

علوم زیستی ورزشی - تابستان ۱۳۹۵
دوره ۸، شماره ۲، ص: ۱۶۹-۱۷۶
تاریخ دریافت: ۱۳/۰۲/۹۳
تاریخ پذیرش: ۰۷/۰۶/۹۴

تأثیر هشت هفته تمرینات تناوبی شدید بر بیان ژن‌های PGC-1 α و VEGF در عضله قلبی رت‌های نر سالم

مریم شعبانی^۱ - سیروس چوبینه^{۲*} - محمدرضا کردی^۳ - مرجان افغان^۴

۱. مربی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد هشتگرد، البرز، ایران ۳۰۲. دانشیار، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران ۵۰۴. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه شهید رجایی، تهران، ایران

چکیده

این تحقیق با هدف تعیین تأثیر هشت هفته تمرین تناوبی شدید بر بیان ژن VEGF و PGC-1 α در عضله قلبی رت‌های نر سالم انجام گرفت. دوازده سر رت نر بالغ از نژاد ویستار به دو گروه آزمون (تمرین تناوبی شدید) و کنترل تقسیم شدند. گروه آزمون، به مدت هشت هفته و هر هفته پنج جلسه، تمرینات شامل دویدن با شدت ۹۰-۱۰۰ درصد VO_{2max} را به مدت ۴ دقیقه روی نوار گردان انجام دادند و همزمان، گروه کنترل به مدت پانزده دقیقه روی تردمیل با سرعت دو متر در دقیقه قرار گرفتند. در روز بعد از آخرین جلسه، رت‌ها تشریح و نمونه‌ها به منظور استخراج RNA به آزمایشگاه منتقل شدند. بیان ژن PGC-1 α و VEGF در گروه آزمون نسبت به گروه کنترل به ترتیب $P=0/79$ و $P=0/29$ برابر بود. نتایج نشان‌دهنده افزایش غیرمعنادار میزان بیان ژن PGC-1 α و VEGF در عضله قلب در پی هشت هفته تمرین تناوبی با شدت بالاست.

واژه‌های کلیدی

تمرین تناوبی شدید، عضله قلبی، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی، فعال‌کننده تکثیر پروکسی زوم آلفا.

مقدمه

میتوکندری‌ها، شرکت‌کننده‌های ثابت در پیام‌رسانی سلولی‌اند که به آپتوزیس (مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده) منجر می‌شوند. افزایش تعداد و اندازه میتوکندری که توده میتوکندریایی خوانده می‌شود، احتمالاً مهم‌ترین سازگاری درازمدت افزایش استقامت عضلانی است. بیوژنز میتوکندریایی یعنی هر گونه افزایش در تعداد و توده میتوکندری یا میزان آنزیم‌ها و جایگاه‌های سیتوکروم اکسیداز که سبب افزایش عملکرد میتوکندری‌ها و میزان تولید ATP و متابولیسم چربی‌ها می‌شود (۳).

PGC-1^۱ یک گیرنده سلولی است و انتشار پروتئین‌های میتوکندریایی را تسهیل می‌کند. PGC-1 دو ایزوفرم آلفا و بتا دارد، البته هر دو آنها در این فرایند دخیل‌اند، ولی آلفا مهم‌تر است. گزارش شده است تمرینات هوازی می‌توانند آن را افزایش دهند (۵، ۸، ۹). PGC-1 مهم‌ترین تنظیم‌کننده در بیوژنز میتوکندریایی است که از طریق فعال کردن گروهی از عوامل انتقالی سبب افزایش بیوژنز میتوکندریایی شده و خود تحت تأثیر عواملی فعال می‌شود (۲). برای سنتز پروتئین PGC-1، ابتدا باید ژن PGC-1 در سلول عضلانی یا قلبی بیان و پس از رونویسی به محتوای پروتئینی سنتز شود (۱).

فرایند مهم دیگری که PGC-1 α در عضله اسکلتی تنظیم می‌کند، رگ‌زایی است. این نقش PGC-1 α را می‌توان ایفای نقش بین میزان تقاضا و عرضه تعبیر کرد. اشاره شد که با افزایش PGC-1 α محتوای میتوکندریایی و میزان سوخت‌وساز عضله افزایش می‌یابد و عضله به جریان خون بیشتری نیاز پیدا می‌کند. PGC-1 α این نیاز را از طریق تحریک مسیر پیام‌رسانی بتا آدرنرژیک تنظیم می‌کند و محتوای توده رگی عضله را افزایش می‌دهد. آنژیوژنز، فرایند افزایش چگالی مویرگ‌های بافتی از جمله عضله اسکلتی و قلبی است. ایجاد مویرگ، نیازمند تکثیر و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال مویرگی است. فاکتورهای رشد زیادی در فرایند آنژیوژنز درگیرند، اما بیشتر تحقیقات VEGF^۲ را مهم‌ترین فاکتور رشدی درگیر در این فرایند ذکر کرده‌اند. واسطه بین PGC-1 α و عامل رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) در این مسیر گیرنده آلفای وابسته به استروژن^۳ (ERR α) است؛ یعنی PGC-1 α از طریق افزایش ERR α سبب بیان VEGF در عضله اسکلتی می‌شود که در پی آن توده رگی عضله اسکلتی افزایش می‌یابد (۴).

^۱ Peroxisome proliferator receptor- co-activator-1

^۲ Vessel Endothelial Growth Factor

^۳ Estrogen-Related Receptor α

با توجه به اینکه افزایش چگالی مویرگی و بیوژنز میتوکندریایی در عضلات اسکلتی و همین‌طور بافت قلب، از مقدمات مهم توسعه توان هوازی و نیز پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها به‌شمار می‌رود، شناخت صحیح فعالیت‌های ورزشی که به بهترین شکل ممکن سبب بروز پدیده آنژیوژنز و بیوژنز میتوکندریایی می‌شوند، اهمیت بسزایی دارد. با وجود مطالعات متعدد در زمینه تأثیر فعالیت ورزشی بر بیان ژن‌های VEGF و PGC-1 α در بافت عضله اسکلتی، تا به حال تأثیر تمرین تناوبی شدید بر بیان عوامل نامبرده مطالعه نشده است. از این‌رو مطالعه حاضر با هدف تعیین تأثیر هشت هفته تمرین تناوبی شدید بر بیان ژن VEGF و PGC-1 α در عضله قلبی رت‌های نر سالم انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

در تحقیق حاضر که از نوع تجربی بنیادی بود، دوازده سر رت نر بالغ از نژاد ویستار از انستیتو پاستور با میانگین وزنی 180 ± 20 گرم و سن هشت هفته خریداری و به آزمایشگاه حیوانات دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه تهران منتقل شدند. سپس رت‌ها به مدت سه روز برای سازگاری با محیط و رسیدن به حد وزنی مطلوب ($+200$ گرم) نگهداری شدند. آشناسازی رت‌ها با پروتکل ورزشی تناوبی شدید با ۱۰ جلسه تمرین در دو هفته انجام گرفت.

نمونه‌ها به دو گروه آزمون (تمرین تناوبی شدید) و کنترل تقسیم شدند. حیوانات تحت چرخه خواب و بیداری (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و در دمای 22 ± 3 درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۴۰ تا ۶۰ درصد نگهداری شدند. آب حیوانات از طریق ظروف پلاستیکی مخصوص که روی در قفس قرار داشتند، تأمین شد و در طول پژوهش دسترسی به آب و غذا برای حیوان آزاد بود.

با توجه به دسترسی نداشتن به ابزار مستقیم مانند تجزیه و تحلیل گازهای تنفسی، با توجه به مطالعه هویدال و همکاران در سال ۲۰۰۷ (۶) پروتکل غیرمستقیم ولی با دقت زیاد به‌کار رفت. از این‌رو، مقدار VO_{2max} رت‌ها با توجه به سرعت دویدن روی نوار گردان تعیین شد. گروه آزمون، به مدت هشت هفته و هر هفته پنج جلسه، تمرینات مربوط را که شامل دویدن با شدت ۹۰ تا ۱۰۰ درصد VO_{2max} روی نوار گردان مخصوص جوندگان بود، در رأس ساعت مشخصی (۱۹ تا ۲۱) انجام دادند و در همین زمان، گروه کنترل برای یکسان‌سازی اثر استرس به مدت پانزده دقیقه روی تردمیل با سرعت دو متر در دقیقه قرار گرفتند. طرح پروتکل تمرین تناوبی شدید در این مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است. در دوره تمرین به هیچ عنوان از دستگاه شوک الکتریکی برای شرطی‌سازی حیوانات به دلیل انتقال استرس منفی به حیوان استفاده نشد. در زمان تمرین گروه آزمون، شیب تردمیل در هشت هفته تغییری نکرد (شیب

صفر درجه). کلیه جلسات تمرین در زیر نور قرمز (به علت قرار داشتن چرخه فعالیت آنها در تاریکی) انجام گرفت.

در روز بعد از آخرین جلسه تمرین، رت‌ها تشریح شدند. نمونه‌های بافت قلب از ناحیه ریشه آئورت جداسازی شده، بلافاصله در ازت مایع منجمد شدند، به طوری که فاصله زمانی بین جداسازی تا انجماد کمتر از سه دقیقه بود. سپس، این نمونه‌ها به منظور استخراج RNA به آزمایشگاه انتقال داده شدند. برای بررسی بیان ژن‌های PGC1 و VEGF با استفاده از تکنیک SYBER Green Real-time PCR (Pars Genome Real-time PCR kit)، ابتدا RNA تام سلولی از بافت‌ها به دقت استخراج شده و پس از حصول اطمینان از سالم بودن RNA استخراج شده، واکنش رونویسی معکوس انجام گرفت و cDNA تولید شد (Pars Genome microRNAs cDNA synthesis kit)، برای نمونه DNA الگو، با استفاده از پرایمرهای طراحی شده که در جدول ۲ آورده شده است، برای انجام واکنش PCR استفاده شد. برای تعیین میزان بیان نسبی گروه آزمون نسبت به گروه کنترل از نرم‌افزار REST نسخه ۲۰۰۹ استفاده شد. سطح معناداری $P < 0/05$ در نظر گرفته شد.

جدول ۱. طرح پروتکل تمرین تناوبی شدید

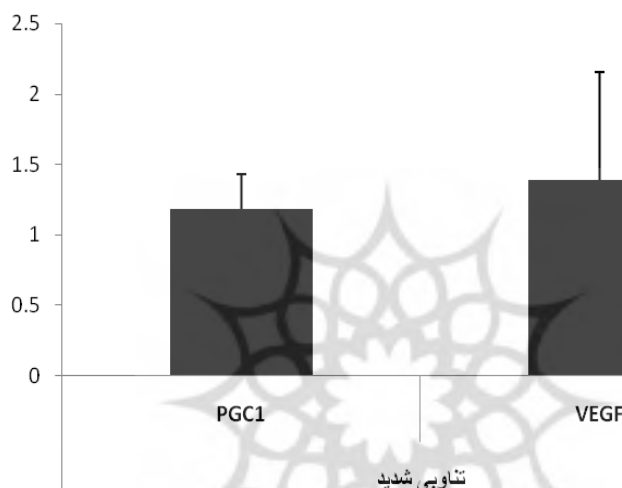
سرد کردن	بدنه اصلی تمرین (۳ تناوب)		گرم کردن	مراحل تمرین
	تناوب کم شدت	تناوب شدید		
۶ دقیقه	۲ دقیقه	۴ دقیقه	۶ دقیقه	زمان تمرین (دقیقه)
۵۰ تا ۶۰ درصد	۵۰ تا ۶۰ درصد	۹۰ تا ۱۰۰ درصد	۵۰ تا ۶۰ درصد	شدت تمرین (VO_{2max})

جدول ۲. توالی پرایمرهای ژن‌های PGC-1 α و VEGF

ژن	پرایمر Forward	پرایمر Reverse
PGC-1 α	ACCCACAGGATCAGAACAAACC	GACAAATGCTCTTTGCTTTATTGC
VEGF	ACTCCAGGGCTTCATCATTG	AATTGAGACCCTGGTGGACA

یافته‌های پژوهش

بیان ژن PGC1 در گروه آزمون نسبت به گروه کنترل ۱/۲ برابر بود که این افزایش از نظر آماری معنادار نبود ($P=0/79$). همچنین، بیان ژن VEGF در گروه آزمون نسبت به گروه کنترل ۱/۴ برابر بود که افزایش غیرمعناداری را نشان داد ($P=0/29$) (نمودار ۱).



نمودار ۱. بیان نسبی ژن‌های PGC1 و VEGF در گروه آزمون نسبت به کنترل

بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش تأثیر اجرای HIIT بر بیان ژن‌های PGC1- α و VEGF در بافت قلب رت‌های نر نژاد ویستار بررسی شد. نتایج نشان‌دهنده افزایش غیرمعنادار میزان بیان ژن PGC1- α و VEGF در عضله قلب در پی هشت هفته تمرین تناوبی با شدت بالاست. از آنجا که پژوهش حاضر نخستین پژوهش در زمینه تأثیر طولانی‌مدت اجرای HIIT بر بیان ژن‌های PGC1- α و VEGF در بافت قلب است، مطالعات مشابهی که بتوان نتایج آن را با یافته‌های این پژوهش مقایسه کرد، موجود نیست. از این‌رو، نتایج این پژوهش با یافته‌های مطالعاتی که میزان بیان ژن‌های نامبرده یا محتوای پروتئینی آنها را در عضله اسکلتی بررسی کرده‌اند، مقایسه شد.

در زمینه اجرای HIIT و بیوژنز میتوکندریایی چندین مطالعه انجام گرفته است که به‌طور معمول در آنها پاسخ یک وهله فعالیت یا تأثیر دو هفته تمرین بررسی شده‌اند. ترادا و همکاران در سال ۲۰۰۵

نشان دادند که یک وهله شنای تناوبی شدید بر بیان ژن پروتئین $PGC1-\alpha$ در عضله اسکلتی رت‌ها تأثیر افزایشی داشته است. فعالیت رت‌ها شامل ست‌هایی متشکل از فعالیت شدید ۲۰ ثانیه‌ای و به دنبال آن ۱۰ ثانیه استراحت بود. مشاهده شد محتوای $PGC1-\alpha$ در عضلات، بلافاصله پس از فعالیت ۱۰٪، پس از دو ساعت ۱۱۰٪، پس از ۶ ساعت ۱۴۰٪ و پس از ۱۸ ساعت ۱۱۰٪ افزایش داشته است (۱۰). همچنین، لیتل و همکاران در سال ۲۰۱۰ در تحقیقی تأثیر دو هفته اجرای HIIT را بر محتوای پروتئینی $PGC1-\alpha$ در عضلات هفت مرد جوان سالم بررسی کردند. در این پژوهش، آزمودنی‌ها شش جلسه تمرینی شامل هشت تا دوازده تکرار ۶۰ ثانیه‌ای با VO_{2max} ۱۰۰٪ (رکاب زدن) و ۷۵ ثانیه بازیافت را طی دو هفته انجام دادند. پس از دو هفته، از عضله پهن خارجی نمونه‌برداری شد و مشاهده کردند مقدار پروتئین $PGC1-\alpha$ هسته ۲۴ درصد افزایش یافت، اما محتوای آن در کل عضله تغییری نکرده بود. یکی از محدودیت‌های این پژوهش عدم امکان برداشت بافت (بایوپسی) بیشتر در انسان است که اندازه‌گیری رسوب پروتئینی بیشتر $PGC1-\alpha$ را امکان‌پذیر سازد (۸).

اشاره شد که با افزایش $PGC1-\alpha$ محتوای میتوکندریایی و میزان سوخت‌وساز عضله افزایش می‌یابد که عضله به جریان خون بیشتری نیاز پیدا می‌کند. واسطه بین $PGC1-\alpha$ و عامل رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) در این مسیر گیرنده آلفای وابسته به استروژن ($ERR\alpha$) است؛ یعنی $PGC1-\alpha$ از طریق افزایش $ERR\alpha$ موجب بیان VEGF در عضله اسکلتی می‌شود که به دنبال آن توده رگی عضله اسکلتی افزایش می‌یابد (۴).

با توجه به گزارش‌های حاضر و نتایج این پژوهش فعالیت ورزشی متناوب پرشدت می‌تواند بر بیان ژن VEGF و $PGC1-\alpha$ بافت قلب تأثیر مثبت بگذارد و سبب افزایش آن شود. هرچند افزایش این مقادیر در عضله قلب معنادار نبود، می‌توان گفت به دلیل اینکه قلب به بیشینه قابلیت اکسایشی خود رسیده و نیز تجمع لاکتات و در پی آن تغییرات اسیدی-بازی تأثیر کمتری بر کارکرد قلب می‌گذارد، این افزایش در قلب معنادار نبوده است (۱۱). به علاوه احتمالاً پروتکل تمرینی در پژوهش حاضر از دسته فعالیت‌های ورزشی محسوب می‌شود که کارکرد خود را بیشتر بر عضلات محیطی نشان می‌دهد و بر قلب فشار کمتری وارد می‌آورد و شاید بتوان گفت پروتکل تمرینی حاضر برای بهبود بیماری‌های قلبی مانند آترواسکلروز می‌تواند بدون وارد آوردن فشار زیاد بر قلب نتایج خوبی به همراه داشته باشد. این مطلب را لینکز و همکاران (۲۰۰۶) مبنی بر مفید و کاربردی بودن اجرای HIIT برای بیماران قلبی-عروقی تأیید کرده‌اند (۷).

با توجه به اینکه ظرفیت اکسایشی در حالت پایه در حداکثر است، به‌طور معمول علت اصلی محدودیت‌های توان هوازی را باید در مقاومت محیطی عضلات با ظرفیت اکسایشی کمتر جست‌وجو کرد. در ضمن عضلات اسکلتی را می‌توان محدودیتی در افزایش و بهبود عملکرد قلب دانست، چراکه هر زمانی برنامه ورزشی بخواهد فشار عمده‌ای بر قلب وارد کند و در پی آن سازگاری‌های فزاینده ایجاد شود، احتمالاً محدودیت و مقاومت عضلانی و همچنین خستگی عضلانی از این روند جلوگیری خواهد کرد و به‌ناچار شدت و میزان فشار با توجه به سطح توانایی کمتر عضله اسکلتی کاهش خواهد یافت. از طرفی شاید بتوان افزایش غیرمعنادار بیان ژن VEGF در عضله قلبی را به عوامل مؤثر در ایجاد VEGF مانند هایپوکسی نسبت داد. همان‌طور که گفته شد، تقریباً قلب به حداکثر میزان ظرفیت اکسایشی خود رسیده است، از این‌رو عواملی که می‌توانند در اثر هایپوکسی بافت در عضله اسکلتی سبب تحریک بیان ژن VEGF شوند (مانند HIF-1)، احتمالاً در قلب تأثیر چندانی نخواهند گذاشت. با این حال، به‌منظور اثبات این نظریه، انجام پژوهش‌های بیشتر درباره تأثیر تمرین تناوبی شدید بر بیان ژن‌های نامبرده در بافت قلب ضروری است.

منابع و مآخذ

1. Aoi, W., Naito, Y., Mizushima, K., Takanami, Y., Kawai, Y., Ichikawa, H., & Yoshikawa, T. (2010). "The microRNA miR-696 regulates PGC-1 α in mouse skeletal muscle in response to physical activity". *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 298(4), E799-E806.
2. Booth, F. W., Chakravarthy, M. V & Spangenburg, E. E. (2002). "Exercise and gene expression: physiological regulation of the human genome through physical activity". *Journal of Physiology* 543.2: 399-411.
3. Canto, C & Auwerx, J. (2009). "PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure". *Curr Opin Lipidol*. 20(2): pp: 98-105.
4. Chinsomboon J, Ruas J, Gupta R, et al. 2009. "The transcriptional coactivator PGC-1 α mediates exercise-induced angiogenesis in skeletal muscle. *Proceeding of the National Academy of Sciences*". 106(50), 21401-21406.
5. Coffey, V. G & Hawley, J. A. (2007). "The molecular bases of training adaptation." *Sports medicine*, 37(9): pp: 737-763.

6. Hoydal M A, Wisloff U, Kemi O J, et al. 2007. "Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training." *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation*. 14 (6), 753-760.
7. Lienkens S, De Clercq E, Neyts J, et al. 2001. "Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochemical Pharmacology*." 61(3): 253-70.
8. Little, J. P., Safdar, A., Wilkin, G. P., Tarnopolsky, M. A & Gibala, M. J. (2010). "A practical model of low-volume high-intensity interval training induces mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle: potential mechanisms." *J Physiol*. 588(6): pp: 1011-1022
9. Russell, A. P., Feilchenfeldt, J., Schreiber, S., Praz, M., Crettenand, A., Gobelet, C, et al. (2003). "Endurance Training in Humans Leads to Fiber Type-Specific Increases in Levels of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Coactivator-1 and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α in Skeletal Muscle." *Diabetes*. 52 (12): pp: 2874 –2881
10. Terada S, Kawanaka K, Goto M, et al. (2005). "Effect of high-intensity intermittent swimming on PGC-1 α protein expression in rat skeletal muscle." *Acta Physiologica Scandinavica*. 184(1), 59-65.
11. Urlik Wisloff A, Stoylen A, Loennechen J P, et al. (2007). "Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate continuous training in heart failure patient". *Circulation*, 115(24):3086-94.