکولیتیکی و اکسیداتیوی می شود (۲۱). در مجموع به نظر می رسد این گونه تحقیقات بیشتر انتقال دهنده‌هایی راکه در شرایط تمرینات بیشینه فعال می شوند مورد توجه قرار داده اند وتوزیع بیان ژن این انتقال دهنده ها در عضلات کند و تند به خوبی مشخص نشده است.

در نتیجه با توجه به تحقیقات محدود در زمینه اثر تمرین استقامتی بر محتوی این انتقال دهنده ها در عضلات تند و کند،در این تحقیق به بررسی اینکه ۱) آیا تمرین استقامتی بیان ژن این انتقال دهنده ها را در عضلات اسکلتی افزایش می دهد؟ ۲) آیا تمرین استقامتی موجب بیان متفاوت این انتقال دهنده ها در تارهای کند و تند عضلات می گردد؟ پرداخته می شود تا از این طریق برخی از مکانیسم های احتمالی مسئول تنظیم و کنترل pH_i در شرایط تمرین معین گردد.

روش پژوهش

تعداد ۲۰ رت نر نژاد ویستار در سن ۴ هفتگی با میانگین وزنی ۹/۸±۹۳/۷ گرم از انستیتو پاستور ایران تهیه و تحت چرخه ۱۲:۱۲ساعت تاریکی- روشنایی در محیط آزمایشگاهی با درجه حرارت۴±۲۲ و رطوبت (۴۹تا۵۱ درصد) به صورت ۱۰تایی در قفس های مخصوص جوندگان نگهداری شدند (۱۵). وزن بدن به طور روزانه ثبت و رت ها با غذای مخصوص رت (ساخت شرکت‌های کانی دام و سرم سازی رازی) و آب تغذیه شدند (۱۵). بعد از گذشت دو هفته (سازگاری با محیط آزمایشگاه)، رتها با میانگین وزن ۱۱/۴±۱۸۳/۴۷ گرم به طور تصادفی ضمن همسانسازی بر اساس وزن به دو گروه کنترل (n=10) و تمرینی (n=10) تقسیم شدند. لازم به یادآوری است که تعدادی از نمونه های حیوانی در جریان پروتکل تحقیق از جمله بیهوشی و نمونه گیری خون

1. Juel

(۴سر رت) و استخراج نمونه (۴سر رت) از تحقیق خارج شدند و به همین خاطر تعداد نمونه های تحقیق(n) در مراحل اندازه گیری متفاوت در نظر گرفته شد (۲۱).

تمرین استقامتی به مدت ۷ هفته بر روی تریدمیل مجهز به سیستم تحریک الکتریکی، هر روز، سرعت $20\ mmin^{-1}$و زمان 20minدر هفته اول و به تدریج به سرعت $30mmin^{-1}$ و زمان 35 minدر هفته آخرمی رسید، بر گروه تمرینی اعمال شد. خلاصه آن در جدول۱ گزارش شده است. ضمن این که شدت به گونهای انتخاب گردید که سطوح لاکتات را در حین تمرین دستخوش تغییر قابل ملاحظه نماید (۷۰-۶۰ درصد VO_{2max}). بروکس و همکاران[1] نشان دادند این شدت تمرینی موجب افزایش قابل توجه سطوح لاکتات می‌شود (۲۲). تمامی این اطلاعات با انجام مطالعات پایلوت روی ۴ رت به دست آمد. میزان لاکتات در شدت تمرینی۳۰متر بر دقیقه (۶۰ تا۷۰ درصد VO_{2max}) برابر با۴میلی مولار بود. دو هفته آخر نیز تمامی متغیرهای تمرینی ثابت نگه داشته شدند تا سازگاریهای انجام شده در زمان تشریح، به حالت یکنواخت خود برسند (۱۹،۲۱).

۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی رتها به وسیله تزریق درون صفاقی کتامین[2] (۹۰میلی گرم به ازای هر کیلو گرم) و زایلازین[3] (۱۰میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) بیهوش و عضلات نعلی و باز کننده طویل انگشتان پا (EDL) بلافاصله استخراج و در نیتروژن ۸۰- منجمد و برای تجزیه و تحلیل بعدی نگهداری شدند (۱۹،۲۱).

حدود ۵۰ میلی گرم عضله با روش هاون کوبی پودر گردید و جهت استخراج RNA تام به نسبت ۱ به ۱۰ در بافر لیز Bisol RNA-Lysis regent به مدت ۱۵ دقیقه هموژن گردید. به منظور برداشتن اجزای پروتئینی محصول حاصل در ۴C، ده دقیقه، ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شد. مایع رویی برداشته و با نسبت ۱ به۰/۲ Bisol اولیه با کلروفورم مخلوط و به مدت هر ۱۵ ثانیه یک بار به آرامی تکان داده شد و سپس محصول را به مدت ۱۵دقیقه روی یخ قرار گرفت (۱۷،۱۹،۲۳). محصول در ۴C، ۱۵ دقیقه، ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ و بخش معدنی و آلی از هم جدا شدند. بخش محتوی RNA برداشته و هم حجم مایع رویی به آن ایزوپروپانل اضافه شد و به مدت بیش از ۲۰دقیقه در یخچال ۲۰- قرار داده تا RNAجدا سازی شود.در مرحله بعد محصول رابه مدت ۱۰ دقیقه، ۱۲۰۰۰g،4C سانتریفیوژ نموده تا RNAرسوب کند.رسوب حاوی RNA در اتانول۷۵درصد شستشو و در ۲۰µlآب فاقد RNAS-Free حل گردید. غلظت RNA با استفاده

1. Brooks , G.A and et al
2. Ketamine
3. Xylazine

از دستگاه نانودراپسنجیده شد و نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ به عنوان تخلیص مطلوب تعریف گردید. cDNA با استفاده از یک میکروگرم از RNA و با استفاده از Reverse primers و آنزیم نسخه برداری معکوس انجام گرفت (جدول۲).

Real-Time PCR با استفاده غلظت ۱۰۰نانو گرم از cDNA انجام گرفت (جدول۳). برنامه مورد استفاده در Real time شامل ۹۴ به مدت ۵ دقیقه ،۹۴^{o} به مدت ۴۵ (باز شدن۴۵ثانیه)، ۶۰ به مدت ۴۵ ثانیه (جفت شدن) و ۷۲ به مدت ۴۵ثانیه (تکثیر) (تکرار ۴۰ سیکل) بود. میزان بیان ژن های مورد نظر با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ اندازه‌گیری شد (۱۷،۱۹،۲۳). بعد از این که نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف اسمیرنف‌تأیید شد، جهت تعیین معنادار بودن تفاوت متغیرها بین گروه‌های تحقیق از آزمون آماری t مستقل و نرم افزار REST (permutation test) استفاده گردید. مقدار در تمامی مراحل برابر با ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

کل تغییرات بیان ژنmRNA (NHE1 وNBC1) در عضلات نعلی و باز کننده طویل انگشتان پا (EDL) درگروه تمرینی مورد مطالعه نسبت به گروه کنترل از طریق محاسبه ارزش RQ[1] استاندارد شدند.نتایج تحقیق نشان داد تمرین استقامتی موجب افزایش معنادار در بیان ژنNHE1 در عضلات نعلی و باز کننده طویل انگشتان پا (EDL) شده است.این افزایش بیان در عضلات باز کننده طویل انگشتان پا و نعلی به ترتیب ٪۷۴ (شکل۱) و ٪۵۱ (شکل۲) بود ($P<0.05$). همچنین بیان ژن NBC1 در عضله باز کننده طویل انگشتان پای گروه تمرینی۶۲درصد بود. این افزایش گروه تمرینی نسبت به گروه کنترل معنادار بود (شکل۱) ($P<0.05$). علی رغم افزایش در میزان بیانmRNA (NBC1) در عضله نعلی گروه تمرینی به میزان ۴۱درصد، این افزایش نسبت به گروه کنترل معنادار نبود (شکل۲) ($P<0.05$) .

جدول ۱- مشخصات پروتکل تمرین استقامتی

زمان	آشناسازی	هفته ۱	هفته ۲	هفته۳	هفته۴	هفته۵	هفته ۶	هفته۷
سرعت (m/min)	۱۵	۲۰	۲۰	۲۵	۲۵	۳۰	۳۰	۳۰
مدت (min)	۲۰	۲۰	۲۵	۲۵	۳۰	۳۰	۳۵	۳۵

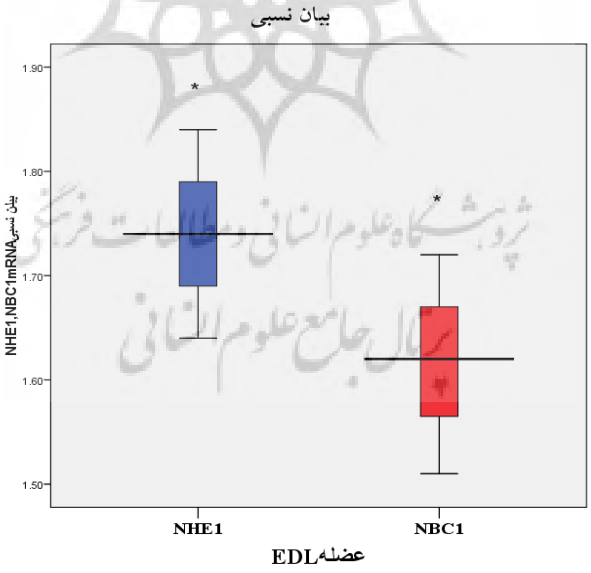
1. relative quantification

جدول۲- توالی پرایمرهای مورد استفاده در تحقیق

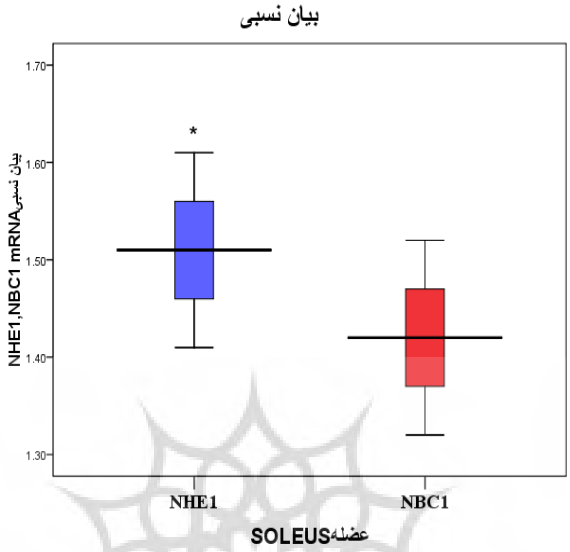
Gene bank	ژن	Forward primer	Reverse primer
Slc9a1	NHE1	CACATCAATGAGCTGCTGC	GCTGGCAAACTCCTCAAAG
Slc4a4	NBC1	ACTCCCTTCATTGCCTTTG	CATGGTAGGACTTGGCTTTC
18s	18S	GTCGGCATCGTTTATGGTCG	GTTGGTTTTCGGAACTGAGGC

جدول ۳-اجزایPCR جهت تکثیر ژن

Product	Syber mix (µl)	Primers (µl)	Taq polymerase(µl)	cDNA (µl)	ddH2O (µl)
NHE1	12.5	0/5	0/15	2	9
NBC1	12.5	0/5	0/15	2	9
18S	12.5	0/5	0/15	2	9



شکل۱-میزان بیان ژنNHE1 در عضله باز کننده طویل انگشتان پاEDL گروه های تحقیق
*اختلاف معنا دار (P<0.05)،کنترل (n=6)،تمرینی (n=6).



شکل۲-میزان بیان ژنNBC1در عضله نعلی گروه های تحقیق

*اختلاف معنی دار ($P<0.05$) ،کنترل سالم (n=6)، تمرینی (n=6).

بحث و نتیجه گیری

کنترل و تنظیمpH_i در عضلات اسکلتی جهت حفظ انقباض های مکرر عضلانی و جلوگیری از آسیب درحین تمرین و فعالیت بدنی از اهمیت خاصی برخوردار است.درمطالعه حاضر مدل تمرین استقامتی به عنوان شرایط ایجاد کننده اسیدوز مورد استفاده قرار گرفت تا بیان ژن های (NHE1 mRNA وNBC1) را در عضلات اسکلتی مورد ارزیابی قرار دهد. تحقیق حاضر اولین تحقیقی است که اثرات بلند مدت تمرین استقامتی را بر بیان ژن های mRNA (NHE1 وNBC1) در عضلات نعلی و باز کننده طویل انگشتان پا مورد بررسی قرار داد. از مهمترین یافته های تحقیق این است که تمرین استقامتی می تواند بیان ژن های mRNA (NHE1 وNBC1) را در شرایط تمرین نسبت به شرایط کنترل افزایش دهد. این الگوی بیان ژن در عضلات اسکلتی مختص تار عضلانی است که از لحاظ متابولیکی با یکدیگر متفاوتند؛ و یک نوع سازگاری به تمرین است که سلول عضلانی خود را با شرایط ویژه تمرین جهت کنترل و تنظیم pH_i منطبق می سازد. همچنین نتایج تحقیق نشان داد این الگوی افزایش بیان مختص ترانسپورتر هایی است که از لحاظ متابولیکی نقش مهم تری را در تنظیم و نگهداری pH درون سلولی در عضلات اسکلتی بر عهده

دارند.مطالعه تغییراتNHE1 وNBC1 در عضلات اسکلتی فقط به تعدادی تحقیق در زمینه فعالیت و بیان پروتئین محدود می شود و در زمینه بیان ژن این انتقال دهنده ها در شرایط اسیدوز و اثر تمرین بر روی آن تحقیقات محدودی صورت گرفته است.افزایش بیان ژن های mRNA (NHE1 و NBC1) در گروه تمرینی دلالت بر این دارد که بیان ژن این انتقال دهنده ها نیز تحت تاثیر تغییرات متابولیکی قرار می گیرند. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد پاسخ انتقال دهنده های غشایی به شرایط اسیدوز ناشی از تمرین متفاوت است و اطلاعات در این زمینه ضد و نقیض و وابسته به سطح فعالیت، محتوی پروتئین و بیان ژن است.

در تحقیق حاضر افزایش قابل توجهی در بیان ژن ها mRNA (NHE1 وNBC1) در عضلات نعلی و باز کننده طویل انگشتان پا گروه تمرینی دیده شد.افزایش بیان ژن مبادله گر و انتقال دهنده NHE1 وNBC1 در گروه تمرینی در تحقیق حاضر حاکی از اثرات تطابقی تمرین استقامتی بر متغیرهای درگیر در تنظیم pH درون سلولی در شرایط اسیدوز است.اغلب تصور بر این است که افزایش بیان ژن منجر به افزایش پروتئین می گردد، اما فاکتور های متعدد دیگری مانند تجزیه پروتئین، تغییرات پس ترجمه ای و ثبات RNA می توانند بر ارتباط بین ژن و پروتئین تاثیر بگذارند.البته در این تحقیق فقط تغییرات ژن بررسی شد و اینکه بتوان نتیجه گرفت افزایش mRNA این انتقال دهنده ها منجر به کنترل اسیدوز ناشی از تمرین می شود، خارج از حیطه این تحقیق است و تحقیق در مورد ارتباط بین بیان ژن و پروتئین به محققین بعدی توصیه می گردد.در تایید این موضوع راسموسن و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند یک جلسه تمرین سرعتی موجب افزایش معنادار در بیانmRNA (NHE1) عضلات اسکلتی رت می شود.آنها همچنین گزارش کردند سه هفته تمرین استقامتی موجب افزایش معناداری در بیانmRNA (NHE1) در عضلات اسکلتی کند انقباض می گردد؛ اما این افزایش در سطح پروتئینNHE1 در عضلات اسکلتی معنادار نبود (۱۹).

بیانmRNA (NHE1) درعضله باز کننده طویل انگشتان پا پاسخ به تمرین استقامتی (۷۴درصد افزایش) بیشتر از بیان mRNA (NHE1) در عضله نعلی (۵۱درصد افزایش) در گروه تمرین کرده بود (شکل۱و۲). دلایل این افزایش را می توان به خصوصیات گلیکولیتیکی عضله باز کننده طویل انگشتان پا نسبت به خصوصیات اکسیداتیوی عضله نعلی و نحوه توزیع و کنتیک فعالیت این انتقال دهنده ها در بافت عضلات از یک طرف و همچنین شدت و نوع تمرین (استقامتی) از طرف دیگر نسبت داد (۱۲،۲۴). لی- پریجنت و همکاران (۱۹۹۷) نشان دادند مشارکت مبادله گر و انتقال دهنده NHE1 وNBC1 در خارج ساختن پروتونH^+ از سلول قلب در pH=6.90 به ترتیب ۶۹ و ۳۱ درصد است (۲۲). در تایید این نتایج،جول و همکاران (۲۰۰۰)

در تحقیقی دیگر نشان دادند در اثر تمرینات با شدت بالا محتوی پروتئینی NHE1 در تارهای گلیکولیتیکی نسبت به تارهای اکسیداتیوی بیشتر بیان می گردد (۲۱). علت افزایش محتوی این ترانسپورتر را می توان در ویژگی های ساختاری آن و نوع تمرین نسبت داد. در حقیقت NHE1 به تغییرات pH_i به شدت حساس بوده و تمرین با شدت بالا موجب تجمع بیش از حد پروتون و کاهش pH_i می گردد و از آنجاییکه عضلات گلیکولیتیکی نسبت به عضلات اکسیداتیوی اسید لاکتیک بیشتری تولید می کنند، این پروتئین در این عضلات بیشتر بیان شده است تا بتواند پروتون بیشتری را از سلول خارج سازد و به تنظیم و کنترلpH_i عضله کمک نماید. اما همین محققین در تحقیق دیگری نشان دادند تمرین استقامتی اثری بر محتوی پروتئینی این ترانسپورتر نداشته است (۲۰). همچنین بروکس و همکاران نشان دادند دویدن بر روی نوار گردان با شدت ۶۰ تا ۷۰درصدVO_{2max} موجب تغییر قابل ملاحظه ای در سطوح لاکتات ($4mmoll^{-1}$) می گردد (۲۵). بدین منظور، تمرین دویدن بر روی نوار گردان در تحقیق حاضر با این شدت انتخاب گردید (جدول۱). در نتیجه افزایش بیان$mRNA$ (NHE1) عضله باز کننده طویل انگشتان پا نسبت به عضله نعلی و همچنین کنتیک انتقال دهنده‌ها و از طرف دیگر شدت تمرین استقامتی به کار رفته در این تحقیق منطقی به نظر می رسد.این نتایج با نتایج تحقیق نیکویی و همکاران (۱۳۸۹) که نشان دادند تمرین استقامتی بیان ژن ها و محتوی پروتئینی MCT1 و MCT4 عضلات اسکلتی را در گروه تمرینی دیابتی و سالم افزایش داده، همسو است (۵).

در تحقیق حاضر بیان ژن NBC1در عضلات باز کننده طویل انگشتان پاو نعلی به ترتیب ۶۲و۴۱درصد بود.این افزایش بیان در عضلهباز کننده طویل انگشتان پا معنادار ولی در عضله نعلی معنادار نبود ($p<0.05$). این میزان افزایش بیشتردر بیان ژن در عضله باز کننده طویل انگشتان پا با نتایج تحقیق کلایر و همکاران مغایر است (۹) .آنها نشان دادند در اثر تمرین تناوبی شدید محتوی پروتئینیNBC1در عضله نعلی افزایش معنادار می یابد ولی محتوی این پروتئین در عضله باز کننده طویل انگشتان پا تغییر پیدا نمی کند. این افزایش بیان را به ویژگی تمرین نسبت دادند که موجب می شود NBC1به عضلات اکسیداتیو در تنظیمpH_i کمک نماید (۹). هرچند کریستنسن و همکاران[1] (۲۱) نشان دادند NBC1 توزیعی وابسته به تار ندارد و در همه تار ها یکسان بیان می شود، اما نتایج تحقیق کلایر و همکاران (۲۰۰۷) با توجه به شدت تمرین گمراه کننده است. یکی از علت هایی که می توان به عدم وجود اختلاف معنادار در افزایش محتوی پروتئینیNBC1 در عضلات نعلی وباز کننده طویل انگشتان پااشاره کرد. حضور دیگر ترانسپورتر ها علاوه بر این ترانسپورتر و همچنین سیستم های دفاعی دیگر در تنظیم و کنترلpH_i

1. Christinsen and et al

است.افزایش محتوی پروتئینی دیگر ترانسپورترها و همچنین ظرفیت تامپونی سلول نسبت به تنوع شدت های تمرین موید این موضوع است (۹،۱۷).

در نتیجه افزایش بیان ژن NBC1 در عضله باز کننده طویل انگشتان پا با توجه به شدت تمرین و کنتیک این ترانسپورتر در بافت های مختلف، خصوصاً عضلات اسکلتی منطقی به نظر می رسد. مکانیسم هایی که از طریق آن، تمرین استقامتی موجب افزایش بیان ژن مبادله گر و هم انتقال دهنده NHE1 وNBC1 می شود به خوبی مشخص نشده است؛ اما اختلاف بین بیان ژن و پروتئین نشان دهنده تاثیر متغیر های مداخله گر پس ترجمه ای بر کنترل سنتز پروتئین است. نتایج تحقیق راسموسن و همکاران،پریجنت و همکاران، دارملا و همکاران[1] موید این موضوع است (۱۹،۲۲،۲۷). از طرف دیگر تغییرات متابولیکی نیز می توانند به عنوان عوامل موثر پس ترجمه ای در افزایش بیان این انتقال دهنده ها باشد. تمرین استقامتی موجب آزادسازی کلسیم درون سلولی می گردد و کلسیم از طریق فعال کردن چندین مکانیسم به تغییرات در سطح mRNA و پروتئین ترانسپورتر های غشایی کمک می کند (۱۲). پیشنهاد شده است که ساختار ترانسپورتر NHE1 دارای دو جایگاهاختصاصی کالمودلین Ca^{2+}می باشد و پیوند کلسیم به این جایگاه‌ها موجب فعال شدن این ترانسپورتر می گردد. تمرین استقامتی می تواند از طریق افزایش کلسیم درون سلولی طی انقباض های مکرر به فعال شدن آن پاسخ دهد (۱۲).

در یک مطالعه برتراند و همکاران[2] (۱۹۹۴) دو مسیر درون سلولی را برای کنترل فعالیت NHE1 از طریق کلسیم پیشنهاد دادند. مسیر اول از طریق پیوند مستقیم کلسیم/کالمودلین (Ca/CAM) به مبادله گر و مسیر دوم فسفوریلاسیون مبادله گر به وسیله کلسیم/کالمودلین وابسته به پروتئین کیناز۲ است (۲۸). پروتئین کیناز C (PKC)دیگر فاکتور فعالیت ورزشی است که در تغییرات پروتئین های غشایی نقش دارد. پیشنهاد شده است که ترانسپورترهایNHE1 و NBC1 دارای جایگاه هایی هستند که توسط PKC فعال می شوند. در اثر فعالیت ورزشی و افزایش آزادسازی کلسیم این کیناز نیز فعال می شود و می تواند نقش مهمی در فعال سازی وسنتز پروتئینی های غشایی NHE1 وNBC1 ایفا کنند (۱۲).

در مجموع نتایج تحقیق نشان داد تمرین استقامتی موجب افزایش بیان ژن mRNA (NHE1 وNBC1) در گروه تمرینی می شود. این الگوی بیان ژن در عضلات اسکلتی مختص تار عضلانی است که از لحاظ متابولیکی با یکدیگر متفاوتند و نوعی سازگاری به تمرین است که سلول عضلانی خود را با شرایط ویژه تمرین جهت کنترل و تنظیم pH_i منطبق می سازد.همچنین این الگوی

1. Darmellah, D and et al
2. Bertrand , B and et al

افزایش بیان مختص ترانسپورترهایی است که از لحاظ متابولیکی نقش مهم تری را در تنظیم و نگهداری pH درون سلولی در عضلات اسکلتی بر عهده دارند.

تقدیر و تشکر

نویسندگان بدینوسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از صندوق حمایت از پژوهشگران کشور (ریاست جمهوری) به جهت حمایت مالی از تحقیق حاضر، شرکت دام و طیور کانی دام و مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی رازی کرمانشاه به جهت همکاری در اجرای تحقیق ابراز می‌دارند.

منابع

1) Juel C. Muscle pH regulation: role of training. ActaPhysiol Scand. 1998a ;169:359-66.

2) Juel C. Regulation of pH in Human Skeletal Muscle :Adaptaion to Physical Activity. Acta Physiol. 2008 ;193:17-24.

3) Messonnier L, Kristensen M, Juel C, Denis C. Importance of pH regulation and lactate/H transport capacity for work production during supramaximal exercise in humans. J Appl Physiol. 2007;102:1936˚44.

4) Dieter B ,Carola K. Extracellular Bicarbonate and Nonbicarbonate Buffering against lactic acid during and after exercise. Eurappl physiol. 2007 ;99:163-71.

5) Johann E, David B, Carmel G.The effects of training intensity on muscle buffer capacity in females. Eur J Appl Physiol. 2006 ;96:97˚105.

6) Mannion A.F, Jakeman P.M, Dunnett M, Harris R.C, Willan P.L. Carnosin and anersine concentration in the quadriceps femoris muscle of healthy humans. European journal f applied physiology. 1992;64:47-50.

7) Boning D , klarhola C. Causes of differences in exercise-induced changes of base excess and blood lactate.Eurappl physiol. 2007;99:163-71.

8) David B, Edge J , Goodman C. Muscle buffer capacity and aerobic fitness are associated with rpeated-sprint ability in women. Eur J ApplPhysiol . 2004;92: 540˚ 7.

9) Claire T, David B. Effect of High- Intensity Training on MCT1,MCT4 and NBC Expressions in Rat Skeletal Muscles:Influwnce of Chronic Metabolic Alkalosis.Am J PhysiolEndocrinolMetabol. 2007;293:916-22.

10) Coles L, Litt J, Hatta H, Bonen A. Exercise rapidly increases expression of the monocarboxylate transporters MCT1 andMCT4 in rat muscle. J Physiol.2004;561:253˚61.

11) Dubouchaud H, Butterfield G.E, Wolfel E.E, Bergman B.C and Brooks G.A. Endurance training, expression, and physiology of LDH, MCT1, and MCT4 in human skeletal muscle. Am J Physiol.2000;278:571˚8

12) Juel,C. (2006). Training-induced changes in membrane transport proteins of humanskeletal muscle. Eur J ApplPhysiol .(96):627˚35.

13) Puceat M, Arnaud D V, Montpellier F. PHi regulatory ion transporters: An Update on Structure , Regulation and Cell Function.Clms Cell Mol Lifesci.1999;55:1216-1229.

۱۴) نیکویی روح الله، رجبی حمید، قراخانلو رضا، منظمی امیرعباس، امیدفر کبری، لاریجانی باقر و همکاران. تعدیل کاهش بیان ژن های MCT1و MCT4 در عضلات اسکلتی رتهای دیابتی نوع دو متعاقب تمرین استقامتی.مجله دیابت و لیپید ایران. زمستان۱۳۸۹؛ (۳) :۵۱-۲۴۱.

۱۵) منظمی امیرعباس، رجبی حمید، قراخانلو رضا، مصطفایی علی، امیدفر کبری، شهبازی ندر وحید و همکاران . تاثیر تمرین استقامتی بر بیان ژن های مبادله گر سدیم هیدروژن ۱ (NHE1) و هم انتقال دهنده سدیم بی کربنات ۱ (NBC1) در عضله قلبی رت های دیابتی نوع دو.مجله دیابت و لیپید ایران.پاییز۱۳۹۱؛ (۱۲):۵۳-۱۴۲.

16) Baker S, Karl J A, Bonen A. Training intensity-dependent and tissue-specific increasesin lactate uptake and MCT-1 in heart and muscle. J Appl Physiol.1998;84:987-94.

17) Sandmann S, Yu M, Kaschina E, Blume A, Bouzinova E, Aalkjaer C, and et al. Differential effects of angiotensin AT1 and AT2 receptors on theexpression, translation and function of the Na+˚H+ exchanger and Na+˚HCO3 symporter in the rat heart after myocardial infarction. J Am CollCardiol: 2001;37:2154˚65.

18) Jandeleit-Dahm, K, Hannan, K.M, Farrelly, C.A, Allen, T.J,Rumble, J.R,Gilbert, R.E and et al. Diabetes-induced vascular hypertrophy is accompaniedby activation of Na (+)˚H (+) exchange and prevented by Na (+)˚H (+)exchange inhibition. Circ Res. 2000;87:1133˚40.

19) Rasmussen M, Juel C, Nordsborg B. Exercise-induced regulation of muscular Na-K pump, FXYD1, and NHE1mRNA and protein expression: importance of training status, intensity,and muscle type.Am J PhysiolRegulIntegr Comp Physiol. 2011;300:1209-20.

20) Juel C. Skeletal muscle Na+/H+ exchange in rats: pH dependency and the effect of training. ActaPhysiol Scand.1998b;164:135˚40.

21) Juel,C. Expression of The Na/H Exchanger Isoform NHE1 in Skeletal Muscle and Effect of Training .ActaPhysiol Scand. 2000 ;170:59-63.

22) Le ˚ Prigent, K, Lagadic-Gossmann, D, Feuvray, D. Modulation byextracellular pH and intracellular calcium of Na/H exchange in diabetic rat isolated ventricular myocytes. Circ Res.1997;80:253˚60.

23) Juel C, Mads K H, Dela F. Effect of Strenght Training on Muscle Lactate Release and MCT1 and MCT4 Content in Healthy and Type 2 Diabetic Humans.J Physiol. 2004;55:297-304.

24) McKenna M J, Harmer A R, Fraser S F, Li J L. Effects of training on potassium, calcium and hydrogen ion regulation inskeletal muscle and blood during exercise. ActaPhysiol Scand. 1996;156:335˚46.

25) Brooks G A , White T P. Determination of metabolic and heart rat responses of rats to treadmill exercise. J Appl Physiol.1978;45:1009˚15.

26) Kristensen J M, Kristensen M, Juel C. Expression of Na+/HCO3) co-transporter proteins (NBCs)in rat and human skeletal muscle. ActaPhysiol Scand. 2004;182: 69-77.
27) Darmellah D. Enhanced activity of myocardial na/h exchanger contribute to left ventricular hypertrophy in GOTO-KAKIZAKIrat model of type 2 diabetes: critical role of Akt.diabetologia.2007;50:1335-44.
28) Bertrand B, Wakabayashi S, Ikeda T, Pouyssegur J, Shigekawa M. The NaH exchanger isoform _NHE 1 is a novel member of thecalmodulin-binding proteins. Identification and characterization ofcalmodulin-binding sites. J Biol Chem.1994;269:13703˚9.

ارجاع دهی به روش ونکوور:

منظمی امیرعباس، رجبی حمید، قراخانلو رضا. تاثیر تمرین استقامتی بر بیان ژن های مبادله گر سدیم هیدروژن۱ (NHE1) و هم انتقال دهنده سدیم بی کربنات۱ (NBC1) در عضلات اسکلتی رت. فیزیولوژی ورزشی. تابستان ۱۳۹۳؛ ۶(۲۲):۶۸-۵۵.

پژوهشگاه علوم انسانی و مطالعات فرهنگی
پرتال جامع علوم انسانی

The effect of endurance training on skeletal muscle sodium bicarbonate cotransporter1(NBC1) and sodium proton exchanger1(NHE1) gene expression in rat

A. Monazzami[1], H. Rajabi[2], R. Ghrakhanlou[3]

1. Assistance professor at University of Kermanshah*
2- Associated professor at kharazmi University of Tehran
3: Associated professor at Tarbiat Modares University of Tehran

Received date: 2013/07/22 **Accepted date: 2013/09/29**

Abstract

The purpose of this study was to investigate the effect of endurance training on muscle NHE1 and NBC1 gene expression in rat. Male vistar rats (n=20), 4weeks age and 95.7±10.8g in weight were selected and divided into control and training groups randomly. Endurance training were performed for 7weeks that be started with relatively low speed and duration (20m min and 20 min respectively) in the first week and reached to 30m min and 35min gradually in the last week. NHE1 and NBC1 gene expression determined by Real time-PCR technique in Soleus as a red (oxidative) and EDL as a white (glycolytic) muscle preparation. The between groups differences in variables were determined by independent t-test through REST software .NHE1 mRNA increased in EDL and Soleus by 74% and 51% in trained group in compare with control respectively (P<0/05). NBC1 mRNA expression was also increased in EDL and Soleus by 62% and 41% in trained group, respectively, but not significant in Soleus (P<0/05). In conclusion, these result showed that endurance training increased NHE1 and NBC1 mRNA expression in both oxidative and glycolytic fibers , Therefore endurance training may improve the capacity for pHi regulation in muscles by lactate independent pathway and these increases depend on transporter and fiber-type specify that are most important in pH regulation.

Keywords: pHi regulation, gene expression, Na/H Exchanger, Na/HCO3 cotransporter, Endurance training.

* Corresponding author E-mail: monazzami.amirabbas@gmail.com