دانشگاه شهید بهشتی
فیزیولوژی ورزش و فعالیت بدنی
پاییز و زمستان ۱۳۹۸، دوره ۱۲، شماره ۲، صفحه‌های:۶۶-۵۵

تاثیر تمرین تناوبی شدید و تمرین تداومی بر عملکرد سلول‌های بنیادی و ظرفیت خود نوزایی سلول‌های میوکارد موش‌های صحرایی

آرزو اسکندری[۱]، رحمان سوری*[۱]، سیروس چوبینه[۱]، زهره مظاهره تیرانی[۲]

[۱]دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
[۲]موسسه تحقیقاتی هیستوژنوتک پاسارگاد، تهران، ایران.

دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۱۰/۲۲ ویرایش مقاله: ۱۳۹۷/۰۵/۰۱ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۰۵/۱۳

چکیده

هدف: سلول‌های بنیادی قلب بالغ در اثر تحریک مناسب، توانایی نوزایی و ترمیم سلول‌های قلبی را دارا می‌باشند. ظرفیت خود نوزایی قلب، با افزایش سن کاهش می‌یابد و این در حالی است که فعالیت‌های ورزشی نقش مثبتی را در این زمینه بازی می‌کند. هدف از این پژوهش، بررسی تاثیر تمرین تناوبی شدید و تمرین تداومی، بر عملکرد سلول‌های بنیادی و ظرفیت خود نوزایی سلول‌های میوکارد موش‌های صحرایی است.

روش ها: تعداد ۲۳ موش صحرایی ویستار نر بالغ (۱۳/۳±۳۶۵/۶ گرم، ۸-۶ ماه)، به سه گروه HIIT (تناوبی شدید)، تمرین تداومی (شدت متوسط) و کنترل تقسیم شدند. پروتکل‌های تمرینی ۵ روز در هفته و به مدت ۶ هفته اجرا شد. بافت قلب استخراج و مقادیر c-Kit (CD۱۱۷) و Ki۶۷به روش ایمونوهیستوشیمیایی و بیان ژن Nkx۲/۵به روش RealTime-PCR بررسی شد. روش آماری تحلیل واریانس نیز یک طرفه با معنی داری P≤۰/۰۵ استفاده شد.

نتایج: افزایش معنی دار سلول‌های مثبت c-Kit در گروه HIIT (P=۰/۰۰۱) و در گروه تداومی (P=۰/۰۱۸) مشاهده شد که این افزایش در گروه HIIT بیشتر بود. افزایش معنی دار سلول‌های مثبتKi۶۷ در گروه HIIT (P=۰/۰۰۱) و گروه تداومی (P=۰/۰۵) مشاهده شد که این افزایش در گروهHIIT بیشتر بود. همچنین افزایش معنی دار بیان ژن Nkx۲/۵ در گروه HIIT (P= ۰/۰۱۵) و در گروه تداومی (P=۰/۰۳) مشاهده شد که این افزایش در گروه تداومی بیشتر بود.

نتیجه گیری: نتایج پژوهش نشان داد که شدت تمرینات، محرک مؤثرتری برای سازگاری نوزایی قلب بوده و تمرینات تناوبی شدید تاثیرات مثبت بیشتری بر تمایز سلول‌های بنیادی قلبی دارد.

واژه‌های کلیدی: تمرین تناوبی شدید، تمرین تداومی، سلول‌های بنیادی قلب، Nkx۲/۵, c-Kit.

نویسنده مسئول: رحمان سوری، شماره تماس: ۶۱۱۱۸۸۹۹_۰۲۱، ایمیل: soori@ut.ac.ir

مقدمه

کشف جمعیتی از سلول‌های بنیادی با منشاء قلبی، نشان دهنده توان ذاتی قلب در بازترمیم است. پژوهشگران نتیجه گرفتند که قلب انسان، ظرفیتی برای نوزایی دارد (۱). نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که کاردیومیوستها، بالاترین ظرفیت نوزایی را در میان سایر سلول‌های قلبی دارند (۱،۲). پیری، هایپرتروفی پاتولوژیک قلب، ایسکیمی میوکارد و اختلالات متابولیک همراه با عوامل ژنتیکی و محیطی، به طور چشمگیری بر رشد و تمایز سلول‌های بنیادیی قلبی انسان[1] (HCSC) تأثیر می‌گذارد (۴-۲). سلول‌های بنیادی، جمعیتی از سلول‌ها با توان بالقوه در خودنوزایی و تمایز به انواع سلول‌ها می‌باشند. سلول‌های بنیادی، سلول‌های اولیه‌ای هستند که برخی از انواع آنها به نام سلول‌های بنیادی پر توان، توانایی ایجاد هر نوع سلول را در بدن دارند. سلول‌های بنیادی در بافت‌های مختلف، دارای ظرفیت تزاید وجود دارند و می‌توانند با تکثیر رده‌های سلولی اختصاصی، بافت را ایجاد و بافت‌های معیوب را تعمیر کنند. آن‌ها با تقسیم، می‌توانند سلول‌های مشابه خود را ایجاد نمایند و تحت تحریکات فیزیولوژیک یا آزمایشگاهی به سلول‌هایی با عملکرد اختصاصی مانند سلول‌های عضلانی قلب، سلول‌های پوست و سلول‌های کبدی تبدیل شوند (۳). تحقیقات نشان داده است که سلول‌های بنیادی قلبی[2] (CSC)، برای بازسازی سلول‌های عضلات قلبی آسیب دیده ضرورت دارد. سلول‌های بنیادی قلب در جنینی، نوزادی و قلب پستانداران بزرگسال، توسط نشانگرهای غشایی (Sca ، 1-c-Kit) و عامل‌های نسخه برداری (1-Isl, Nkx2.5, GATA4) مشخص می‌شود (۵-۸). سلول‌های درون‌زای بالغ CD45 ، c-Kit، سلول‌های بنیادی شرکت کننده در سازگاری به تنش‌های میوکارد هستند (۹،۱۰). هنگامی که به قلب پیوند زده می‌شوند، بیشترین بازسازی در سلول‌های قلبی و سلول‌های عروقی ریز مشاهده می‌شود (۱۱) .c-Kit سلول‌های بنیادی قلب بزرگسالان GATA4 و Nkx2.5 که دو عامل اصلی رونویسی اولیه دودمان قلب هستند را بیان می‌کنند که برای تمایز مزودرم و برنامه ریزی مجدد فیبروبلاست‌ها به دودمان CM ضروری است (۱۲،۱۳). در واقع، دودمان c-Kit سلول‌های کوچکی با یک نسبت بالای هسته در سیتوپلاسم است که زمانی که شروع به تمایز به سلول‌های بنیادی می‌کند، Nkx2.5 را بیان می‌کند (۱۲). ژن Nkx2.5، در شکل گیری و توسعه سلول‌های قلب عمل می‌کند. میزان بیان آن، بر هایپرتروفی قلب تأثیر می‌گذارد. Nkx2.5 در رشد اولیه جنین بیان می‌شود و در رشد قلب نیز بیان آن ادامه می‌یابد. بیان ژن Nkx2.5 به تدریج در طول مسیر تمایز سلول‌های بنیادی افزایش می‌یابد، که ممکن است قانون رونویسی کاردیوماسیت‌ها را کنترل کند (۱۴). تحقیقات نشان داده است که سلول‌های بنیادی بالغ، می‌توانند به سلول‌های قلبی تمایز پیدا کنند که احتمالاً محرک این فرآیند، بیان ژن Nkx2.5 هستند (۱۵،۱۶). مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که فعالیت ورزشی، چه در گونه‌های حیوانی و چه در گونه‌های انسانی، به بهبود شاخص‌های عملکردی قلبی منجر می‌شود. از دیدگاه سنتی، فعالیت ورزشی استقامتی با شدت متوسط، تعیین کننده رشد فیزیولوژیکی متعادل و برگشت‌پذیر قلب، از طریق هایپرتروفی کاردیومیوسیت‌ها به همراه یک رگ زایی مناسب است. از طرفی دیگر، به تازگی نشان داده شده است که فعالیت ورزشی از راه تشکیل کاردیومیوسیت‌ها ی جدید، به رشد قلبی منجر می‌شود (۱۷). همچنین مطالعات سال‌های اخیر بر روی فعالیت ورزشی در زمینه نوزایی قلبی و تشکیل کاردیومیوسیت‌های جدید مشاهده کرده‌اند که ظرفیتی قلبی، همبستگی مثبت بیشتری با شدت فعالیت ورزشی دارد (۱۸). با توجه افزایش ظرفیت بالقوه توسط فعالیت ورزشی تحت تاثیر سطحی از عوامل رشدی خاص و میتوژن مثبت، به نظر می‌سد که تمرین بدنی ممکن است باعث تحریک بسیاری از تمایزهای سلول‌ها برای ترویج تکثیر سلول‌های بنیادی بزرگسالی[3] (ASC)شود (۱۹). چندین پژوهش، تأثیر فعالیت ورزشی بر ظرفیت نوزایی قلبی را در گونه-های حیوانی بررسی کرده‌اند که برخی از آنها گزارش داده اند که به دنبال انواع فعالیت ورزشی، ظرفیت نوزایی قلبی از طریق افزایش تشکیل کاردیومیوسیت‌های جدید افزایش می‌یابد (۱۷-۲۱). همچنین، پژوهش‌های جدید

نشان داده اند که تمرین ورزشی، موجب افزایش میزان بیان ژن c-Kit بافت قلب می‌شود (۱۰،۱۹). وارنینگ (۲۰۱۴)، نشان داده است که c-Kit در CSCs، یک نقش فعال در طول هایپرتروفی فعال قلب در پاسخ به فعالیت‌های ورزش دارد. بر این اساس، همزمان با هایپرتروفی قلب در اثر ورزش، تعداد سلول‌های قلب نیز در پاسخ به ورزش افزایش می‌یابد، در حالی که قلب با هایپرتروفی فیزیولوژیک، ساختار طبیعی خود را حفظ می‌کند. با این حال، این توانایی تقسیم به حضور یک محرک وابسته است و هنوز هم در قلب موجودات بالغ بسیار محدود است (۱۰). به علت اینکه نوزایی در سلول‌های بنیادی بزرگسالان کاهش می‌یابد و برای تحریک نوزایی در افراد بالغ، بیشتر از پیوند سلول‌های بنیادی جنینی و بند ناف استفاده می‌شود که روش بسیار پر هزینه‌ای هستند، اما با توجه به تحقیقات گذشته به نظر می‌رسد که فعالیت بدنی، یک محرک قوی بازسازی و تحریک خود نوسازی سلول‌های بنیادی بافت قلب در افراد بزرگسالان است. با توجه به افزایش ظرفیت خود نوزایی بالقوه سلول‌ها توسط فعالیت ورزشی تحت تأثیر سطحی از عوامل رشدی خاص و میتوژن مثبت، به نظر می‌رسد که تمرین بدنی ممکن است، باعث تحریک بسیاری از تمایزهای سلول‌ها برای ترویج تکثیر CSC شود. افزایش در تعداد و بهبود عملکرد سلول‌های بنیادی ساکن در اندام‌ها، توانایی بیشتری برای حفظ و ترمیم سلول را فراهم می‌کند. با توجه به مطالب اشاره شده، مطالعات محدودی ظرفیت نوزایی قلب را در پاسخ به تمرینات ورزشی بررسی کرده است. بنابراین، هدف از این پژوهش، بررسی تأثیر تمرین تناوبی شدید و تمرین تداومی بر عملکرد سلول‌های بنیادی و ظرفیت خود نوزایی سلول‌های میوکارد موش‌های صحرایی بالغ است.

روش پژوهش

نمونه‌های پژوهش

تعداد ۲۴ موش صحرایی بالغ ویستار نر (۶ تا ۸ ماهه)، در آزمایشگاه حیوانات به ابعاد ۳ در ۴ متر در قفس‌های پلی‌کربنات شفاف به ابعاد ۱۵×۱۵×۳۰ سانتی‌متر با چرخه روشنایی / تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت، در دمای محیطی ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت هوای ۵±۵۰ درصد و همچنین با تهویه مناسب نگه‌داری شدند و به طور آزادانه به غذا (پلت، تولید شرکت خوراک دام بهپرور کرج) و آب دسترسی داشتند. تمام آزمایش‌های صورت گرفته بر اساس دستورالعمل کار با حیوانات دانشگاه تهران، پس از گرفتن کد اخلاقی (IR.UT.REC.1395005) انجام گرفت. نمونه‌های مورد مطالعه در این پژوهش، به طور تصادفی در سه گروه کنترل قرار گرفتند.

پروتکل پژوهش

در ابتدای پژوهش، موش‌های صحرایی به منظور کاهش استرس و همچنین آشنایی با دویدن روی نوارگردان، فعالیتی با شدت سبک را به مدت دو هفته، با سرعت ۱۰ تا ۱۵ متر در دقیقه و مدت زمان ۱۵ دقیقه انجام دادند. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه آشناسازی، موش‌های صحرایی یک آزمون ورزشی فزاینده تا مرز خستگی را انجام دادند تا حداکثر سرعت دویدن روی نوارگردان مشخص شود. آزمون فزاینده با سرعت ده متر بر دقیقه شروع شد و هر سه دقیقه یکبار سرعتی معادل با سه متر بر دقیقه به آن افزوده شد. زمان رسیدن به خستگی با عدم توانایی موش صحرایی در دویدن روی نوارگردان مشخص شد (۲۲).

براساس سرعت حداکثر به دست آمده، تمرین استقامتی به مدت شش هفته و پنج جلسه در هفته برای گروه‌های تمرینی طراحی شد. مدت و شدت پروتکل‌های تمرینی با توجه به مقالات گذشته انتخاب شد (۲۲).

روش‌های آزمایشگاهی

۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، موش‌های صحرایی با استفاده از ترکیب زایلازین و کتامین بی هوش شدند و در محیط کاملا استریل با استفاده از تیغ جراحی و ایجاد برش در قسمت قدامی سینه بافت قلب استخراج شد و برای آزمایشات سلولی و مولکولی بافت قلب، نیمی

جدول۱. برنامه تمرین گروه تناوبی با شدت بالا (HIIT) در ۶ هفته

هفته	وهله	فعالیت: استراحت (دقیقه)	شدت فعالیت (حداکثر سرعت)	شدت بازیافت	میانگین سرعت در هفته
۱	۵	۲:۲	٪۸۰	٪۶۰	٪۷۰
۲	۶	۲:۲	٪۸۰	٪۶۰	٪۷۰
۳	۷	۲:۲	٪۹۰	٪۵۰	٪۷۰
٤	۸	۲:۲	٪۱۰۰	٪۵۰	٪۷۵
۵	۸	۲:۲	٪۱۰۰	٪۵۰	٪۷۵
٦	۸	۲:۲	٪۱۰۰	٪۵۰	٪۷۵

جدول۲ . برنامه تمرین گروه تداومی در ۶ هفته

هفته	میانگین شدت فعالیت در هر جلسه هفته	مدت هر جلسه (حداکثر سرعت)
۱	٪۶۵	۱۵
۲	٪۶۵	۲۰
۳	٪۷۰	۲۵
٤	٪۷۰	۳۰
۵	٪۷۰	۳۰
٦	٪۷۰	۳۰

از بافت قلب هر گروه بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد و سپس جهت انجام آزمایشات سلولی مولکولی در فریزر ۸۰ـ درجه سانتی گراد نگهداری شد و بقیه بافت قلب گروهها برای انجام آزمایشات ایمونو هیستوشیمیایی در فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفتند. نمونهها جهت انجام بخش مختلف بافتی و مولکولی، به آزمایشگاه شرکت بافت و ژن پاسارگاد (تهران، ایران) انتقال داده شدند.

سنجش بیان ژن با روش Real Time-Pcr

استخراج RNA و سنتز cDNA

حدود ۵۰ میلی گرم بافت قلب به صورت جداگانه، جهت استخراج Total RNA به نسبت ۱ به ۱۰ در QIAzol Lysis Reagent هموژن شد. به‌منظور برداشتن اجزاء پروتئینی، محصول حاصل در 4°C، 10min، با دور g12000 سانتریفوژ گردید. سپس به نسبت ۱ به ۰/۵ با کلروفرم مخلوط و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. محصول در 4°C، 15min، g12000 سانتریفوژ و بخش معدنی و آبی از هم جدا شدند. بخش محتوی RNA برداشته و با نسبت ۱ به ۰/۵ با ایزوپروپانول مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق رها و سپس در ۴ °C، ۱۰min، g۱۲۰۰۰ سانتریفوژ شد. پلیت حاوی RNA در اتانول شستشو و در Lμ20 آب RNAS-Free حل گردید.

غلظت RNA مورد سنجش قرار گرفته (Eppendorff, Germany) و نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ به عنوان تخلیص مطلوب شد. سنتز cDNA با استفاده از gµ1 از RNA و با استفاده از Random hexamer primer و آنزیم Mmulv Reverse transcriptase انجام گرفت.

جهت اندازه‌گیری سطوح بیان ژن‌های مورد نظر، از روش کمی Real time-PCR با استفاده از Primix syber green II انجام گرفت (USA Applied Biosystems,). مخلوط واکنش در حجم نهایی µL ۲۰ و هر واکنش به صورت دو بار تکرار صورت پذیرفت. طراحی پرایمرها، بر اساس اطلاعات ژن‌های در بانک ژنی NBCI و توسط شرکت ماکرو ژن (Macrogen Inc., Seoul, Korea) انجام شد. ضمن اینکه ازGAPDH ، به عنوان ژن کنترل استفاده گردید. برنامه دمایی مورد استفاده در Real time-PCR شامل: ۹۵ به مدت ۱۰ دقیقه- ۹۵ به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ به مدت ۱ دقیقه (تکرار ۴۰ دوره) بود. میزان بیان ژن‌های موردنظر نیز با روش 2-ΔΔCT اندازه گیری شدند.

روش ایمونوهیستوشیمی

نمونه‌ها برای سنجش C- Kit و Ki67، داخل فرمالین قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها روی پارافین فیکس شدند. برای انجام رنگ‌آمیزی ایمونو هیستو شیمیایی بافت قلب با ضخامت µm 5 برش داده شد. پس از دپارافینه شدن، در ابتدا قطعات در تریتون ۰/۵ x۱۰۰ % در PBS برای ۲۰ دقیقه انکوبه شد، سپس برای دو ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد در SSC ×2/formamide%50 (0.3MNaCland0.3M sodium citrate) قرار گرفت. سپس برای ۵ دقیقه در SSC×2 شستشو داده شد و برای ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه در 2N HCl انکوبه شد و در بوریک اسید ۰/۱ مولار برای ۱۰ دقیقه قرار گرفت. بافت‌ها به مدت ۹۰ دقیقه برای ۶ بار در TBS شستشو داده و در TBS+ (0.1% X-Triton and 100 %3 normal in 0.1MTBS donkey serum) انکوبه شد. سپس قطعات شبانه در دمای ۴ درجه و در آنتی بادی مونوکلونال ویژه C- Kit و Ki67 انکوبه شد. سپس بافت‌ها برای ۳ بار در PBS شستشو داده و با آنتی بادی ثانویه برای یک ساعت انکوبه شدند. سپس بافت‌ها برای یک ساعت دیگر در avidin-peroxidase complex انکوبه شدند. برای قابل دیده شدن، قطعات در 50mM Tris-HCl حاوی 0.03% DAB، 40mg/ml nickel chloride و 0.03% هیدروژن پروکسیداز برای ۵ دقیقه انکوبه شدند. در مرحله آخر، نمونه توسط میکروسکوپ فلوروسنت مدل Olympus و با لنز ۴۰۰ برای تایید مارکرها مشاهده شدند.

تحلیل آماری

برای بررسی و تحلیل آماری، از نرم افزار SPSS 20 استفاده شد. برای بررسی توزیع طبیعی داده‌ها و تجانس واریانس‌ها، به ترتیب از آزمون‌های شاپیرووویک و لوین استفاده شد. همچنین، مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه، در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ و آزمون تعقیبی LSD انجام شد.

جدول ۳. توالی پرایمر

Nkx5-2	FOR: 5´-CTTCAAGCAACAGCGGTACC3-´ REV: 5´-ATCTTGACCTGCGTGGACG3-´
GAPDH	FOR:5´- GACATGCCGCCTGGAGAAAC 3-´ REV:5´- AGCCCAGGATGCCCTTTAGT 3-´

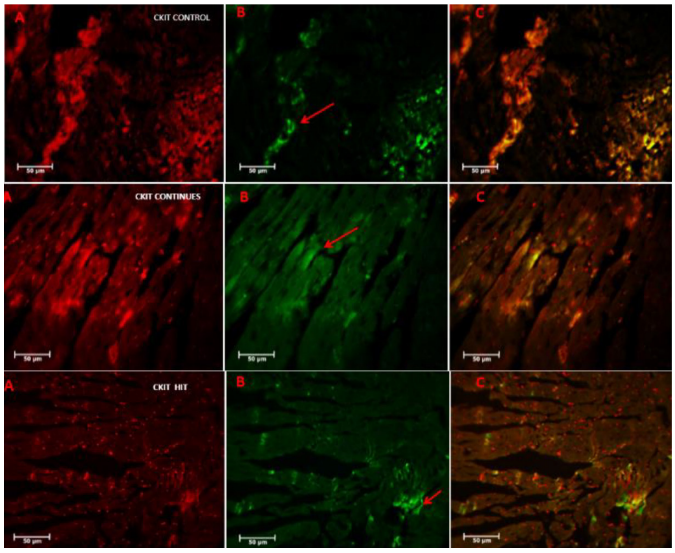
نتایج

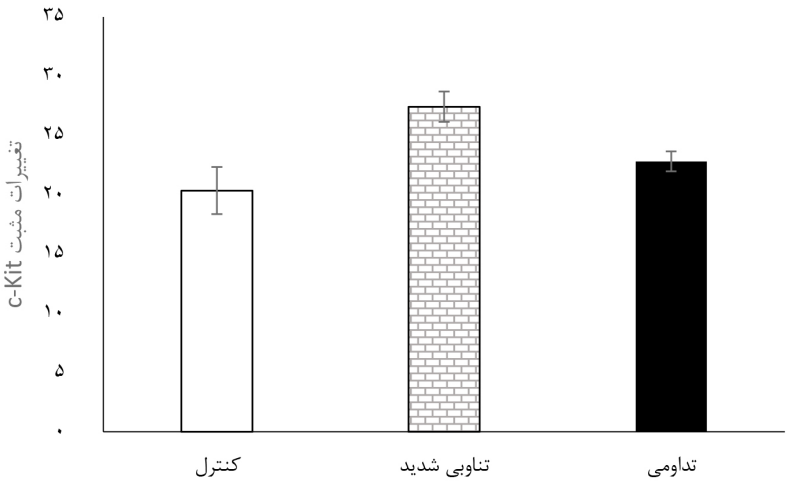
وزن نمونه‌ها قبل و پس از تمرینات، در جدول شماره ۴ آورده شده است.

نتایج به وسیله آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه، نشان داد که c-Kit در گروه HIIT ($p>۰/۰۰۱$) و در تمرین تداومی ($p<۰/۰۱۸$) نسبت به گروه کنترل، به طور معنی‌دار بیشتر بود.

جدول ۴. وزن نمونه‌ها قبل و پس از مداخله ی تمرینی

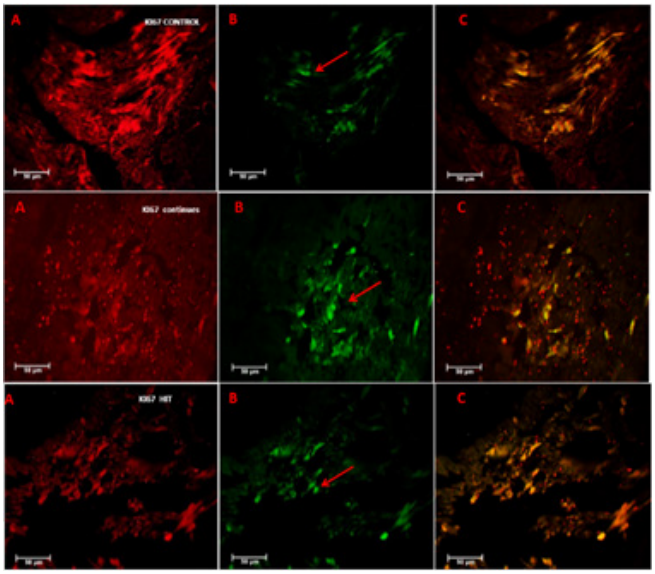
	کنترل	تداومی	تناوبی شدید
قبل	۳۸۱±۱۲	۳۶۲±۱۵	۳۵۴±۱۳
بعد	۳۹۲±۱۶	۳۶۸±۱۱	۳۷۱±۱۷

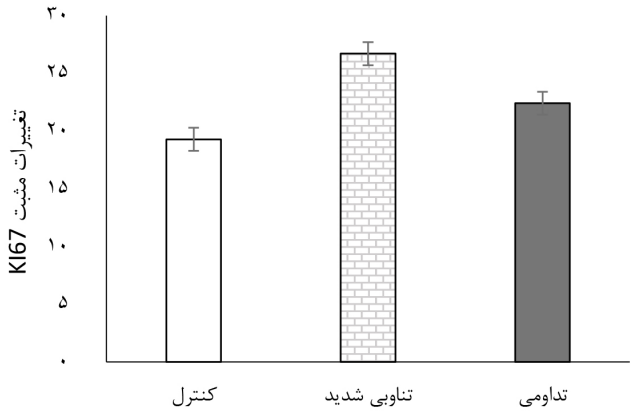




شکل ۱: نمودار تغییرات سلول‌های مثبت c–Kit و ایمونوهیستوشیمی سلول‌های c–Kit پس از ۶ هفته تمرین در گروه تمرین HIIT و گروه تداومی نسبت به گروه کنترل (مقادیر به شکل انحراف معیار ± میانگین بیان شده است)

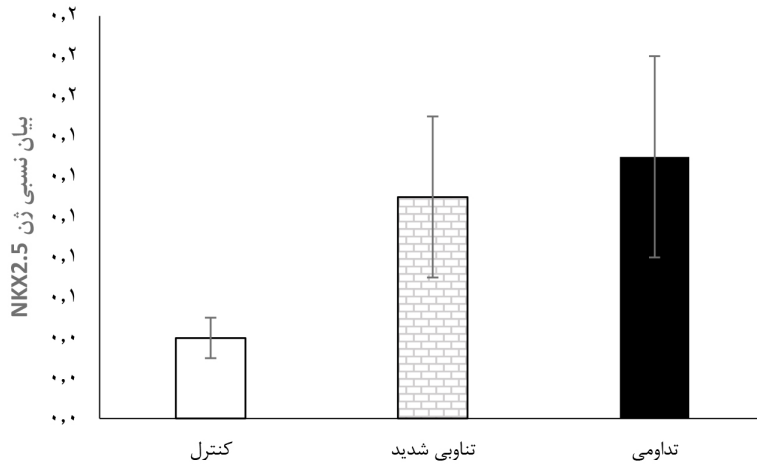
سلول‌های مثبت Ki۶۷ بعد از شش هفته HIIT ($P>۰/۰۰۱$) و تداومی ($P\leq۰/۰۵$) نسبت به گروه کنترل، افزایش معنی دار نشان داد که در گروه HIIT بیشتر بود.





شکل ۲: نمودار تغییرات سلول‌های مثبت Ki۶۷ و ایمونوهیستوشیمی سلول‌های Ki۶۷ پس از ۶ هفته تمرین در گروه تمرین HIIT و گروه تداومی نسبت به گروه کنترل (مقادیر به شکل انحراف معیار ± میانگین بیان شده است)

بیان ژن Nkx۲/۵ بعد از شش هفته HIIT (p<۰/۰۱۵) و تمرین تداومی(p<۰/۰۳) در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل، به طور معنی دار بالاتر بود.



شکل ۳. نمودار تغییرات بیان ژن Nkx۲/۵ پس از ۶ هفته تمرین در گروه HIIT و گروه تداومی نسبت به گروه کنترل. (مقادیر به شکل انحراف معیار ± میانگین بیان شده است)

بحث و نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که احتمالاً تعداد سلول‌های بنیادی قلبی، تحت تأثیر تمرینات بدنی افزایش می‌یابد. این میزان در گروه تمرینات HIIT نسبت به گروه تمرینات تداومی در سلول‌های c-Kit و Ki67 بیشتر بود. از آنجا که Ki67 بیانگر تعداد سلول-های در چرخه یـا growth fraction بوده و با توجه به اینکه به نظـر می‌رسـد مثبـت شـدن Ki67 بـه عنـوان نشانگری از فعالیـت تکثیـری سلول‌ها اسـت، افزایش Ki67 در اثر تمرینات در بافت قلب گروه‌های تمرینی، نشان دهنده افزایش تکثیر سلول-های جدید در بافت قلب است. همچنین، بیان ژن Nkx2.5 در گروه‌های HIIT و تداومی نسبت به گروه کنترل بیشتر بود و از آنجا که این عامل رونویسی در شکل گیری و توسعه قلب حائز اهمیت است و تغییرات میزان بیان آن بر هایپرتروفی قلب تأثیر می-گذارد، افزایش بیان این ژن در اثر فعالیت ورزشی، محرکی برای افزایش تمایز سلول‌های بنیادی ساکن در قلب به سلول‌های قلبی جدید است.

نتایج این پژوهش، با یافته‌های شیائو و همکاران (۲۰۱۴) و وارینگ و همکاران (۲۰۱۲) همسو می‌باشد. شیائو و همکارانش (۲۰۱۴)، نشان دادند که در موش‌هایی که به مدت ۲۱ روز شنا کرده بودند، مقادیر c-Kit و Sca-۱، به صورت معنی داری افزایش می‌یابد. علاوه بر این، پژوهش آنها نشان داد که فعالیت ورزشی شنا به هایپرتروفی فیزیولوژیکی موش‌ها منجر شده و باعث فعال‌سازی سلول‌های بنیادی پیش‌ساز قلبی می‌شود (۱۹). وارینگ و همکاران (۲۰۱۲) نیز نشان دادند، در موش‌هایی که با دو شدت بالا و پایین فعالیت ورزشی انجام داده‌اند، ظرفیت هوازی، کسر تزریقی، کسر کوتاه شدگی و سایر شاخص‌های آناتومیکی قلب در حد معنی داری افزایش یافت. همچنین، تشکیل کاردیومیوسیت‌های جدید در مقایسه با گروه کنترل غیرفعال، افزایش معنی داری داشت که این تغییرات، در گروه شدت بالا قابل توجه تر می‌باشد (۱۸). همچنین، وارینگ و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که تحریک سلول‌های بنیادی قلب با ۴ هفته تمرین کنترل شده شدید افزایش می‌یابد و ۴ هفته بی‌تمرینی، باعث از بین رفتن این اثر می‌شود (۲۶). به نظر می‌رسد که بخشی از نتایج این پژوهش را باید به افزایش ترشح عوامل رشدی مانند IGF-1 و HGF نسبت داد. همچنین نشان داده شده است که افزایش عوامل رشدی با بیش تنظیمی سلول‌های بنیادی c-Kit شده و با افزایش مقادیر پروتئین KI67 همراه می‌شود. لیته و همکارانش (۲۰۱۵) گزارش کردند که ۴ هفته شنا، تعداد CSCs ساکن در قلب را در موش‌ها، به صورت قابل توجهی افزایش می‌دهد و این با هایپرتروفی فیزیولوژیکی ناشی از فعالیت ورزشی همراه است (۲۵). به

نظر می‌رسد که ورزش از طریق تحریک سلول‌های بنیادی، تعداد کاردیومایوسیت‌ها را افزایش داده و ترمیم قلب را توسعه می‌دهد (۱۸،۱۹،۲۷).

در تحقیقی که روی افراد بالغ که با چرخ کارسنج به مدت ۸ هفته تمرین کردند، تغییری در محتوای سلول‌های بنیادی دیده نشد که با نتایج به دست آمده از این پژوهش همسو نیست (۲۸). با این حال، پروتکل مورد استفاده در این پژوهش، افزایشی در VO_2max القا نکرده که نشان می‌دهد، شدت، عاملی مهم برای سازگاری‌های نوزایی قلب محسوب می‌شود (۲۸). تمرینات تناوبی شدید با القای ترشح عوامل رشدی بیشتر، احتمالا سازگاری‌های بیشتری را نیز برای سلول‌های بنیادی قلب ایجاد کرده است.

از طرف دیگر، بیان ژن Nkx2.5 که یکی از عوامل مهم در رشد سلول‌های قلب جنین است، در قلب بزرگسالان نیز اثبات شده است. این ژن، در طول مسیر تمایز سلول‌های بنیادی افزایش می‌یابد و به نظر می‌رسد که قانون رونویسی کاردیومیسیت‌های جدید را کنترل می‌کند (۱۴). تحقیقات نشان داده است که احتمالاً محرک قوی تمایز سلول‌های بنیادی بالغ به سلول‌های قلبی بیان ژن Nkx2.5 و GATA4 است (۱۵،۱۶). بنابراین، افزایش معنی دار این ژن در دو گروه تمرینی نسبت به گروه کنترل، در موش‌های بالغ به احتمال زیاد باعث تحریک سلول‌های بنیادی بالغ به سلول‌های قلبی جدید می‌شود.

با توجه به تحقیقات اندکی که در بررسی تأثیر تمرینات ورزشی به عنوان محرکی برای افزایش تعداد سلول‌های بنیادی و توسعه عملکرد این سلول‌ها در بافت قلب بالغین وجود دارد، یافته‌های این پژوهش نشان داد که ۶ هفته تمرین ورزشی هوازی با دو پروتکل HIIT و تداومی، به طور معنی داری، میزان سلول‌های بنیادی قلبی را افزایش می‌دهد. همچنین، با توجه به تغییرات افزایشی سلول‌های c-Kit و Ki67 به وسیله تمرینات HIIT، به نظر می‌رسد که اثر فعالیت بدنی بر میزان سلول‌های بنیادی قلب، بیشتر وابسته به شدت تمرین باشد. یافته‌های این پژوهش، ظرفیت خود نوزایی سلول‌های بنیادی قلب به وسیله فعالیت‌های بدنی را برجسته تر می‌کند.

از جمله محدودیت‌های این پژوهش، طول مدت کوتاه تمرینات ورزشی بود که به نظر می‌رسد می‌تواند با سازگاری‌های بیشتری نیز همراه شود. تحقیقات آینده، با بررسی روند کاهش نوزایی بافت قلبی در طولانی مدت و نیز اثر ورزش طولانی مدت بر ظرفیت خود نوزایی بافت قلبی می‌تواند یافته‌های ارزشمندی را به نتایج این پژوهش بیفزاید.

تشکر و قدردانی

این پژوهش، مستخرج از رساله دکتری دانشگاه تهران و هزینه شخصی نویسندگان می‌باشد. از تمام افرادی که برای انجام این پژوهش ما را یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌شود.

پی نوشت ها

[1]Human cardiac stem cells

[2]Cardiac stem cell

[3]Adult stem cells

منابع

1. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabé-Heider F, Walsh S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. Science. 2009;324(5923):98-102.

2. Kajstura J, Rota M, Cappetta D, Ogórek B, Arranto C, Bai Y, et al. Cardiomyogenesis in the aging and failing human heart. Circulation. 2012:. 112.118380.

3. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. cell. 2000;100(1):157-68.

4. Bergmann O, Jovinge S. Cardiac regeneration in vivo: mending the heart from within?

Stem cell research. 2014;13(3):523-31.
5. Smart N, Bollini S, Dubé KN, Vieira JM, Zhou B, Davidson S, et al. De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury. Nature. 2011;474(7353):640-44.
6. Vincent SD, Buckingham ME. Chapter One-How to Make a Heart: The Origin and Regulation of Cardiac Progenitor Cells. Current topics in developmental biology. 2010;90:1-41.
7. Torella D, Ellison G, Karakikes I, Nadal-Ginard B. Resident cardiac stem cells. Cell Mol Life Sci. 2007;64(6):661-73.
8. Chong JJ, Chandrakanthan V, Xaymardan M, Asli NS, Li J, Ahmed I, et al. Adult cardiac-resident MSC-like stem cells with a proepicardial origin. Cell stem cell. 2011;9(6):527-40.
9. Ellison GM, Vicinanza C, Smith AJ, Aquila I, Leone A, Waring CD, et al. Adult c-kit pos cardiac stem cells are necessary and sufficient for functional cardiac regeneration and repair. Cell. 2013;154(4):827-42.
10.Waring CD, Vicinanza C, Papalamprou A, Smith AJ, Purushothaman S, Goldspink DF, et al. The adult heart responds to increased workload with physiologic hypertrophy, cardiac stem cell activation, and new myocyte formation. European heart journal. 2012;35(39):2722-31.
11. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. Cell. 2003;114(6):763-76.
12. Takeuchi JK, Bruneau BG. Directed transdifferentiation of mouse mesoderm to heart tissue by defined factors. Nature. 2009;459(7247):708-11.
13. Song K, Nam Y-J, Luo X, Qi X, Tan W, Huang GN, et al. Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors. Nature. 2012;485(7400):599-604.
14. Stennard FA, Costa MW, Elliott DA, Rankin S, Haast SJ, Lai D, et al. Cardiac T-box factor Tbx20 directly interacts with Nkx2-5, GATA4, and GATA5 in regulation of gene expression in the developing heart. Developmental biology. 2003;262(2):206-24.
15. Chen G-C, Ruan Z-B, Yin Y-G, Zhu L. The mechanism underlying the differentiation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells into myocardial cells induced by 5-azacytidine. Indian journal of medical sciences. 2010;64(9):402.
16. Ruan Z, Zhu L, Yin Y, Chen G. Overexpressing NKx2. 5 increases the differentiation of human umbilical cord drived mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2016;78:110-15.
17. Boström P, Mann N, Wu J, Quintero PA, Plovie ER, Panáková D, et al. C/EBPβ controls exercise-induced cardiac growth and protects against pathological cardiac remodeling. Cell. 2010;143(7):1072-83.
18. Waring CD, Vicinanza C, Papalamprou A, Smith AJ, Purushothaman S, Goldspink DF, et al. The adult heart responds to increased workload with physiologic hypertrophy, cardiac stem cell activation, and new myocyte formation. European heart journal.

2012;35(39):2722-31.
19. Xiao J, Xu T, Li J, Lv D, Chen P, Zhou Q, et al. Exercise-induced physiological hypertrophy initiates activation of cardiac progenitor cells. International journal of clinical and experimental pathology. 2014;7(2):663.
20. Ellison GM, Galuppo V, Vicinanza C, Aquila I, Waring CD, Leone A, et al. Cardiac stem and progenitor cell identification: different markers for the same cell. Front Biosci (Schol Ed). 2010;2:641-52.
21. Ellison GM, Waring CD, Vicinanza C, Torella D. Physiological cardiac remodelling in response to endurance exercise training: cellular and molecular mechanisms. Heart. 2011;98(1):5-10.
22. Thomas C, Bishop D, Moore-Morris T, Mercier J. Effects of high-intensity training on MCT1, MCT4, and NBC expressions in rat skeletal muscles: influence of chronic metabolic alkalosis. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 2007;293(4):916-22.
23. Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. Physiological reviews. 2005;85(4):1373-416.
24. Gage FH. Mammalian neural stem cells. Science. 2000;287(5457):1433-38.
25.Leite CF, Lopes CS, Alves AC, Fuzaro CSC, Silva MV, de Oliveira LF, et al. Endogenous resident c-Kit cardiac stem cells increase in mice with an exercise-induced, physiologically hypertrophied heart. Stem cell research. 2015;15(1):151-64.
26. Waring CD, Henning BJ, Smith AJ, Nadal-Ginard B, Torella D, Ellison GM. Cardiac adaptations from 4 weeks of intensity-controlled vigorous exercise are lost after a similar period of detraining. Physiological reports. 2015;3(2):e12302.
27. Ellison G, Mendicino I, Sacco W, Purushothaman C, Indolfi C, Goldspink D, et al. Exercise-induced cardiac stem cell activation and ensuing myocyte hyperplasia contribute to left ventricular remodelling. Proceedings of The Physiological Society–Heart and Cardiac Muscle Abstracts. 2008;11: 17.
28. Thijssen DH, Vos JB, Verseyden C, Van Zonneveld AJ, Smits P, Sweep FC, et al. Haematopoietic stem cells and endothelial progenitor cells in healthy men: effect of aging and training. Aging cell. 2006;5(6):495-503.
29. Park J-H, Miyashita M, Kwon Y-C, Park H-T, Kim E-H, Park J-K, et al. A 12-week after-school physical activity programme improves endothelial cell function in overweight and obese children: a randomised controlled study. BMC pediatrics. 2012;12(1):111.
30. Walther C, Gaede L, Adams V, Gelbrich G, Leichtle A, Erbs S, et al. Effect of increased exercise in school children on physical fitness and endothelial progenitor cells. Circulation. 2009;120(22):2251-59.

Shahid Beheshti University

Sport and Exercise Physiology

Autumn and winter 2019/ No.2/ Vol. 12/ Pages:55-66

The effect of high intensity interval and continues training on cardiac stem cells function and myocardial regeneration capacity in male rats

Arezoo Eskandari[1], Rahman Soori[*1],Siroos Chobineh[1], Zohreh mazaheri tirani[2]

[1]Faculty of Physical Education and sport science, Tehran University, Tehran, Iran.

[2]Histogenotac institute, Tehran, Iran.

Received: 12/01/2018 Revised: 23/07/2018 Accepted: 04/08/2018

Abstract

Purpose: Adult cardiac stem cells have ability to regenerate and repair cardiac cells through proper stimulation. Cardiac regeneration capacity decreases with ageing, while physical activities play a positive role in this case. The aim of this study was the effect of high intensity interval and continues training on cardiac stem cells function and myocardial regeneration capacity in male rats.

Methods: Twenty-four Vistar male rats (365.6±13.3 g, 6-8 month) were divided into three groups HIIT (high intensity) continuous and control. The training protocol was performed 5 sessions per week for 6 weeks. The heart rats were extracted and c-Kit and Ki67 values were analyzed by Immunohistochemistry and Nkx2.5 gene expression for cardiac stem cells was measured by Real Time-PCR. The data were analyzed by one-way ANOVA (P≤0.05).

Results: According to the results of this study, there was a significant increase in c-Kit cells in the HIIT (P=0.001) and in the continuous group (P=0.018) and Significant increase in positive Ki67 cells in the HIIT group (P=0.001) and continuous group (P=0.05). This increase was greater in the HIIT group. As well as a significant increase was observed in the Nkx2.5 gene expression in the HIIT training group (P=0.015) and in the continuous group (P=0.03) which increased in the continuous group was grater.

Conclusion: The results showed that the intensity of training is more effective for cardiac regeneration adaptation and HIIT have more positive effects on differentiation of cardiac stem cells.

Keywords: HIIT, continuous Training, Cardiac Stem Cells, c-Kit, Nkx2.5

*Corresponding Author: Rahman Soori, Tel: 6118899-021, E-mail: soori@ut.ac.ir