علوم زیستی ورزشی - پاییز ۱۳۹۶
دورهٔ۹، شمارهٔ ۳، ص: ۴۵۶ – ۴۴۳
تاریخ دریافت : ۰۳ / ۱۱ / ۹۵
تاریخ پذیرش : ۲۱/ ۰۴/ ۹۶

تأثیر چهار هفته تمرین تناوبی شدید بر بیان ژن‌های پروآنژیوژنیک سلول‌های اندوتلیال در عضلهٔ اسکلتی رت‌ها

محسن امینی زاده [۱] – احد شفیعی [*۲] – محمدرضا کردی [۳] – مهلا سادات نبوی زاده [۴]

۱. دانشجوی دکتری سلامت در بلایا و فوریت‌ها، دانشگاه علوم پزشکی‌کرمان،کرمان، ایران ۲. کارشناس ارشد فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه تهران،تهران، ایران ۳. دانشیارگروه فیزیولوژی ورزشی دانشگاه تهران، تهران،ایران ۴. کارشناس ارشد آسیب شناسی و حرکات اصلاحی دانشگاه تهران،تهران، ایران

چکیده

Mir-210، میکرو RNA پروآنژیوژنزی سلول‌های اندوتلیال است که این میکرو RNA، از طریق سرکوب EphrinA3 و افزایش مهاجرت برخی هدف‌های ژنی و پروتئینی (VEGF) موجب بهبود فرایند رگ‌زایی می‌شود. در این پژوهش ۱۲ سر رت نر در سن هشت‌هفتگی با میانگین وزنی۲۰±۱۸۰ گرم انتخاب و تصادفی به دو گروه کنترل (n=۶) و تمرین (n=۶) تقسیم شدند. تمرین تناوبی شدید به مدت چهار هفته و هر هفته پنج روز شامل سه تناوب شدید (چهار دقیقه با شدت ۹۰ تا ۱۰۰ درصد VO2max) و سه تناوب سبک (دو دقیقه با شدت ۵۰ تا ۶۰ درصد VO2max) انجام گرفت. میزان بیان ژن‌ها با تکنیک Real time-PCR و از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شدند. برای تعیین معنادار بودن متغیرها بین گروه‌های تحقیق از آزمون آماری t مستقل استفاده شد. یافته‌ها نشان داد تمرین تناوبی شدید موجب تغییر معنادار افزایش بیان ژن Mir-210 و VEGF شد (P=۰/۰۰۵)- (P=۰/۰۰۳). همچنین کاهش بیان ژن گیرندهٔ EphrinA3 در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل معنادار شد (P=۰/۰۰۰). به‌طور کلی شاید در اثر هیپوکسی، که همراه با تمرین تناوبی شدید اتفاق افتاده است، افزایش بیان ژن‌های Mir-210 و VEGF موجب بهبود عملکرد پروآنژیوژنزی سلول‌های اندوتلیال می‌شود که این سازگاری به افزایش رگ‌زایی در رت‌ها منجر شده است.

واژه‌های کلیدی

تمرینات تناوبی شدید، رگ‌زایی، عامل رشد اندوتلیال عروقی، میکرو RNA.

---

[*] **نویسندهٔ مسئول : تلفن:** ۰۹۱۰۷۸۳۹۱۴۳ Email: Ahad.shafie312@ yahoo.com

مقدمه

پس از تمرین‌های ورزشی سازگاری‌های متعددی در بدن ایجاد می‌شود که به بهبود اجرای ورزشی کمک می‌کند. از اصلی‌ترین این سازگاری‌ها، افزایش جریان خون عضله است، که این افزایش با تغییر چگالی مویرگی و حداکثر اکسیژن مصرفی همراه است. یکی از تغییراتی که هنگام تمرینات ورزشی در ساختار عروقی عضلهٔ اسکلتی برای رفع شرایط استرسی رخ می‌دهد، رگ‌زایی[1] است (۹).

در واقع، رگ‌زایی فرایند پیچیده‌ای است که مستلزم درگیری انواع سلول‌ها (سلول‌های اندوتلیال و عضلهٔ صاف) و همچنین تنظیم‌کنندگی microRNAs است (۱۷،۱۶،۱۲،۱۰،۴). miRNAs مولکول‌های RNA رمزنگاری‌نشدهٔ کوچکی (۲۵-۱۸ نوکلئوتیدی) هستند که این مولکول‌ها بیان ژن را پس از رونویسی از طریق مهار ترجمهٔ messenger RNA (mRNA) یا القای تجزیهٔ آن کنترل می‌کنند؛ از طریق اتصال به ناحیهٔ ترجمه‌نشدنی انتهای mRNAs. miRNAs بسیاری از جنبه‌های رگ‌زایی مثل تکثیر و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال را تنظیم می‌کنند. miRNAs تنظیم‌کنندهٔ رگ‌زایی، به دو دستهٔ پروآنژیوژنیک[2] که رگ‌زایی را افزایش می‌دهند و آنتی‌آنژیوژنیک[3] که رگ‌زایی را مهار می‌کنند، تقسیم می‌شوند (۲۱). از بین miRNAs پروآنژیوژنیک که موجب افزایش فرایند رگ‌زایی می‌شوند، مشاهده شده است که Mir-210 به‌عنوان تنظیم‌گر اصلی عمل می‌کند و یکی از ۳۵ ژن هدف شناخته‌شدهٔ آن گیرندهٔ تیروزین کیناز EphrinA3 است. این گیرنده بر روی عروق خونی قرار دارد و موجب عدم مهاجرت سلول‌های اندوتلیال برای تشکیل عروق جدید می‌شود. Mir-210 از طریق فاکتور القایی هیپوکسی[4] در فرایند رگ‌زایی شرکت می‌کند. HIF-1α در اثر هیپوکسی ایجادشده در فرایند فعالیت ورزشی موجب بیان افزایشی Mir-210 در سلول‌های اندوتلیال می‌شود و Mir-210 در پاسخ به هیپوکسی با تنظیم کاهشی گیرندهٔ تیروزین کینازی EphrinA3 رگ‌زایی سلول‌های اندوتلیال را تعدیل می‌کند و از طرف دیگر، موجب فعالیت بیشتر عامل رشد آندوتلیال عروقی[5] می‌شود (۱۴،۱۱). عامل رشد آندوتلیال عروقی (VEGF) یکی از مهم‌ترین تنظیم‌کنندهای اختصاصی رگ‌زایی است. خانوادهٔ عامل‌های رشد آندوتلیال عروقی، شامل گلیکوپروتئین‌های ترشحی به نام‌های VEGF-A، VEGF-B،

1. Angiogenesis
2. Pro-angiogenic
3. Anti-angiogenic
4. Hypoxia inducible factor 1α
5. Vascular endothelial growth factor

VEGF-C، VEGF-D، VEGF-E، VEGF-Fو عامل رشد جفتی[1] است (۷). نشان داده شده که VEGF-A از نظر بیولوژیکی، فعال‌ترین ایزوفرم است و قابلیت اتصال به هر دو گیرندهٔ VEGFR-1 و VEGFR-2 را دارد (۱۹).

نتایج مطالعه‌ای که با کشت سلول همراه بود، نشان داد سطوح mir-210 به‌شدت تحت تأثیر هیپوکسی است. در این مطالعه سرکوب miR-210 به کاهش مهاجرت القاشدهٔ سلول‌های اندوتلیال در اثر VEGF و در جهت عکس افزایش بیان miR-210 در اثر هیپوکسی به افزایش مهاجرت سلول‌های اندوتلیال منجر می‌شود. زمانی که افزایش بیان miR-210 اتفاق می افتد، تاثیر را بر گیرنده مستقیم خود EphrinA3 می‌گذارد، در نتیجه EphrinA3 توسط miR-210 که یک توالی عملکردی خاص دارد، تعدیل میشود و بیان بیش از اندازه mir-210 به شدت منجر به کاهش پروتئین EphrinA3 در سلول های اندوتلیال می شود(۱۸). تغییرات معناداری در سطوح پلاسمایی Mir-210 در اثر تمرینات استقامتی وامانده‌ساز در دانشجویان ورزشکار مشاهده نشده است (۲). در تحقیقی کاهش معنادار mir-210 طی چهار هفته تمرینات تناوبی سرعتی مشاهده شد (۵). دوازده هفته تمرینات هوازی در بیماران حاد کلیوی موجب تنظیم کاهشی شد، ولی در افراد سالم این اتفاق نیفتاد (۲۲). ازاین‌رو انتظار می‌رود تمرینات HIIT که با شدت بالایی انجام می‌گیرند، موجب ایجاد شرایط هیپوکسی شوند که در واقع فعال شدن یک مسیر سیگنالی را در پی دارد و به افزایش بیان ژن Mir-210 و در نهایت افزایش فرایند آنژیوژنز منجر می‌شود. با به‌نظر می‌آید توجه به اثر مثبت فعالیت بدنی بر عملکردهای سلولی و مولکولی ناشی از ورزش بتواند در آینده به استفاده از فعالیت بدنی به‌عنوان درمان هدفمند و بدون عوارض منجر شود. با توجه به اندک بودن مطالعات انجام‌گرفته در زمینهٔ تأثیر فعالیت بدنی بر miRNAs و ژن‌های تحت تأثیر آنها که در فرایند رگ‌زایی مؤثرند و با عنایت به جست‌وجوهای انجام‌گرفته در مطالعات حاضر، تاکنون هیچ‌گونه پژوهشی تأثیر فعالیت بدنی بر میزان تغییرات در بیان ژن‌های Mir-210، VEGF-Aو EphrinA3 را در عضلهٔ نعلی بررسی نکرده است، ازاین‌رو این مطالعه با هدف شناسایی سازوکارهای درگیر در سازگاری‌های اثرگذار تمرین تناوبی شدید بر فرایند آنژیوژنز در عضلهٔ اسکلتی انجام گرفته است.

1. Placenta Growth Factor

روش تحقیق

پژوهش حاضر از نوع تجربی- آزمایشگاهی بود. ۱۲ سر رت نژاد ویستار هشت هفته با میانگین وزنی۲۰±۱۸۰ گرم از انستیتوی پاستور ایران خریداری و در شرایط دمایی۳± ۲۲ درجهٔ سانتی‌گراد و رطوبت ۴۰ تا ۶۰ درصد نگهداری شدند؛ بدون هیچ‌گونه محدودیتی در غذا و آب، در قفس‌های پلی‌اتیلن. در مراحل مختلف ضمن رعایت مسائل اخلاقی سعی شد از هر گونه آزار جسمی و روش غیرضروری اجتناب شود (مجوز کد اخلاقی به شمارهٔ K/171/91).

در ابتدا حیوانات، تصادفی به دو گروه کنترل (n=۶) و گروه HIIT (n=۶) تقسیم شدند. رت‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه حیوانات به مدت سه روز برای سازگاری با محیط و رسیدن به حد وزنی مطلوب (۲۰۰گرم) مراقبت شدند. گروه تمرینی به مدت دو هفته با اجرای HIIT آشنا شدند، البته همزمان برای عملیاتی کردن پروتکل، برنامه به شکل مقدماتی اجرا شد. پروتکل ورزشی با توجه به اصول طراحی برنامه‌های تناوبی شدید برای به حداکثر رساندن عملکرد دستگاه هوازی (جذب اکسیژن و ظرفیت اکسایشی عضلات اسکلتی، هر دو) در شدتی نزدیک به VO2max، به مدت دو تا چهار دقیقه و زمان بازیافت فعال بین دو تا سه دقیقه پیشنهاد شده است (۶)، که همین شرایط طراحی و اجرا شد. هر جلسه اجرای HIIT شامل ۳۰ دقیقه فعالیت ورزشی بود (جدول ۱).

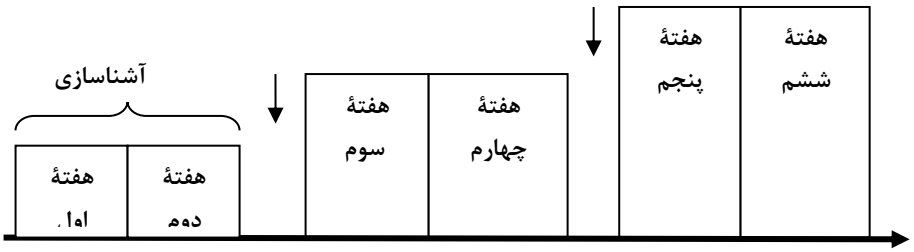
جدول ۱. طرح پروتکل تمرین تناوبی شدید

مراحل تمرین		بدنهٔ اصلی تمرین (۳ تناوب)		
مؤلفهٔ تمرین	گرم کردن	تناوب پرشدت	تناوب کم‌شدت	سرد کردن
زمان تمرین (دقیقه)	۶ دقیقه	۴ دقیقه	۲ دقیقه	۶ دقیقه
شدت تمرین ($VO2_{max}$)	۵۰ تا ۶۰ درصد	۹۰ تا ۱۰۰ درصد	۵۰ تا ۶۰ درصد	۵۰ تا ۶۰ درصد

*شیب نوار گردان در همهٔ مراحل تمرین صفر بود

در کل، پروتکل ورزشی شامل چهار هفته تمرین تناوبی شدید بود. در انتهای دو هفته آشنایی، حداکثر اکسیژن مصرفی رت‌ها اندازه‌گیری شد و رت‌ها با توجه به پروتکل تمرینی (درصدهای تناوب شدید و کم‌شدت) حداکثر اکسیژن مصرفی (که به متر بر دقیقه تبدیل شد)، پنج جلسه تمرین در هفته را آغاز کردند. در پایان هر دو هفته، آزمون حداکثر اکسیژن مصرفی اجرا شد و سرعت تمرینی جدیدی

برای هفتهٔ تمرین بعد، در نظر گرفته شد. همهٔ جلسات تمرین، عصرهنگام که بهترین زمان تمرین در ریتم فعالیتی طبیعی رت‌هاست، در زیر نور قرمز (به‌علت کمترین استرس‌زایی) انجام گرفت. شرایط زیستی حیوانات در گروه کنترل به‌جز انجام تمرینات روزانه در سایر اوقات، مشابه گروه تمرین بود و حتی به‌منظور شبیه‌سازی بیشتر گروه کنترل در بازهٔ زمانی تمرین، سه بار در هفته و هر بار به مدت ۱۵ دقیقه روی دستگاه نوار گردان با سرعت دو متر بر دقیقه قرار گرفتند (۲۳،۳). به‌علت نداشتن دسترسی به ابزار مستقیم (دستگاه تجزیه‌وتحلیل گازهای تنفسی)، توان هوازی رت‌ها غیرمستقیم با استفاده از پژوهش‌های اخیر هویدال و همکاران (۲۰۰۷) انجام گرفت. ابتدا ۶ دقیقه گرم کردن با شدت ۴۰ تا ۵۰ درصد VO2max انجام گرفت. پس از گرم شدن، آزمون با دویدن رت‌ها با سرعت ۱۵ متر در دقیقه به مدت دو دقیقه شروع شد، سپس نوار گردان هر دو دقیقه یک بار به مقدار ۰/۰۳ متر بر ثانیه (۱/۸ تا ۲ متر بر دقیقه) افزایش یافت تا اینکه حیوانات، دیگر قادر به دویدن نبودند. ملاک رسیدن به VO2، عدم افزایش VO2max با وجود افزایش سرعت است. سرعت VO2max سرعتی بود که در آن VO2 به فلات برسد. رسیدن به فلات با غلظت لاکتات بالاتر از ۶ میلی‌مول در لیتر و نسبت تنفسی VCO2/VO2 برابر ۱/۰۵ در نظر گرفته شد. پژوهش‌ها نشان می‌دهند، ارتباط قوی‌ای بین سرعت نوار گردان و VO2max رت‌ها جود دارد (۰/۹۸ - r=۰/۹۴ ، P< ۰/۰۰۵). ازاین‌رو با توجه به سرعت دویدن، مقدار VO2max رت‌ها به‌دست آمد (۱۳). در پایان هر دو هفته، آزمون حداکثر اکسیژن مصرفی اجرا شد و سرعت تمرینی جدیدی برای هفتهٔ بعد تمرین، در نظر گرفته شد که طرح کلی آن در شکل ۱ می باشد.



شکل ۱. طرح کلی تحقیق (↓ نشان‌دهندهٔ آزمون $VO_{2\,max}$)

۲۴ ساعت پس از آخرین جلسهٔ تمرین، رت‌ها پس از ناشتایی شبانه نمونه‌برداری شدند و برای جمع‌آوری نمونه‌ها ابتدا حیوان با ترکیبی از داروی زایلازین (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و کتامین (۷۵

میلی‌گرم/ کیلوگرم) به شکل تزریق درون‌صفاقی بی‌هوش شد. سپس، قفسهٔ سینهٔ حیوان شکافته شده و برای اطمینان از کمترین آزار حیوان، نمونه‌های خون، مستقیم از قلب حیوان گرفته شد. سپس عضلهٔ نعلی از اندام تحتانی حیوان برداشته شد؛ در سرم فیزیولوژیک شست‌وشو داده شده و در ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم وزن‌کشی شد؛ پس از آن بلافاصله با استفاده از ازت مایع منجمد و برای سنجش‌های بعدی به فریزر با دمای ۸۰- منتقل شد. استخراج RNA با استفاده از ۵۰ میلی‌گرم عضلهٔ نعلی انجام گرفت. بافت با استفاده از یک میلی‌مول محلول تریزول لیز شده و با دستگاه همگن‌کنندهٔ بافت هموژن شد. در مرحلهٔ بعد، جداسازی از فاز آبی به کمک ۰/۲۵میلی‌لیتر کلروفرم شد. RNA استخراج‌شده با ۱ میلی‌لیتر اتانول سرد ۷۰ درصد شست‌وشو و خشک شد و سپس به آن آب استریل (۱/۵ul/mg tissue) اضافه شد. برای سنجش کمی RNA استخراج‌شده، از دستگاه بایوفتومتر با طول موج ۲۶۰ نانومتر استفاده شد. میانگین OD خوانده‌شده ۱/۷۷ بود که بیانگر کارایی مناسب RNA استخراج‌شده بود. استخراج cDNA برای هر نمونه طی سه مرحلهٔ انجام گرفت. بدین ترتیب که در ابتدا هشت میکروگرم از RNA استخراج‌شده با ۰/۸ ul از آنزیم DNase I وul ۲ از بافر ۱۰x آن و آب DEPC خورده مخلوط شده و حجم نمونه به ۲۰ ul رسانده شد. محصول ایجادشده بدون ورتکس کردن و به‌آرامی مخلوط شد، سپس با برنامهٔ زیر در دستگاه ترموسایکر انکوبه شد: پنج دقیقه در دمای ۵۵ درجهٔ سانتی‌گراد، ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد،۳۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجهٔ سانتی‌گراد (مرحلهٔ ساخت cDNA به‌وسیلهٔ آنزیم ترانس کریپتاز معکوس(RT)، پنج دقیقه در دمای ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد (به‌منظور غیرفعال کردن آنزیم RT). پس از اتمام مراحل ترموسایکلر ۲۸۰ul آب تزریقی اضافه شد و برای استفاده در QPCR در دمای ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد. برای هر نمونه cDNA نیز، یک نمونه کنترل مثبت با پرایمر b2m به‌عنوان کنترل داخلی[1]، برای آزمون حضور cDNA تهیه شد. نمونه‌ها به‌آرامی و بدون ورتکس مخلوط شدند و در دستگاه Real time PCR (Corbett) با برنامهٔ زیر PCR شد:۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد (واسرشته شدن اولیه)،۱۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد (واسرشته شدن)، ۱۵ ثانیه در دمای ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد (اتصال پرایمرها)،۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد (گسترش)، واکنش از مرحلهٔ دوم به بعد، برای ۴۰ سیکل تکرار شد. Cts مربوط به واکنش‌ها توسط نرم‌افزار دستگاه Real-time PCR استخراج و در نهایت Ct mean سه مرتبه ثبت شد.

1 . Internal Control

پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش از شرکت Invitrogen آمریکا سفارش داده شد؛ مشخصات ساختاری در جدول ۲ آورده شده است. برای کمی‌سازی مقادیر بیان ژن هدف مورد نظر از فرمول $۲^{-\Delta\Delta CT}$ (۲ به توان منفی ΔΔct) استفاده شد. اطلاعات مورد نیاز پس از جمع‌آوری، توسط نرم‌افزار آماری SPSS-19 و کلیهٔ نتایج به‌صورت (Mean±SEM) بیان و در سطح معناداری P ≤۰/۰۵ پردازش شد، سپس تحلیل شد. پس از اطمینان از طبیعی بودن توزیع متغیرهای پژوهش، از آزمون آماری t مستقل به‌منظور تعیین معنادار بودن تفاوت بین میانگین‌ها داده‌ها استفاده شد.

جدول ۲. پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش

Name	Host	Sequence
rno-Mir-210	**Rat**	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA
EphrinA3	**Rat**	TCGCCTTCTTCCTCATGACG
VEGF-A	**Rat**	GATGGCTTGAAGATGTACTCGATCT

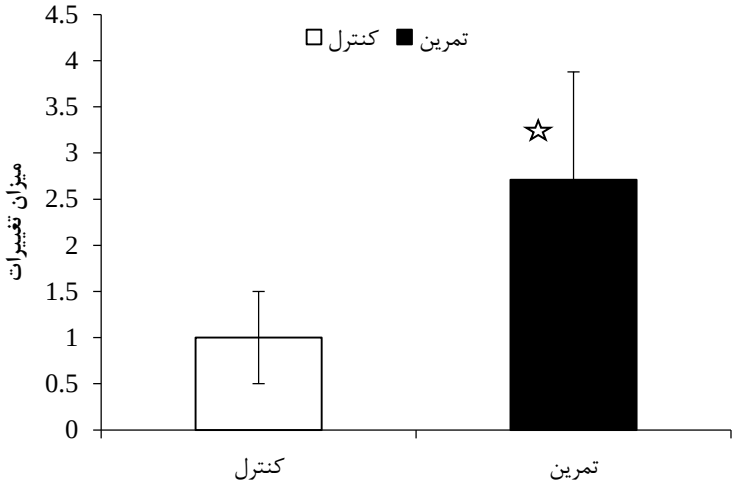
نتایج

تغییرات وزن رت‌ها در جدول ۳ گزارش شده که نشان‌دهندهٔ رشد طبیعی، در عین حال افزایش کمتر وزن رت‌ها در گروه تمرین نسبت به کنترل است.

جدول ۳. میانگین و انحراف استاندارد وزن گروه‌ها - داده‌ها به‌صورت میانگین و انحراف استاندارد (Mean±SEM) آورده شده‌اند

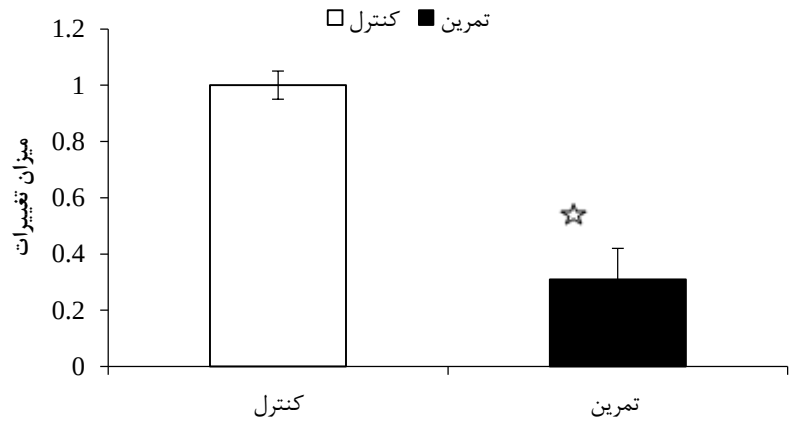
گروه	وزن اولیه (گرم)	وزن نهایی (گرم)
کنترل(n= ۶)	۲۱۰/۵±۹/۷۷	۳۳۷/۱۷±۷/۸۰
تمرین(n=۶)	۲۱۲±۹/۲۷	۳۰۵/۸۳±۶/۴۶

سطح بیان ژن Mir-210، ۲۴ساعت پس از آخرین جلسهٔ تمرین در عضلهٔ نعلی نسبت به گروه کنترل افزایش ۲/۷۱ درصد داشت که این افزایش از لحاظ آماری معنادار بود (P= ۰/۰۰۵، $t_{۱۰}$=۳/۵۶). میزان بیان آن در شکل ۲ ارائه شده است.



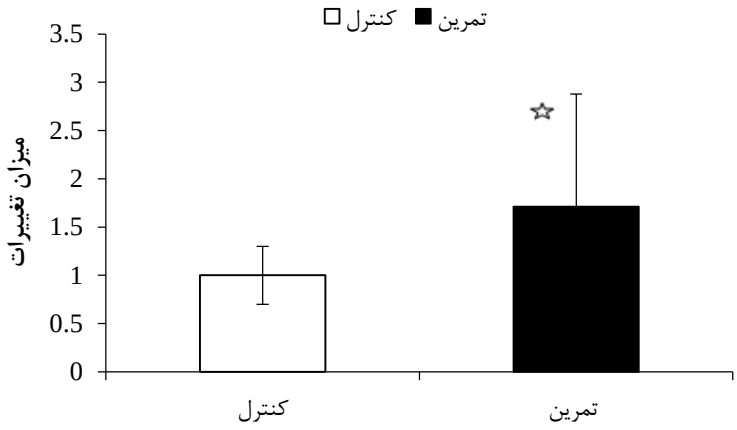
شکل ۲. تغییرات بیان ژن mir-210 در گروه تمرینی (برابر تغییر نسبت به گروه کنترل)
علامت ☆ نشان‌دهندهٔ معناداری است

سطح بیان ژن EphrinA3، ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسهٔ تمرین در عضلهٔ نعلی نسبت به گروه کنترل کاهش ۳۱ درصد داشت و این کاهش از لحاظ آماری معنادار بود (P=۰/۰۰، ۱۵/۰۳- =$t_{۱۰}$). میزان بیان آن در شکل ۳ ارائه شده است.



شکل ۳. تغییرات بیان ژن EphrinA3 در گروه تمرینی (برابر تغییر نسبت به گروه کنترل)
علامت ☆ نشان‌دهندهٔ معناداری است

سطح بیان ژن VEGF-Aدر هفتهٔ چهارم، ۲۴ساعت پس از آخرین جلسهٔ تمرین در عضلهٔ نعلی نسبت به گروه کنترل اندازه‌گیری شد که این افزایش ۱/۷۱ درصد از لحاظ آماری معنادار بود ($t_{۱۰}$=۶/۶۵ ،P= ۰/۰۰۳) میزان بیان آن در شکل ۴ ارائه شده است.



شکل ۴. تغییرات بیان ژنVEGF-A در گروه تمرینی (برابر تغییر نسبت به گروه کنترل)
علامت ☆ نشان دهندهٔ معناداری است.

بحث و نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر، نقش فعالیت بدنی در تغییرات mir-210 بررسی شد. نتایج نشان داد چهار هفته اجرای تمرینات تناوبی شدید، موجب افزایش بیان ژن Mir-210 به مقدار ۲/۷۱ درصد و VEGF-A به مقدار ۱/۷۰ درصد و کاهشی در میزان گیرندهٔ تیروزین کینازی EphrinA3 در عضلهٔ نعلی رت‌های نر ویستار سالم شد، که این افزایش و کاهش معنادار بود. نتایج پژوهشی که در محیط کشت سلول انجام گرفت، نشان داد سرکوب Mir-210 به کاهش مهاجرت القاشدهٔ سلول‌های اندوتلیال در اثر VEGF منجر می‌شود و در حالت هیپوکسی القاشده، افزایش بیان Mir-210 اتفاق می‌افتد و به افزایش مهاجرت سلول‌های اندوتلیال می‌انجامد که با نتایج پژوهش حاضر همسوست، از طرفی این پژوهشگران بیان کردند، Mir-210 تنها موجب مهار گیرندهٔ پروتئینی EphrinA3 می‌شود و بر بیان ژن EphrinA3 تأثیرندارد، که با نتایج پژوهش حاضر ناهمسوست (۱۸). در پژوهش حاضر، به‌علت شدت بالای تمرینات می‌توان استدلال کرد که هیپوکسی به میزان شایان توجهی اتفاق افتاده و افزایش Mir-210 همانند یک

عامل تسهیل‌کننده در عملکرد و افزایش‌دهندهٔ بیان ژن VEGF عمل کرده است و می‌توان احتمال داد که این افزایش ۲/۷۱ درصدی در Mir-210 موجب تسهیل سازوکار عمل VEGF (افزایش مهاجرت سلول‌های اندوتلیال و تشکیل عروق جدید برای رفع هیپوکسی ایجادشدهٔ ناشی از تمرینات) شده است و رگ‌زایی در حد مطلوبی به‌واسطهٔ این مسیر پیام‌رسانی فعال شده است. در مطالعات، ژن‌ها و گیرنده‌های هدف متعددی برای Mir-210 شناسایی شده‌اند که یکی از این هدف‌ها EphrinA3 است. یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد پس از چهار هفته اجرای HIIT میزان بیان ژن EphrinA3 کاهش معناداری داشته است. شاید سازگاری ایجادشده با تمرینات سبب شده که ژن این گیرندهٔ تیروزین کینازی کاهش داشته باشد، که بی‌شک کاهش بیان ژن EphrinA3 به کاهش این گیرندهٔ پروتئینی در سلول‌های اندوتلیال عضلهٔ اسکلتی نعلی منجر شده است. در پژوهشی تأثیر پیش و پس از تمرینات ۹۰ روزهٔ قایقرانان مرد بر پاسخ Mir-210 مطالعه شد و نتایج نشان داد اختلاف معناداری بین دو وهله فعالیت تک‌جلسهٔ وامانده‌ساز پیش و پس از تمرینات ۹۰ روزه وجود نداشت، که با نتایج پژوهش حاضر مغایر است (۲). شاید از دلایل ناهمسو بودن نتایج شدت بالای تمرینات ورزشی HIIT بوده است، یا تفاوت ناشی از نوع سنجش Mir-210 در سطوح پلاسمایی در پژوهش (۲) و سنجش پژوهش حاضر از بافت عضلهٔ اسکلتی بوده است. در پژوهشی دیگر آزمودنی‌های سالم مرد پیش و پس از چهار هفته تمرینات تناوبی سرعتی با اجرای آزمون VO_2max سنجش شدند که کاهش معنادار mir-210 طی چهار هفته تمرینات تناوبی سرعتی (هر هفته سه جلسه و هر جلسه شامل سه مرحله دویدن سرعتی با فاصلهٔ استراحتی ۴ دقیقه) مشاهده شد. نتایج تحقیق مذکور با نتایج پژوهش حاضر مغایر بود (۵). شاید یکی از تفاوت‌های پژوهش حاضر با پژوهش دنهام و همکارانش در نوع سنجش Mir-210 در سطوح بافت عضلانی و پلاسمایی است و از طرفی نوع پروتکل تمرینی متفاوت است و احتمالاً افزایش Mir-210 در پژوهش حاضر به‌علت فعال شدن مسیر پیام‌رسانی HIF-1α در اثر هیپوکسی ایجادشدهٔ ناشی از مدت زمان تناوب شدید فعالیت ورزشی (۴ دقیقه) بوده است که سازگاری آن طی چهار هفته موجب بیان افزایشی Mir-210 در سلول‌های اندوتلیال شده است و در نتیجه فعالیت بیشتر VEGF-A را در پی داشته و میزان رگ‌زایی را افزایش داده است. در پژوهشی گزارش کردند دوازده هفته تمرینات هوازی دوچرخه‌سواری (روزانه ۴ تا ۱۰ دقیقه) در بیماران مزمن کلیوی موجب تنظیم کاهشی Mir-210 شده، ولی در افراد سالم این اتفاق نیفتاده است که با نتایج پژوهش حاضر ناهمسوست (۲۲)؛ شاید دلیل آن سنجش سطوح پلاسمایی Mir-210 در آزمودنی‌ها و نوع فعالیت ورزشی (دوچرخه‌سواری) و عدم شدت

تمرینی بالا با توجه به بیماری آزمودنی‌ها، بوده است. در مطالعه‌ای مروری نشان داده شد افزایش بیش اندازهٔ Mir-210 موجب مهاجرت سلول‌های اندوتلیال می‌شود که این عملکرد در مرحلهٔ پنجم فرایند آنژیوژنز اتفاق می‌افتد و در شرایط هیپوکسی با مهار Mir-210 مشاهده شد تشکیل تیوب عروق سلول-های اندوتلیال کاهش نشان می‌دهد (۲۴). در پژوهشی سطوح بیان ژن Mir-210 در آزمودنی‌های مرد و زن ۴۰ تا ۴۵ ساله که میزان فعالیت جسمانی برابری داشتند، سنجش شد. آزمون Vo2max همراه با سنجش گازهای تنفسی گرفته شد و آزمودنی‌هایی که Vo2max پایینی داشتند، افزایش معناداری را در سطوح بیان ژن Mir-210 نشان دادند. این افزایش سطوح معنادار Mir-210 در مقایسه با آزمودنی‌های با Vo2max بالا مشاهده شد؛ این نتایج با نتایج پژوهش حاضر همسوست (۱). یکی از تفاوت‌های پژوهش حاضر با مطالعهٔ مذکور اندازه‌گیری Mir-210 در سطوح پلاسمایی است، که این امکان وجود دارد Mir-210 از طریق انواع مختلفی از بافت‌های بدن (قلب، عضلات صاف عروق، سلول‌های اندوتلیال و غیره) ترشح و وارد جریان خون شود، که احتمالاً معنادار بودن نتایج آنها به‌علت همین موضوع باشد. احتمالاً میزان هیپوکسی ناشی از تمرین در ابتدای تمرینات بیشتر است و این عامل، بیشتر موجب افزایش بیان HIF-α1 وMir-210 شده و در نهایت به بیان ژن VEGF منجر می‌شود که به تشکیل عروق جدید برای رفع هیپوکسی و شرایط استرسی می‌انجامد. از محدودیت‌های پژوهش حاضر می‌توان به سنجش بیان ژن‌ها در زمان‌های متفاوت تمرین اشاره کرد تا شناخت جامع‌تری از افزایش و کاهش آنها با توجه به گذشت زمان به‌دست آید. یکی دیگر از محدودیت‌های پژوهش حاضر عدم اندازه‌گیری ژن HIF-1α است که احتمالاً افزایش این عامل در پی چهار هفته اجرای HIIT اتفاق افتاده است. به‌نظر می‌رسد فعال‌سازی HIF-1α، سازگاری‌هایی چون بیان ژنی اریتروپوئیتین، بیان ژنی VEGF، بیان ژنی آنزیم‌های گلیکولیتیک را آغاز می‌کند که تأثیرات منفی قرارگیری در معرض هیپوکسی را کاهش می-دهند (۲۰،۱۵)، احتمالاً افزایش ژنی VEGF-A به‌علت شدت بالای اجرای HIIT موجب فعال شدن پی‌درپی مسیرهای پیام‌رسانی (ERK[1] و MAPK) و افزایش فرایند رگزایی شده‌اند (۸). شاید فعال‌سازی HIF-1α همراه با اجرای HIIT اتفاق افتاده است، زیرا این تمرینات با شدت بالایی اجرا می‌شوند که به کاهش میزان اکسیژن‌رسانی به عضلات اسکلتی منجر می‌شود و این محدودیت همانند یک بازخورد ناشی از تمرین موجب ایجاد سازگاری‌هایی در عروق خونی می‌شود که نتیجهٔ آن افزایش فرایند آنژیوژنز است و افزایش VO_2max رت‌ها در پی اجرای HIIT نشان‌دهندهٔ بهبود فرایند رگ‌زایی در رت‌هاست. تمرینات HIIT که همراه با شدت بالایی انجام می‌گیرند و در چند سال اخیر بسیار مورد توجه قرار

گرفته‌اند، از این منظر مهم‌اند که میزان سازگاری‌های موجود در عضلات اسکلتی را در مدت زمان کوتاه‌تری ایجاد می‌کنند و این نوع تمرینات که موجب افزایش فرایند رگ‌زایی شده‌اند، احتمالاً می‌توانند در مدت زمان کوتاه‌تری نسبت به تمرینات تداومی هوازی سبب ایجاد این سازگاری شوند. از دیدگاهی دیگر می‌توان با شناخت کامل‌تر سازوکار عمل Mir-210 در فرایند آنژیوژنز و همچنین سرکوب Mir-210 به‌طور مصنوعی، شاید بتوان درمان برخی بیماری‌ها از جمله سرطان گام‌هایی را برداشت. در نهایت با توجه مطالعات مورد بحث و نتایج پژوهش می‌توان گفت که تمرینات HIIT توانسته میزان رگ‌زایی را در بافت عضلهٔ اسکلتی افزایش دهد تا میزان اکسیژن‌رسانی بیشتری صورت گیرد.

تقدیر و تشکر

مطالعهٔ حاضر، حاصل طرح تحقیقاتی از دانشگاه علوم پزشکی کرمان به شمارهٔ 93/373 است. بدین‌وسیله مراتب تشکر و سپاس خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان به‌سبب حمایت مالی، آزمایشگاه سلولی مولکولی و تمامی کسانی که ما را در انجام این پژوهش همراهی کرده‌اند، ابراز می‌داریم.

منابع و مآخذ

1. Bye, Anja, Helge Røsjø, Stian T. Aspenes, Gianluigi Condorelli, Torbjørn Omland, and Ulrik Wisløff. (2013) "Circulating microRNAs and aerobic fitness–the HUNT-Study." PloS one 8, no. 2: e57496.
2. Baggish, Aaron L., Andrew Hale, Rory B. Weiner, Gregory D. Lewis, David Systrom, Francis Wang, Thomas J. Wang, and Stephen Y. Chan. (2011) "Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training." The Journal of physiology 589, no. 16: 3983-3994.
3. Burniston, Jatin G. (2009) "Adaptation of the rat cardiac proteome in response to intensity-controlled endurance exercise." Proteomics 9, no. 1: 106-115.
4. Carmeliet, Peter. (2003) "Angiogenesis in health and disease." Nature medicine 9, no. 6: 653.
5. Denham, Joshua, Brendan J. O'Brien, Francine Z. Marques, and Fadi J. Charchar. (2015) "Changes in the leukocyte methylome and its effect on cardiovascular related genes after exercise." Journal of Applied Physiology: jap-00878.
6. MacLaren, Donald, and James Morton. 2011. "Biochemistry for sport and exercise metabolism". John Wiley & Sons,

7. Ferrara, Napoleone. (2002) "VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors." Nature Reviews Cancer 2, no. 10: 795-803.
8. Ferrara, Napoleone, and Terri Davis-Smyth. (1997) "The biology of vascular endothelial growth factor." Endocrine reviews 18, no. 1: 4-25.
9. Gustafsson, T., A. Knutsson, A. Puntschart, L. Kaijser, Sandberg A-C. Nordqvist, C. Sundberg, and E. Jansson. (2002). "Increased expression of vascular endothelial growth factor in human skeletal muscle in response to short-term one-legged exercise training." Pflügers Archiv European Journal of Physiology 444, no. 6: 752-759.
10. Gustafsson, Thomas, Helene Rundqvist, Jessica Norrbom, Eric Rullman, Eva Jansson, and Carl Johan Sundberg. (2007). "The influence of physical training on the angiopoietin and VEGF-A systems in human skeletal muscle." Journal of Applied Physiology 103, no. 3: 1012-1020.
11. Ghosh, Goutam, Indira V. Subramanian, Neeta Adhikari, Xiaoxiao Zhang, Hemant P. Joshi, David Basi, Y. S. Chandrashekhar , Hall JL, Roy S, Zeng Y, Ramakrishnan S. (2010). "Hypoxia-induced microRNA-424 expression in human endothelial cells regulates HIF-α isoforms and promotes angiogenesis." The Journal of clinical investigation 120, no. 11: 4141-4154.
12. Hudlická.Olga, Brown, Margaret D, (2002) "Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle."In The New Angiotherapy, pp. 213-248. Humana Press.
13. Høydal, Morten A., Ulrik Wisløff, Ole J. Kemi, and Øyvind Ellingsen. (2007) "Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training." European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation 14, no. 6: 753-760.
14. Mounier, Rémi, Vincent Pialoux, Laurent Schmitt, Jean-Paul Richalet, Paul Robach, Jean Coudert, Eric Clottes, and Nicole Fellmann. (2009) "Effects of acute hypoxia tests on blood markers in high-level endurance athletes." European journal of applied physiology 106, no. 5: 713-720.
15. Mounier, Rémi, Vincent Pialoux, Belle Roels, Claire Thomas, Grégoire Millet, Jacques Mercier, Jean Coudert, Nicole Fellmann, and Eric Clottes. (2009) "Effect of intermittent hypoxic training on HIF gene expression in human skeletal muscle and leukocytes." European journal of applied physiology 105, no. 4: 515.
16. Neufeld, Gera, Tzafra Cohen, Stela Gengrinovitch, and Zoya Poltorak. (1999) "Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors." The FASEB journal 13, no. 1: 9-22.
17. Olsson, Anna-Karin, Anna Dimberg, Johan Kreuger, and Lena Claesson-Welsh. (2006). "VEGF receptor signalling? In control of vascular function." Nature reviews Molecular cell biology 7, no. 5: 359-371.
18. Fasanaro, Pasquale, Yuri D'Alessandra, Valeria Di Stefano, Roberta Melchionna, Sveva Romani, Giulio Pompilio, Maurizio C. Capogrossi, and Fabio Martelli. (2008). "MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3." Journal of Biological Chemistry 283, no. 23: 15878-15883.

19. Suto, Kyoko, Yasuo Yamazaki, Takashi Morita, and Hiroshi Mizuno. (2005). "Crystal structures of novel vascular endothelial growth factors (VEGF) from snake venoms insight into selective VEGF binding to kinase insert domain-containing receptor but not to fms-like tyrosine kinase-1." Journal of Biological Chemistry 280, no. 3: 2126-2131.
20. Schulze-Tanzil, G., O. Al-Sadi, E. Wiegand, W. Ertel, C. Busch, B. Kohl, and T. Pufe. (2011). "The role of pro-inflammatory and immunoregulatory cytokines in tendon healing and rupture: new insights." Scandinavian journal of medicine & science in sports 21, no. 3: 337-351.
21. Tallquist, Michelle D., Philippe Soriano, and Richard A. Klinghoffer. (1999). "Growth factor signaling pathways in vascular development." Oncogene 18, no. 55: 7917.
22. Van Craenenbroeck, Amaryllis H., Kristien J. Ledeganck, Katrijn Van Ackeren, Angelika Jürgens, Vicky Y. Hoymans, Erik Fransen, Volker Adams et al. (2016)."Plasma levels of microRNA in chronic kidney disease: patterns in acute and chronic exercise." American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology 309, no. 12: H2008-H2016.
23. Wisløff, Ulrik, Jan Pål Loennechen, Geir Falck, Vidar Beisvag, Susan Currie, Godfrey Smith, and Øyvind Ellingsen.(2001)."Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats." Cardiovascular research 50, no. 3: 495-508.
24. Yamakuchi, Munekazu. (2012). "MicroRNAs in vascular biology." International journal of vascular medicine .Volume 2012, Article ID 794898,13pages.

The Effect of 4 Weeks of High Intensity Interval Training on Pro-Angiogenesis Gene Expression of Endothelial Cells in Skeletal Muscle of Rats

Mohsen Amini zadeh[1] -Ahad shafiee[*2]-Mohammad Reza Kordi [3]-Mahla sadat Nabavi Zadeh[4]

1. PhD Student of Health in Disaster and Emergency Situations, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran 2. MSc in Exercise Physiology, University of Tehran, Tehran, Iran 3. Associate Professor, Department of Exercise Physiology, University of Tehran, Tehran, Iran 4. MSc in **injuries and corrective exercises, University of Tehran, Tehran, Iran**

(Received:2016/5/23;Accepted:2017/7/12)

Abstract

Mir-210 is pro-angiogenic micro-RNA in endothelial cells that improves angiogenesis process by suppressing (EphrinA3) and increasing the migration of some gene and protein targets (VEGF). In this study, 12 male rats (age: 8 weeks, mean weight: 180±20 g) were selected and randomly divided into control (*n*=6) and exercise (*n*=6) groups. High intensity interval training was performed for 4 weeks, 5 days a week including 3 high intervals (4 minutes at 90-100% of VO2max) and 3 low intervals (2 minutes at 50-60% VO2max). Gene expression was calculated by Real time-PCR technique and $2^{-\Delta\Delta CT}$. Independent t test was used to determine the significance of variables between the groups. The results showed that high intensity interval training significantly changed the increase of gene expression of Mir-210 and VEGF (*P*=0.005) (*P*=0.003). Also, the decrease in gene expression of EphrinA3 receptor in the exercise group was significant compared with the control group (*P*=0.000). Generally, perhaps due to hypoxia which happened along with high intensity interval training, increased gene expression of Mir-210 and VEGF improved the pro-angiogenic function of endothelial cells and this adaptation increased angiogenesis in rats.

Keywords

angiogenesis, high intensity interval training, microRNA, vascular endothelial growth factor.

[*] Corresponding Author: Email: Ahad.shafie312@ yahoo.com ;Tel: +989107839143