Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 25, No.9, Dec 2017
Pages: 748-758

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۵، شماره ۹، آذر ۱۳۹۶
صفحه: ۷۵۸-۷۴۸

اثر تمرین تداومی و تناوبی در آب بر ژن Hand2 و توده قلب موش‌های نر ویستار

محمدعلی قرائت*[۱]، مجید کاشف[۲]، بهنام الدین جامعی[۳]، حمید رجبی[۴]

چکیده

مقدمه: هایپرتروفی فیزیولوژیک قلب در پی فعالیت بدنی با تغییراتی در توده قلب نمایان می‌گردد. این فعالیت‌ها موجب تغییر در بیان ژن‌های درگیر در این هایپرتروفی می‌شود و Hand2 یکی از این ژن‌هاست. پژوهش حاضر در پی یافتن اثر فعالیت‌های تداومی و تناوبی در آب بر بیان ژن Hand2 و توده قلب موش‌ها انجام گرفت.

روش بررسی: ۲۴ سر موش ویستار نر با وزن ۱۵/۷ ± ۲۲۹/۳۰ گرم در چهار گروه کنترل، شَم، تمرین تداومی و تناوبی به طور تصادفی قرار گرفتند. گروه تداومی ۱۲ هفته ۵ روز در هفته با افزایش مدت شناوری به طور فزاینده به شنا در حوضچه پرداختند. گروه تناوبی نیز ۱۲ هفته و ۴ روز در هفته با افزایش وزنه نسبت به وزن بدن و مدت زمان شنا نسبت به زمان استراحت به طور فزاینده به تمرین پرداختند. ۲۴ ساعت پس از آخرین تمرین، وزن قلب و بطن چپ و میزان بیان ژنHand2 اندازه‌گیری شد. برای ارزیابی داده‌ها از روش تحلیل واریانس یک سویه و آزمون تعقیبی شفه در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده شد.

نتایج: وزن قلب و بطن چپ در گروه‌های تمرینی به طور معنی‌داری بیشتر بود. میزان افزایش بیان ژن Hand2 نسبت به گروه کنترل در گروه شَم ۱/۰۵، تداومی ۶/۱۵ و تناوبی ۶/۷۶ برابر بود که این افزایش در دو گروه تمرین نسبت به گروه‌های شَم و کنترل معنی‌دار بود.

نتیجه گیری: در شرایط پژوهش حاضر انجام هر دو نوع تمرین موجب افزایش Hand2، وزن قلب و بطن چپ می‌شود. با توجه به صرف زمان کمتر در تمرین تناوبی، به نظر می‌آید این نوع تمرین مقرون به صرفه‌تر است.

واژه‌های کلیدی: هایپرتروفی قلب، فعالیت تداومی، فعالیت تناوبی، **Hand2**، موش ویستار

۱- دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی تهران
۲- استاد، گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی تهران
۳- استاد، گروه علوم پایه، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی ایران
۴- دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزش، دانشگاه خوارزمی تهران
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۱۶۳۰۰۵۸۵۸۶- ۴۹+، پست الکترونیکی: sharifnia. Ali.Gharaat@Tum.De

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۷/۲۰

مقدمه

هایپرتروفی فیزیولوژیک (Physiological Hypertrophy) در پاسخ به فعالیت بدنی منظم ایجاد می‌شود و افزایش فشار خون و مکانیزم فرانک استارلینگ (Frank- Starling Mechanism)، موجب راه‌اندازی سیگنال‌های هایپرتروفی دهنده می‌شود (۱). هایپرتروفی فیزیولوژیک به تغییر ساختار قلب، بیان ژن‌های هایپرتروفی قلب، افزایش سوخت و ساز و بهبود در عملکرد میوکارد می انجامد. به هر حال تجدید ساختار قلب مستلزم بیان بسیاری از ژن‌هایی است که در ساختار عضله قلب دخیلند (۳،۲).

بررسی اثر فعالیت‌های بدنی گوناگون (با توجه به شدت، زمان فعالیت، حجم و طول دوره) بر تغییرات هایپرتروفیک قلب نشان داده که هر دو نوع تمرین تداومی (Endurance Training) و تناوبی شدید (High Intensity Interval Training) مسیرهای سیگنال دهی مشابهی را فعال می‌نمایند که موجب افزایش محتوای میتوکندری عضله قلب، فعالیت پروتئین‌های انتقالی (همچون سیترات سنتاز و سیتوکروم C اکسیداز)، بیان پروتئین‌های انتقالی غشای پلاسما، محتوای گلیکوژنی و مصرف انرژی پس از تمرین می‌شوند (۴). ولی برخی محققان بیان نموده‌اند که فعالیت تناوبی شدید نسبت به فعالیت تداومی تحریک‌های قویتری برای راه‌اندازی سیگنال‌های سلولی فراهم می‌نماید (چون هایپوکسی و فشار مکانیکی شدیدتری به قلب وارد می‌کند). ضمن اینکه این تمرینات از لحاظ زمانی به صرفه تر و جذاب‌تر است (۶،۵).

بتازگی اثر فعالیت‌های گوناگون بدنی بر تغییرات ژنی و سلولی درگیر در هایپرتروفی قلب مورد توجه محققان قرار گرفته است. در این راستا پژوهشگران حوزه ژنتیک دریافته اند که تعداد زیادی فاکتور رونویسی در برنامه ریزی بیان ژن‌های ویژه بافت‌های مختلف از طریق تعامل‌های پیچیده سلولی درگیرند. زیر واحد Hand2 (Heart and Neural Crest Derivative Expressed 2) یکی از فاکتورهای درگیر در هایپرتروفی قلب است که در قلب و بافت‌های عصبی بیان می‌گردد (۸،۷). Hand2 در شکل‌گیری دیواره بین بطنی و حفره‌های قلب و قوس آئورت نقش ویژه دارد (۹) و سرکوب این ژن موجب نقص در توسعهٔ میوسیت‌های بطن می‌شود (۱۰). از طرفی در نارسایی عضله قلب نمونه‌های انسانی و هایپرتروفی نمونه‌های حیوانی، میزان بیان Hand2 کاهش می‌یابد که ممکن است نشانه ای از کاردیومیوپاتی (Cardiomyopathy) باشد (۸). از آنجا که هایپرتروفی شامل افزایش میزان سیتوپلاسم و محتوای آن بدون تقسیم سلولی است، ممکن است کاهش بیان Hand2 در بطن‌ها برای فراخوانی مجدد برنامه‌های ژنی دوره جنینی که موجب افزایش میزان سیتوپلاسم می‌شوند ضروری باشد. بنابراین، کاهش بیان Hand2 در قلب می‌تواند پیشگوی مناسبی برای ایجاد بیماری‌های قلبی باشد. همچنین کاهش بیان ژن Hand2 در "اضافه بار فشاری" بیشتر بوده که با افزایش بیان ژن ANP (Atrial Natriuretic Peptide) به عنوان نشانگر نارسایی قلبی همراه است (۱۱). در پژوهشی موش‌هایی که جلوی بیان Hand2 در آن‌ها گرفته شده بود دچار آتروفی شدید بطن راست شدند (۱۰) و عدم بیان آن در دوره جنینی جلوی هم کوشی با ژن GATA4 (Zinc Finger Containing Transcription Factor) را گرفته و منجر به بیماری نارسایی سپتوم بطنی مادرزادی شد (۱۲). همچنین مکانیزم افزایش بیان ژن ویژه هایپرتروفی قلب با تعامل بین GATA4 و Hand2 همراه شده و بوسیله تعاملات چندگانه با دیگر فاکتورهای رونویسی عمل می کند (۱۳). در فعالیت‌های بدنی، محققان دریافتند که پس از تمرین تداومی، مسیرهای سیگنالینگ درگیر با افزایش بیان Hand2 بسترهای لازم را برای رشد هماهنگ و تغییرات ساختاری متناسب در قلب و مویرگ‌ها فراهم می‌کند (۱۱).

هرچند این ژن در شکل‌گیری ساختار قلب نقش بسیار مهمی را به عهده دارد و در قلب هایپرتروفی شده دستخوش تغییر می‌شود، اما هنوز پاسخ آن به فعالیت‌های مختلف بدنی همچون تناوبی و تداومی چندان روشن نیست. لذا با توجه به تحقیقات اندک در بررسی ارتباط بین این فاکتور و نقش احتمالی فعالیت‌های ورزشی گوناگون بر این مسیر و اندازه قلبی، محقق بر آن بود تا به بررسی نقش دو نوع تمرین تداومی و تناوبی شدید بر Hand2 بعنوان یک مسیر درگیر در هایپرتروفی فیزیولوژیک قلب بپردازد.

روش بررسی

تحقیق حاضر از نوع تجربی بود که به همین منظور، ۲۴ سر موش سالم ویستار نر بالغ با سن ۳ ماه و میانگین وزن ۱۵/۷ ± ۲۲۹/۳۰ گرم از انیستیتو پاستور ایران خریداری گردیده و طبق پیشنهادات تحقیقات پیشین روی حیوانات (۱۱) در چهار گروه کنترل (n=۶)، شَم (n=۶)، تمرین تداومی (n=۶) و تمرین تناوبی (n=۶) بطور تصادفی قرار گرفتند. برای همه آن‌ها شرایط مناسب آزمایشگاهی (دسترسی آزاد به آب و غذا (پلِت) مخصوص موش، چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت، میانگین دما ۲± ۲۱ درجه سانتی‌گراد) به صورت یکسان در حیوان‌کده دانشکده علوم ورزشی دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی تهران فراهم شد. در این مدت رت‌ها در قفس‌های ۳ تایی یکسان نگهداری شدند.

پروتکل تمرینی: کلیه تمرین‌ها در حوضچه‌های مجزا برای هر موش با عمق ۶۰ سانتی‌متر و قطر ۳۰ سانتی‌متر (ساخت شرکت دانش سالار ایرانیان (Danesh Salar Iranian Co)) و دمای ۱ ± ۳۲ درجه سانتی گراد آب انجام شدند، در حالیکه یک موتور کوچک در زیر آب، تلاطم لازم جهت چرخش آهسته آب را ایجاد می‌نمود. پس از انجام آشنایی اولیه موش‌ها با حوضچه و جریان آب متلاطم بمدت یک هفته، گروه تمرین تداومی برای ۳ ماه ۵ روز در هفته (شنبه، یکشنبه، دوشنبه، چهارشنبه و پنج شنبه) به طور تداومی فزاینده طبق جدول به شنا در حوضچه پرداختند. گروه تمرین تناوبی نیز بر اساس پروتکل فزاینده تمرین نمود که در جدول قابل مشاهده است. گروه شَم در هر روز تمرینی به مدت ۳ دقیقه در آب غیر متلاطم قرار داده می‌شد تا اثر احتمالی استرس آب بر نتایج تحقیق حاضر مشاهده گردد. گروه کنترل در این ۳ ماه، هیچگونه تمرینی انجام نداد. روش تمرین با نظر به شیوه‌های بکار رفته در تحقیق ترادا و همکاران (۲۰۰۴) و دی روخا و همکاران (۲۰۱۴) و توسط محقق طراحی گردید (۱۵، ۱۴). ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه ی تمرین ورزشی، موش‌ها پس از ۱۲ ساعت ناشتایی از طریق تزریق داخل صفاقی ماده کتامین و زایلازین (Ketamine- Xylasine) بیهوش شدند. تحقیقات متعدد برای ارزیابی میزان هایپرتروفی قلب از ارزیابی نسبت وزن بطن چپ به وزن کل قلب و وزن بدن، وزن بطن چپ و وزن کل قلب به وزن بدن و سطح رویه بدن استفاده کرده‌اند (۱۶،۲). بنابراین برای تأیید میزان هایپرتروفی، در این پژوهش از این شاخص‌ها برای نسبی کردن وزن بطن چپ (نرمالایز) استفاده شد. برای این کار، در حالت بیهوشی وزن (W) به گرم و طول بدن حیوان (L) به سانتی‌متر از دهان تا ابتدای دم برای محاسبه سطح رویه بدن (Body Surface Area) BSA اندازه‌گیری شد (معادله ۱). همچنین طول استخوان درشت نی حیوان با استفاده از کولیس اندازه‌گیری شد. سپس قلب حیوان از شکاف ناحیه سینه خارج و بطن چپ نیز جدا شد که هر دو آن‌ها (قلب و بطن) وزن شد. BSA موش‌ها با استفاده از فرمول زیر برآورد شد. برای محاسبات مورد نظر از برنامه Excel استفاده شد. بافت بطن چپ بلافاصله در تانک ازت قرار داده شد و برای استخراج RNA (Ribonucleic Acid) به فریزر - 80 درجه منتقل گردید.

معادله ۱

$$BSA=6.67\times W0.7\times[0.34/(\sqrt[3]{W/L})]$$

جدول ۱: پروتکل تمرینی ۱۲ هفته ای شنا در دو گروه تمرین تداومی و تناوبی در آب

تداومی		تناوبی				
هفته	مدت به دقیقه	هفته	مدت فعالیت	مدت استراحت	تعداد تکرار	وزنه (درصد وزن بدن)
۱	۳۰	۱	۱دقیقه	۱ دقیقه	۵	۲-۵ ٪
۲	۴۵	۲	۱ دقیقه	۱ دقیقه	۵	۷ ٪
۳	۶۰	۳	۱ دقیقه	۱ دقیقه	۵	۸ ٪
۴	۶۰	۴	۱ دقیقه	۱ دقیقه	۵	۱۰ ٪
۵	۶۰	۵	۲۰ ثانیه	۱۰ ثانیه	۱۴	۱۳ ٪
۶	۶۰	۶	۲۰ ثانیه	۱۰ ثانیه	۱۴	۱۴ ٪
۷	۶۰	۷	۲۰ ثانیه	۱۰ ثانیه	۱۴	۱۵ ٪
۸	۶۰	۸	۲۰ ثانیه	۱۰ ثانیه	۱۴	۱۶ ٪
۹	۶۰	۹	۲۰ ثانیه	۱۰ ثانیه	۱۴	۱۶ ٪
۱۰	۶۰	۱۰	۲۰ ثانیه	۱۰ ثانیه	۱۴	۱۶ ٪
۱۱	۷۵	۱۱	۲۰ ثانیه	۱۰ ثانیه	۱۶	۱۶ ٪
۱۲	۷۵	۱۲	۲۰ ثانیه	۱۰ ثانیه	۱۶	۱۶ ٪

استخراج RNA و بررسی بیان ژن توسط RT- PCR (Polymerase Chain Reaction Real Time): مراحل استخراج RNA طبق دستورالعمل شرکت ترانس ژن بیوتک انجام شد. ابتدا میزان ۵۰ میلی گرم بافت منجمد بطن چپ موش از ناحیه دیواره پشتی توسط تیغ جراحی اولتراتوداکس T۲۱ برداشت گردید و پس از اضافه نمودن ۱ میلی لیتر محلول ترایزول و هموژن کردن با دسته هموژنایزر، ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس محلول به دست آمده را ۳۰ ثانیه بشدت تکان داده و ۰/۲ میلی‌لیتر کلروفرم سرد به آن اضافه نموده و پس از انجام پیپتاژ، ۳ دقیقه در دمای اتاق قرار دادیم. بعد از سانتریفیوژ نمودن با دور G۱۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه، رویه شفاف را به میکروتیوب جدید انتقال دادیم (تقریباً ۰/۵ میلی‌لیتر). ۰/۵ میلی‌لیتر ایزوپروپانول را به این محلول اضافه نموده و پس از ۱۰ دقیقه انکوبه نمودن در دمای اتاق، ۱۰ دقیقه با دور G۱۰۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتریفیوژ کردیم. محلول روی میکروتیوب را کاملاً خالی نموده و محتوای میکروتیوب را خشک نمودیم (پلِیت RNA در انتهای میکروتیوب قابل مشاهده بود). در ادامه، ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵٪ را درون میکروتیوب ریخته و بشدت تکان دادیم تا مخلوط شود. سپس به مدت ۵ دقیقه در سانتریفیوژ با دور G ۷۵۰۰ قرار دادیم. محلول روی نمونه را خالی نموده و برعکس قرار دادیم تا کاملا خشک شود. در نهایت، ۰/۰۵ میلی لیتر آب مقطر به محلول اضافه نموده و بمدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۵-۶۰ درجه سانتی‌گراد در دستگاه سانتریفیوژ قرار دادیم.

غلظت RNA با روش نانودراپ ۱۰۰۰ (Thermo Scientific, Waltham) به روش طیف سنجی مورد سنجش قرار گرفت و در نسبت طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر، میزان ۱/۸ تا ۲ ng/ul به عنوان میزان تلخیص مطلوب در نظر گرفته شد. سپس سنتز cDNA با بکارگیری پروتکل شرکت بیوفکت (BIOFACT) انجام پذیرفت. با توجه به طول توالی RNA از Random Hexamer به عنوان پرایمر استفاده شد. ترموسایکلر مورد استفاده متعلق به شرکت اپندورف (eppendorff) آلمان بود. میزان مورد نیاز از RNA هر نمونه با توجه به غلظت نمونه در دستگاه نانودراپ و تقسیم نمودن عدد ۲ بر میزان غلظت خوانده شده بدست آمد. سپس ۱۰ میکرولیتر از محلول پری میکس ساخت شرکت بیوفکت به هر نمونه اضافه گردید و حجم محلول توسط آب مقطر به ۲۰ میکرولیتر افزایش یافت. از محصول به دست آمده جهت انجام RT- PCR استفاده شد.

روش انجام RT-PCR: جهت آماده سازی نمونه و قراردهی آن در دستگاه مدل کوربت (روتور ژن ۶۰۰۰) (Corrbett)،

میزان ۱ میکروگرم از cDNA هر نمونه با ۵ میکروگرم محلول سایبرگرین (Cyber Green) شرکت بیوفکت، ۳/۵ میکروگرم آب خالص (DEPS) و ۰/۵ میکروگرم پرایمر Hand2 به عنوان ژن هدف (Target Gene) یا پرایمر ژن β– actin به عنوان ژن مرجع (Reference Gene) (۰/۲۵ میکروگرم Forward و ۰/۲۵ میکروگرم Reverse) طراحی شده در آزمایشگاه جامع تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی تهران مخلوط گردید و بصورت دوگانه (Duplicate) در دستگاه قرار داده شد (اطلاعات پرایمرها در جدول ۲ مشاهده می‌شود). در تمام مراحل از سمپلرهای شرکت eppendorff استفاده گردید. سپس از پروتکل ۲ مرحله ای کیت بیوفکت به صورت اعمال ۱۵ دقیقه دمای ۹۵ درجه، ۲۰ ثانیه ۹۵ درجه، ۳۰ ثانیه AT با دمای ۶۰ درجه، ۳۰ ثانیه ۷۲ درجه و دمای Melt نیز ۵۵ تا ۹۵ درجه استفاده گردید. رسم منحنی ذوب با اندازه‌گیری تغییرات میزان فلوروسانس در بازه زمانی متفاوت با RT-PCR صورت پذیرفت.

جدول ۲: مشخصات طراحی پرایمرهای بکار رفته

نام تجاری نوکلئوتید	جهت	توالی	جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر	دمای ذوب
Hand2	F	GACACCAAACTCTCCAAA	۳	۵۱/۴۱
	R	TTCTTCCTCTTCTCCTCT	۳	۵۱/۴۱
β– actin	F	GGAGAAGATTTGGCACCACAC	۳	۵۵/۶
	R	GGATGGCTACGTACATGGCTG	۳	۵۵/۶

پس از پایان واکنش و تعیین خط آستانه، سیکل آستانه (Ct) هر نمونه بدست آمد. از نسبت سیکل آستانه ژن هدف با ژن مرجع (β– actin)، میزان بیان نسبی ژن Hand2 از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ به دست آمد. ابتدا سیکل آستانه ژن هدف هر نمونه از سیکل آستانه ژن مرجع همان نمونه کم گردید.

$\Delta Ct = Ct\ Target - Ct\ Reference$

در مرحله بعد ΔCt هر نمونه تمرین یافته از نمونه کنترل کم گردیده و منفی عدد به دست آمده را به توان ۲ رسانده و بیان نسبی ژن Hand2 را در هر دو گروه مداخله تمرینی و شَم نسبت به گروه کنترل به دست آوردیم.

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct\ Target - \Delta Ct\ Reference$

$Final\ Change\ Fold = 2^{-\Delta\Delta Ct}$

در نهایت با استفاده از نتایج به دست آمده، پروفایل مربوط به بیان ژن Hand2 نسبت به ژن β– actin ترسیم شد و میزان افزایش گزارش شد. کلیه مراحل بر اساس پروتکل اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی ایران با کد IUMS,95,06,10,04 و مطابق با توافق نامه هلسینکی انجام گرفتند.

روش آماری: دربخش آمارتوصیفی برای توصیف داده‌ها از شاخص‌های گرایش مرکزی و انحراف استاندارد استفاده شد. برای بررسی اثر تمرین بر میزان تغییرات بیان ژن و اندازه‌های نسبی قلب از آزمون تحلیل واریانس یک سویه (One-Way ANOVA) در نرم‌افزار SPSS21 استفاده شد که در صورت معنی‌دار بودن مقدار F، از آزمون تعقیبی شفه (Scheffe) در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ بهره گرفتیم.

نتایج

میانگین شاخص‌های وزن پایانی بدن (BW: Body Weight)، وزن قلب (HW: Heart Weight)، وزن بطن چپ (LVW: Left Ventricle Weight)، نسبت وزن بطن چپ به وزن بدن (LVW/BW) و سطح رویه بدن (LVW/BSA) در جدول ۳ قابل مشاهده است. گرچه میانگین وزن گروه کنترل از دیگر گروه‌ها بیشتر بود، ولی این تفاوت بین گروه‌ها معنی‌دار نبود. در بررسی وزن کل قلب، این شاخص در گروه‌های تداومی و تناوبی بطور معنی‌داری بیشتر از گروه شَم (به ترتیب P=۰/۰۴، P=۰/۰۴، F= ۶/۵) و گروه کنترل (به ترتیب P=۰/۰۱، P=۰/۰۱۷، F= ۶/۵) بود. وزن بطن چپ در گروه تداومی

نسبت به دو گروه شَم (P=۰/۰۴، F=۶/۷) و کنترل (P=۰/۰۱، F= ۶/۷) تفاوت معنی‌داری داشت. همچنین تفاوت در گروه تناوبی با کنترل (P=۰/۰۱، F=۶/۷) معنی‌دار بود. نسبت وزن بطن چپ به وزن بدن در هر دو گروه تداومی و تناوبی نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود (به ترتیب P=۰/۰۱، P=۰/۰۱، F= ۵/۴). همچنین نسبت وزن بطن چپ به سطح رویه بدن در دو گروه تداومی و تناوبی نسبت به دو گروه شَم و کنترل تغییر معنی‌داری را نشان داد (به ترتیب P=۰/۰۳، P=۰/۰۴).

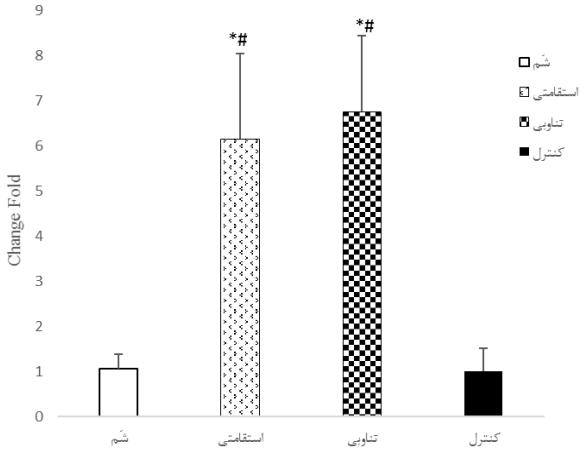
جدول ۳: مقادیر میانگین و انحراف استاندارد وزن پایانی بدن (BW)، وزن بطن چپ بر سطح رویه بدن (LVW/BSA)، وزن قلب (HW)، وزن بطن چپ (LVW) و نسبت وزن بطن چپ به وزن بدن (LVW/BW) در گروه‌های مختلف

گروه‌های تمرین (میانگین و انحراف استاندارد)	BW (گرم)	HW (میلی گرم)	LVW (میلی گرم)	LVW/BW (میلی گرم بر گرم)	LVW/BSA (گرم بر سانتیمتر مربع)
گروه شَم	۳۱۰/۳ ± ۲۶/۷	۱۱۰۵/۶ ± ۶۸/۵	۷۲۷/۰ ± ۵۰/۲	۲/۳ ± ۰/۲	۰/۶۸ ± ۰/۱۱
گروه تداومی	۳۰۸/۰ ± ۲۶/۷	#*۱۲۳۸/۶ ± ۶۸/۵	# *۸۱۵/۵ ± ۵۰/۲	* ۲/۶ ± ۰/۲	#* ۰/۷۶ ± ۰/۱۲
گروه تناوبی	۳۰۰/۰ ± ۲۳/۵	#* ۱۲۴۱/۶ ± ۶۱/۴	* ۷۹۷/۳ ± ۴۸/۵	* ۲/۶ ± ۰/۱	#* ۰/۷۵ ± ۰/۱۱
گروه کنترل	۳۲۷/۰ ± ۲۴/۵	۱۰۷۳/۸ ± ۹۲/۰	۶۹۱/۶ ± ۶۲/۴	۲/۱ ± ۰/۰۸	۰/۶۳ ± ۰/۱۰

* در سطح ۰/۰۵ با گروه کنترل اختلاف معنی‌دار است.

در سطح ۰/۰۵ با گروه شَم اختلاف معنی‌دار است.

در بررسی نتایج حاصل از بیان ژن بین گروه‌ها با توجه به در نظر گرفتن میزان بیان ژن گروه کنترل به عنوان عدد ۱، میزان برابری (Change Fold) بیان ژن Hand2 در گروه شَم ۱/۰۵، در گروه تداومی ۶/۱ و در گروه تناوبی ۶/۷ بود. همانگونه که در شکل ۱ مشاهده می‌کنید، تفاوت‌های بیان ژن بین گروه‌ها معنی‌دار بود (P=۰/۰۰، F= ۲۰/۷). این تفاوت‌ها در هر دو گروه تمرین تداومی (P=۰/۰۰)، تمرین تناوبی (P=۰/۰۰) نسبت به گروه شَم و گروه کنترل مشاهده شد. ولی تفاوت بین گروه تمرین تداومی با تمرین تناوبی، همچنین بین گروه تمرین کنترل با گروه شَم در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار نبود.



شکل ۱: تفاوت میزان بیان ژن Hand2 در گروه تمرین تناوبی، تداومی و شَم نسبت به گروه کنترل پس از ۱۲ هفته تمرین شنا در موش‌های نر

بحث

این پژوهش نشان داد میزان بیان ژن Hand2 در اثر فعالیت در هر دو گروه تمرین به میزان معنی‌داری افزایش می‌یابد. همچنین میزان هایپرتروفی قلب و بطن چپ افزایش معنی‌داری نشان داد.

در پژوهش حاضر، هر دو نوع تمرین تداومی و تناوبی افزایش معنی‌داری در وزن قلب نسبت به گروه کنترل و شَم ایجاد نمودند. همچنین وزن بطن چپ در گروه تداومی نسبت به هر دو گروه کنترل و شَم به طور معنی‌داری بیشتر بود. وزن بطن چپ در گروه تناوبی نیز به طور معنی‌داری بیش از گروه کنترل بود. در بررسی نسبت وزن بطن چپ به وزن بدن و سطح رویه بدن، تفاوت گروه کنترل و شَم با هر دو گروه تمرینی معنی‌دار بود. این یافته‌ها با نتایج فتحی و همکاران (۱۳۹۴) که عدم تفاوت معنی‌دار در وزن قلب و بطن چپ را در پی تمرین تداومی مشاهده نمودند همخوانی ندارد (۹). از آنجا که پروتکل تمرینی پژوهش ذکر شده روی تردمیل تعریف شده، ممکن است تفاوت در شیوه تمرین دلیلی برای نتایج غیر یکسان باشد. ولی ترادا و همکاران (۲۰۰۴) بیان نمودند که تمرین تناوبی در آب موجب افزایش وزن قلب نسبت به گروه تمرین کم شدت و کنترل می‌شود (۱۴). همچنین مدیروس و همکاران (۲۰۰۴) افزایش ۱۳ درصدی در وزن بطن چپ موش‌ها در پی ۸ هفته فعالیت استقامتی ۶۰ دقیقه‌ای در آب مشاهده کردند (۱۷) که با نتایج حاضر همسو است. داسیلوا و همکاران (۲۰۱۲) نیز پس از اعمال ۱۰ هفته برنامه تداومی با وزنه در آب، افزایش ۳۰ درصدی را در نسبت وزن بطن چپ به وزن بدن گزارش نمودند که آن‌را به سازگاری قلبی ناشی از تمرین نسبت دادند (۱۸). تحقیقاتی نیز بر افزایش اندازهٔ بطن‌ها در پی فعالیت استقامتی نسبت به گروه بی تحرک تاکید دارند (۲۰، ۱۹، ۱)، تمریناتی که هایپرتروفی اسنتریک را ایجاد می‌کنند (۲۱). از طرفی، عدم تفاوت معنی‌دار بین گروه تناوبی با تداومی در پژوهش حاضر با نتایجی که حاکی از سیگنال دهی سلولی قویتر فعالیت تناوبی شدید نسبت به فعالیت‌های تداومی و ایجاد تفاوت‌های بیشتر در ساختار قلبی در پی تمرین تناوبی است همخوانی ندارد (۲۳،۲۲). این تفاوت ممکن است ناشی از اختلاف بین پروتکل شنا در پژوهش حاضر و دویدن در پژوهش‌های مذکور باشد. ولی از آنجا که کل زمان تمرین در گروه تناوبی به طور چشمگیری کمتر از گروه تداومی است، می‌توان به مزیت این نوع تمرین در پژوهش حاضر پی برد (۲۴). برخی پژوهش‌ها در همین راستا بیان داشته‌اند که تمرینات تناوبی از لحاظ زمانی به صرفه تر است و بدلیل جذابیت بیشتر، میل به ادامه آن‌ها نسبت به تمرین‌های مداوم استقامتی بیشتر است (۲۵، ۶، ۵). در بررسی نسبت وزن بطن چپ به وزن کل بدن، هر دو گروه تمرینی نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نشان دادند. این تفاوت با نتایج فتحی و همکاران (۱۳۹۴) که تفاوت معنی‌داری در نسبت بطن چپ به وزن بدن و BSA در گروه تمرینی مشاهده نمودند همخوانی دارد (۹).

همانگونه که در بررسی نتایج بیان ژن نشان دادیم، میزان بیان ژن Hand2 در هر دو گروه تمرینی بیش از گروه کنترل و شَم بوده است. تحقیقات بسیاری بر اثرات مثبت این ژن در هایپرتروفی عضله قلب و اثرات منفی عدم وجود آن تاکید داشته‌اند. بر همین اساس، افزایش میزان Hand2 در پی فعالیت بدنی قابل انتظار بود. تاتالیاس و همکاران (۲۰۰۲) در تحقیق خود روی موش‌ها دریافتند که میزان این ژن در هایپرتروفی پاتولوژیک ابتدا به مقدار کمی افزایش می‌یابد و با گذشت چند روز (بعد از پنج روز) میزان آن به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. ژن Hand2 در دوران رشد و همچنین پس از آن در انسان نیز همانند موش‌ها بیان می‌گردد (۸، ۲۸،۲۷).

فتحی و قراخانلو (۱۳۹۴) در پژوهشی به بررسی اثر تمرین استقامتی بر بیان این ژن پرداختند. مشاهدات آن تحقیق با مشاهدات حاضر در جهت افزایش معنی‌دار ژن Hand2 در پی فعالیت ورزشی و بهبود ساختار قلب و بطن چپ همراستا است (۱۱). عدم تفاوت معنی‌دار در میزان بیان ژن Hand2 بین گروه شَم و گروه کنترل ممکن است اثرات احتمالی استرس آب بر میزان تفاوت‌های ناشی از فعالیت‌های تداومی و تناوبی در بیان ژن را نفی کند. این یافته می‌تواند تاییدی بر شباهت تغییرات ایجاد شده هنگام تمرین در آب با تمرینات روی تردمیل باشد (۲۶، ۱۷، ۱۵، ۱۴).

وزن بدن موش‌ها در انتهای دوره تمرین هر گروه نسبت به آغاز تمرین همان گروه تغییر معنی‌داری داشت که می‌تواند بدلیل طی کردن روند بلوغ باشد. در انتهای دوره تمرینی گرچه

تفاوت وزنی بین گروه‌ها معنی‌دار نبود، کمترین وزن را گروه تمرین تناوبی و پس از آن گروه تمرین تداومی داشت. این نتایج با یافته‌های فتحی و همکاران (۱۳۹۴) و داسیلوا و همکاران (۲۰۱۲) همراستا است (۱۸، ۹). همانگونه که در پژوهش‌های مختلف اثرات تمرین در کنترل وزن نشان داده شده، انتظار می‌رود کاهش غیرمعنی‌دار وزن در دو گروه تمرینی نیز در راستای اثرات مثبت تمرین در کنترل وزن باشد (۱۴).

در بررسی پژوهش‌های پیشین، مطالعه‌ای که در زمینه اثرات تمرین تناوبی بر بیان ژن Hand2 تمرکز نموده باشد یافت نشد. از آنجا که مزیت‌های این نوع تمرین در زمینه‌های فیزیولوژیکی (۵، ۶، ۱۴، ۲۴، ۲۵، ۲۹) و نیز در تسریع بازتوانی قلبی (۳۰) گاهی بر تمرین استقامتی نشان داده شده و برخی دیگر بر مشابهت اثرات فیزیولوژیک در پی این دو نوع فعالیت اشاره دارند (۴)، لذا افزایش بیان ژن Hand2، وزن قلب و بطن چپ نزدیک به گروه تداومی با هزینه کرد زمان کمتر نسبت به تمرین تداومی در پژوهش حاضر می‌تواند به عنوان دستاورد اصلی این پژوهش مورد توجه قرار گرفته و بر مزیت نسبی تمرین تناوبی نسبت به تمرین تداومی صحه گذارد.

نتیجه‌گیری

یافته‌ها بیان می‌دارد که انجام تمرین بدنی در هر دو شکل تداومی و تناوبی در آب، منجر به بهبود فیزیولوژیکی ساختار قلب می‌شود. این بهبود در وزن قلب و بطن چپ با افزایش میزان بیان ژن Hand2 در هر دو نوع تمرین تائید گردید. نکته مهم اینکه تمرین تناوبی با صرف زمان کمتر می‌تواند تغییراتی مشابه با تمرین تداومی ایجاد نماید. سنجش میزان Hand 2 پس از دو نوع تمرین از نکات برجسته این پژوهش می‌باشد. تحقیقات بیشتر جهت مطالعه فاکتورهای ژنی بیشتر و مسیرهای سیگنال دهی هورمونی در هایپرتروفی فیزیولوژیک قلب مورد نیاز است.

سپاسگزاری

مقاله حاضر از طرح پایان نامه دکتری دانشکده علوم ورزشی دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی تهران استخراج گردیده است. پژوهشگران از خانم دکتر گلاب و آقای دکتر براتی، سرکار خانم نوری، سرکار خانم کوهنوردپور، سرکار خانم ریاحی پور و سرکار خانم حیات از دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی ایران که در انجام این پژوهش همکاری صمیمانه ای داشتند، نهایت تشکر و قدردانی را دارند..

References:

1- McMullen JR, Gennings GL. ***Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure.*** Clin Exp Pharmacol Physiol 2007; 34(4): 255-62.

2- Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR. ***Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies.*** Pharmacol & Therapeut 2010; 128(1): 191–227.

3- Zak R. Growth of the Heart in Health and Disease. Raven Press 1984; New York.

4- Holloway TM, Bloemberg D, Da Silva ML, Simpson JA, Quadrilatero J, Spriet LL. ***High Intensity Interval and Endurance Training Have Opposing Effects on Markers of Heart Failure and Cardiac Remodeling in Hypertensive Rats.*** PLoS ONE 2015; 10(3) e0121138.

5- Gillen JB, Gibala MJ. Is high-intensity interval training a time-efficient exercise strategy to improve health and fitness? Appl. physiol. nutria. metabolism 2014; 39(3):409–12.

6- Sheykhlouvand M, Khalili E, Agha-Alinejad H, Gharaat MA. ***Hormonal and physiological adaptations to high-intensity interval training in professional male canoe polo athletes.*** J of Str & Condit Research 2016; 30(3): 859–66.

7- Akazawa H, Komuro I. ***Roles of Cardiac Transcription Factors in Cardiac Hypertrophy.*** Circul Research 2003; 92(10): 1079-88.

8- Thattaliyath BD, Livi CB, Steinhelper ME, Toney GM, Firulli AB. ***HAND1 and HAND2 are expressed in the adult-rodent heart and are modulated during cardiac hypertrophy.*** Biochem Biophys Res Commun 2002; 297(4): 870-5.

9- Fathi M, Gharakanlou R, Abroun S, Mokhtari-Dizaji M, Rezaei R. ***Considerations in the evaluation of cardiac changes following endurance training in male Wistar rats.*** Yafteh 2013; 15: 112-23. [Persian]

10- Srivastava D, Thomas T, Lin Q, Kirby ML, Brown D, Olson EN. ***Regulation of cardiac mesodermal and neural crest development by the bHLH transcription factor, dHAND.*** Nat. Genet 1997; 16(2): 154–60.

11- Fathi M, Gharakhanlou R. ***Effect of Endurance training on Hand2 gene expression in left ventricle of male rats.*** Sport Physiology 2015; 7(25): 57-68. [Persian]

12- Sun YM, Wang J, Qiu XB, Yuan F, Li RG, Xu YJ, et al. ***HAND2 loss of function mutation causes familial ventricular septal defect and pulmonary stenosis.*** Genes 2016; 6(4): 987- 92.

13- Day YS, Cserjesi P, Markham BE, Molkentin J. ***The Transcription Factors GATA4 and dHAND physically Interact to Synergistically Activate Cardiac Gene Expression through a p300-dependent Mechanism.*** The J of Biolog Chemi 2002; 277 (27): 24390–8.

14- Terada S, Tabata I, Higuchi M. ***Effect of high intensity intermittent swimming training of fatty acid oxidation enzyme activity in rat skeletal muscle***. The Japanese J of Physiol 2004; 54(1): 47-52.

15- De Rocha GL, Crisp AH, de Oliveira MRM, da Silva CA, Silva JO, Duarte AGO, et al. ***Effect of High Intensity Interval and Continuous Swimming Training on Body Mass Adiposity Level and Serum Parameters in High-Fat Diet Fed Rats.*** The Sci World J 2016; 2016: 2194120.

16- O'Neill BT, Kim J, Wende AR, Theobald HA, Tuinei J, Buchanan J, et al. ***A Conserved Role for Phosphoinositide-3-Kinase but Not Akt Signaling in Mitochondrial Adaptations that Accompany Physiological Cardiac Hypertrophy.*** Cell Metab 2007; 6(4): 294–306.

17- Medeiros A, Oliveira EM, Gianolla R, Casarini DE, Negrão CE, Brum PC. ***Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats.*** Brazilian J of Med Biol Research 2004; 37(12): 1909-17.

18- Da Silva ND jr, Fernandes T, Soci UP, Monteiro AW, Phillips MI, De Oliveira EM. ***Swimming training in rats increases cardiac MicroRNA-126 expression and angiogenesis.*** Med Sci Sports Exerc 2012; 44(8): 1453-62.

19- Morganroth J, Maron BJ, Henry WL, Epstein SE. ***Comparative left ventricular dimensions in trained athletes.*** Ann Intern Med 1975; 82(4): 521-4.

20- Zhao Y, Srivastava D, Samal E. ***Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis.*** Nature 2005; 436(7048): 214-20.

21- Mihl C, Dassen WR, Kuipers H. ***Cardiac remodeling: concentric versus eccentric hypertrophy in strength and endurance athletes.*** Neth Heart J 2008; 16(4):129-33.

22- Midgley AW, McNaughton LR, Carroll S. ***Physiological determinants of time to exhaustion during intermittent treadmill running at VO2max.*** Int J Sports Med 2007; 28(4): 273-80.

23- Kemi OJ, Haram PM, Loennechen JP, Osnes JB, Skomedal T, Wisløff U, et al. ***Moderate vs. high exercise intensity: differential effects on aerobic fitness, cardiomyocyte contractility, and endothelial function.*** Cardiovasc Res 2005; 67(1): 161-72.

24- Gibala MJ, McGee SL, Garnham AP, Howlett KF, Snow RJ, Hargreaves M. ***Brief intense interval exercise activates AMPK and p38 MAPK signaling and increases the expression of PGC-1_ in human skeletal muscle.*** J Appl Physiol 2009; 106(3): 929–934.

25- Sheykhlouvand M, Gharaat MA, Khalili E, Agha-Alinejad H. ***The effect of high-intensity interval training on ventilatory threshold and aerobic power in well-trained canoe polo athletes.*** Sci & Sports 2016; 31(5): 283-89.

26- Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen O. ***Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training.*** Euro J Cardiovas Prev Rehabil 2007; 14(6): 753-60.

27- Holler KL, Hendershot TJ, Troy SE, Vincentz JW, Firulli AB, Howard MJ. ***Targeted deletion of Hand2 in cardiac neural crest-derived cells influences cardiac gene expression and outflow tract development.*** Dev Biol 2010; 341(1): 291–304.

28- McFadden DG, Barbosa AC, Richardson JA, Schneider MD, Srivastava D, Olson EN. ***The Hand1 and Hand2 transcription factors regulate expansion of the embryonic cardiac ventricles in a gene dosage-dependent manner.*** Development 2005; 132(1): 189-201.

29- Kehat I, Molkentin JD. ***Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation.*** Circulation 2010; 122(25):21-28.

30- Wisløff U, Støylen A, Loennechen JP, Bruvold M, Rognmo O, Haram PM, et al. ***Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate continuous training in heart failure patients.*** Circulation 2007; 115(24): 3086-94.

Effect of endurance and high intensity interval swimming training on cardiac structure and Hand2 expression of rats

Mohammad Ali Gharaat[*1], Majid Kashef[2], Behnamedin Jameie[3], Hamid Rajabi[4]

[1,2] Exercise Physiology Dept., Faculty of Sport Sciences, Shahid Rajaee Teacheer Training University of Tehran, Iran
[3] Dept. Basic Sciences, Faculty of Para-medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4] Exercise Physiology Dept., Faculty of Physical Education & Sport Sciences, Kharazmi University of Tehran, Iran

Received: 6 Aug 2017 **Accepted:** 12 Oct 2017

Abstract

Introduction: Physiological hypertrophy following training manifests with cardiac mass changes. In addition, physical activities lead to Hand2 gene expression as an important gene in cardiac remodeling. The present study aimed to investigate the effects of endurance and high intensity interval Ttraining on Hand2 gene expression and cardiac changes.

Method: For this intent, 24 male rats (age 3 months; weight 229.30 ± 15.7 grams) divided randomly into the control (n=6), sham (n=6), interval (n=6) and endurance (n=6) groups. The endurance group swam for 12 weeks/5 days per week whereas swimming time increased incrementally. In addition, interval group swam 12 weeks/4 days per week while the load to body weight ratio and time to rest ratio increased incrementally. Twenty-four hours later, heart weight and left ventricle weight, and Hand2 gene expression were measured. To assess the data, one-way ANOVA was utilized and schaffe test was used to point out the place of significancy ($\alpha \leq 0.05$).

Results: Findings showed that heart and left ventricle weights after endurance and high intensity interval training were significantly more than the sham and control groups. In addition, Hand2 expression was changed significantly in the endurance (6.76) and interval (6.15) rather than the sham (1.05) and control groups(1 fold).

Conclusion: In the situation of the present study, both of Endurance and Interval training regimens increase Hand2 gene expression, heart weight and left ventricle weight. Because of the shorter training time, high intensity interval training can be more beneficial to be executed.

Key words: Cardiac Hypertrophy, Endurance training, High Intensity Interval Training, Hand2, Rat

This paper should be cited as:
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.** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2017; 25(9): 748-58.

***Corresponding author: Tel: +49-1630058586, email: Gharaat@Tum.De**