



تأثیر 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

^۱دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
^۲موسسه تحقیقاتی هیستوتونوتک پاسارگاد، تهران، ایران.

پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۰۵/۱۳

ویرایش مقاله: ۱۳۹۷/۰۵/۰۱

دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۱۰/۲۲

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 تأثیر تمرین تناوبی شدید و تمرین تداومی، بر عملکرد سلول‌های بنیادی و ظرفیت خود نوزایی سلول‌های میوکارد موش‌های صحرایی است.

روش‌ها: تعداد ۲۳ موش صحرایی ویستار نر بالغ (۳/۱۳±۶/۳۶۵ 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 Ki۶۷ به روش ایمونوهیستوشیمیایی و بیان ژن Nkx۲/۵ به روش RealTime-PCR بررسی شد. روش آماری تحلیل واریانس نیز یک طرفه با معنی داری $P \leq 0/05$ استفاده شد.

نتایج: افزایش معنی دار سلول‌های مثبت C-Kit در گروه HIIT ($P=0/001$) و در گروه تداومی ($P=0/018$) مشاهده شد که این افزایش در گروه HIIT بیشتر بود. افزایش معنی دار سلول‌های مثبت Ki۶۷ در گروه HIIT ($P=0/001$) و گروه تداومی ($P=0/005$) مشاهده شد که این افزایش در گروه HIIT بیشتر بود. همچنین افزایش معنی دار بیان ژن Nkx۲/۵ در گروه HIIT ($P=0/015$) و در گروه تداومی ($P=0/003$) 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 تأثیرات مثبت بیشتری بر تمایز سلول‌های بنیادی قلبی دارد.

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

مقدمه

ضروری است (۱۲،۱۳). در واقع، دودمان C-Kit سلول های کوچکی با یک نسبت بالای هسته در سیتوپلاسم است که زمانی که شروع به تمایز به سلول های بنیادی می کند، Nkx2.5 را بیان می کند (۱۲). ژن Nkx2.5، در شکل گیری و توسعه سلول های قلب عمل می کند. میزان بیان آن، بر هایپرتروفی قلب تأثیر می گذارد. Nkx2.5 در رشد اولیه جنین بیان می شود و در رشد قلب نیز بیان آن ادامه می یابد. بیان ژن Nkx2.5 به تدریج در طول مسیر تمایز سلول های بنیادی افزایش می یابد، که ممکن است قانون رونویسی کاردیوماسیت ها را کنترل کند (۱۴). تحقیقات نشان داده است که سلول های بنیادی بالغ، می توانند به سلول های قلبی تمایز پیدا کنند که احتمالاً محرک این فرآیند، بیان ژن Nkx2.5 هستند (۱۵،۱۶). مطالعات بسیاری نشان داده اند که فعالیت ورزشی، چه در گونه های حیوانی و چه در گونه های انسانی، به بهبود شاخص های عملکردی قلبی منجر می شود. از دیدگاه سنتی، فعالیت ورزشی استقامتی با شدت متوسط، تعیین کننده رشد فیزیولوژیکی متعادل و برگشت پذیر قلب، از طریق هایپرتروفی کاردیومیوسیت ها به همراه یک رگ زایی مناسب است. از طرفی دیگر، به تازگی نشان داده شده است که فعالیت ورزشی از راه تشکیل کاردیومیوسیت های جدید، به رشد قلبی منجر می شود (۱۷). همچنین مطالعات سال های اخیر بر روی فعالیت ورزشی در زمینه نوزایی قلبی و تشکیل کاردیومیوسیت های جدید مشاهده کرده اند که ظرفیتی قلبی، همبستگی مثبت بیشتری با شدت فعالیت ورزشی دارد (۱۸). با توجه افزایش ظرفیت بالقوه توسط فعالیت ورزشی تحت تأثیر سطحی از عوامل رشدی خاص و میتوز مثبت، به نظر می رسد که تمرین بدنی ممکن است باعث تحریک بسیاری از تمایزهای سلول ها برای ترویج تکثیر سلول های بنیادی بزرگسالی^۳ (ASC) شود (۱۹). چندین پژوهش، تأثیر فعالیت ورزشی بر ظرفیت نوزایی قلبی را در گونه های حیوانی بررسی کرده اند که برخی از آنها گزارش داده اند که به دنبال انواع فعالیت ورزشی، ظرفیت نوزایی قلبی از طریق افزایش تشکیل کاردیومیوسیت های جدید افزایش می یابد (۱۷-۲۱). همچنین، پژوهش های جدید

کشف جمعیتی از سلول های 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 می دهد که کاردیومیوسیت ها، بالاترین ظرفیت نوزایی را در میان سایر سلول های 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 سلول های بنیادی قلبی انسان^۱ (HCSC) تأثیر می گذارد (۴-۲). سلول های بنیادی، جمعیتی از سلول ها با توان بالقوه در خودنوزایی و تمایز به انواع سلول ها می باشند. سلول های بنیادی، سلول های اولیه ای هستند که برخی از انواع آنها به نام سلول های بنیادی پر توان، توانایی ایجاد هر نوع سلول را در بدن دارند. سلول های بنیادی در بافت های مختلف، دارای ظرفیت تزیید وجود دارند و می توانند با تکثیر رده های سلولی اختصاصی، بافت را ایجاد و بافت های معیوب را تعمیر کنند. آن ها با تقسیم، می توانند سلول های مشابه خود را ایجاد نمایند و تحت تحریکات فیزیولوژیک یا آزمایشگاهی به سلول هایی با عملکرد اختصاصی مانند سلول های عضلانی قلب، سلول های پوست و سلول های کبدی تبدیل شوند (۳). تحقیقات نشان داده است که سلول های بنیادی قلبی^۲ (CSC)، برای بازسازی سلول های عضلات قلبی آسیب دیده ضرورت دارد. سلول های بنیادی قلب در جنینی، نوزادی و قلب پستانداران بزرگسال، توسط نشانگرهای غشایی (Sca، 1-C-Kit) و عامل های نسخه برداری (Isl-1, Nkx2.5, GATA4) مشخص می شود (۵-۸). سلول های درون زای بالغ CD45، C-Kit، سلول های بنیادی شرکت کننده در سازگاری به تنش های میوکارد هستند (۹،۱۰). هنگامی که به قلب پیوند زده می شوند، بیشترین بازسازی در سلول های قلبی و سلول های عروقی ریز مشاهده می شود (۱۱) C-Kit. سلول های بنیادی قلب بزرگسالان GATA4 و Nkx2.5 که دو عامل اصلی رونویسی اولیه دودمان قلب هستند را بیان می کنند که برای تمایز مزودرم و برنامه ریزی مجدد فیبروبلاست ها به دودمان CM

سانتی‌متر با چرخه روشنایی / تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت، در دمای محیطی 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد، رطوبت هوای 50 ± 5 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. 1395005.UT.REC) 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، فعالیت 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 بی‌هوش شدند و در محیط کاملاً 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

نشان داده اند که تمرین ورزشی، موجب افزایش میزان بیان ژن C-Kit بافت قلب می‌شود (۱۰،۱۹). وارننگ (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 پرهزینه‌ای 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 میتوز 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 $30 \times 15 \times 15$

جدول ۱. 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
۴	۸	۲:۲	%۱۰۰	%۵۰	%۷۵
۵	۸	۲:۲	%۱۰۰	%۵۰	%۷۵
۶	۸	۲:۲	%۱۰۰	%۵۰	%۷۵

جدول ۲. 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
۴	%۷۰	۳۰
۵	%۷۰	۳۰
۶	%۷۰	۳۰

از بافت قلب هر گروه بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد و سپس جهت انجام آزمایشات سلولی مولکولی در فریزر ۸۰- 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.

استخراج Total RNA به نسبت ۱ به ۱۰ در QIAzol Lysis Reagent هموزن شد. به منظور برداشتن اجزاء پروتئینی، محصول حاصل در 4°C، 10min، با دور 12000 سانتریفوژ گردید. سپس به نسبت ۱ به ۵/۰ با کلروفرم مخلوط و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. محصول در 4°C، 15min، 12000 سانتریفوژ و بخش معدنی و آبی از هم جدا شدند. بخش محتوی RNA برداشته و با نسبت ۱ به ۵/۰ با ایزوپروپانول مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق رها و سپس در 4°C، 10min، 12000 سانتریفوژ شد. پلیت حاوی RNA در اتانول شستشو و در ۲۰۰ μL آب RNase-Free حل گردید.

از بافت قلب هر گروه بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد و سپس جهت انجام آزمایشات سلولی مولکولی در فریزر ۸۰- 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

۶۵ درجه سانتی گراد در 50% formamide ×2 SSC (0.3M NaCl and 0.3M sodium citrate) قرار گرفت. سپس برای ۵ دقیقه در 2× SSC 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% Triton X-100 and 3% normal donkey serum in 0.1M TBS) 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 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 شاپیروویک و لوین استفاده شد. همچنین، مقایسه میانگین دادهها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه، در سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ و آزمون تعقیبی LSD انجام شد.

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 ۱ μg از RNA و با استفاده از Random hexamer primer و آنزیم Mmulv Reverse transcriptase انجام گرفت. جهت اندازه گیری 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 ۲۰ μL و هر واکنش به صورت دو بار تکرار صورت پذیرفت. طراحی پرایمرها، بر اساس اطلاعات ژنهای در بانک ژنی NCBI و توسط شرکت ماکرو ژن (Macrogen Inc., Seoul, Korea) انجام شد. ضمن اینکه از GAPDH، 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 مورد نظر 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 رنگ آمیزی ایمونو هیستوشیمی بافت قلب با ضخامت 5 μm برش داده شد. پس از دپارافینه شدن، در ابتدا قطعات در تریتون ۱۰۰ × ۰/۵% در PBS برای ۲۰ دقیقه انکوبه شد، سپس برای دو ساعت در دمای

جدول ۳. توالی پرایمر

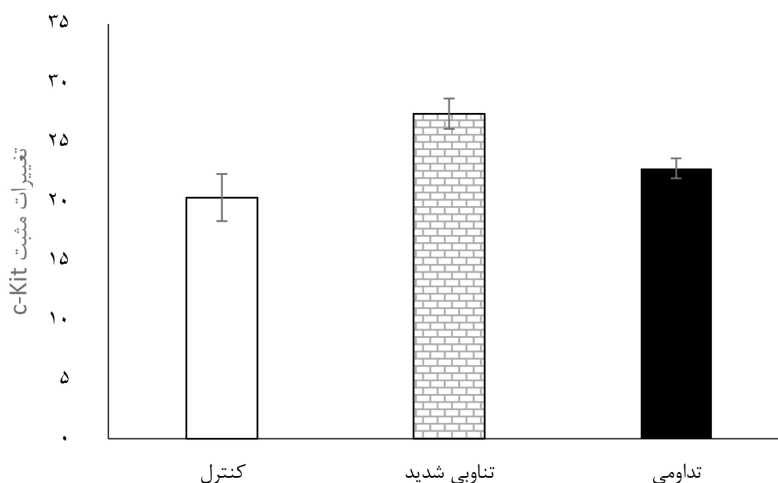
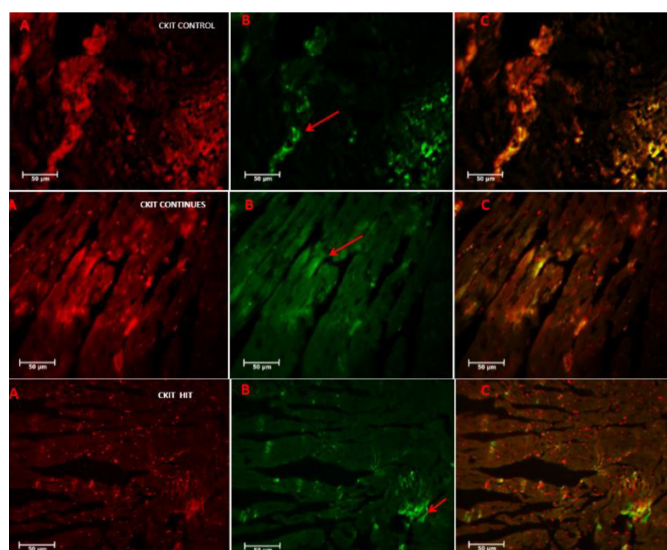
Nkx5-2	FOR: 5'-CTTCAAGCAACAGCGGTACC3-' REV: 5'-ATCTTGACCTGCGTGACG3-'
GAPDH	FOR: 5'- GACATGCCGCTGGAGAAAC 3-' REV: 5'- AGCCAGGATGCCCTTAGT 3-'

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

تناوبی شدید	تداومی	کنترل	
۲۵۲±۱۳	۳۶۲±۱۵	۳۸۱±۱۲	قبل
۳۷۱±۱۷	۳۶۸±۱۱	۳۹۲±۱۶	بعد

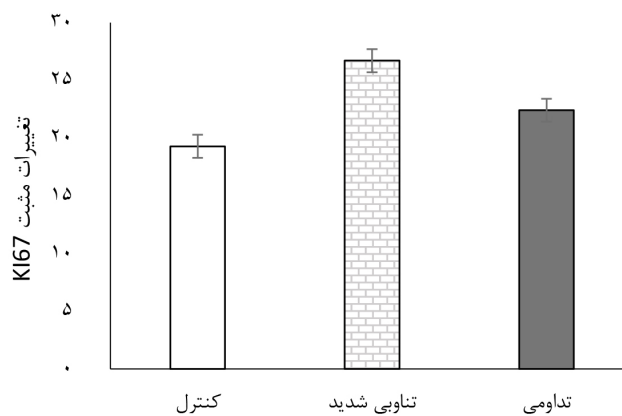
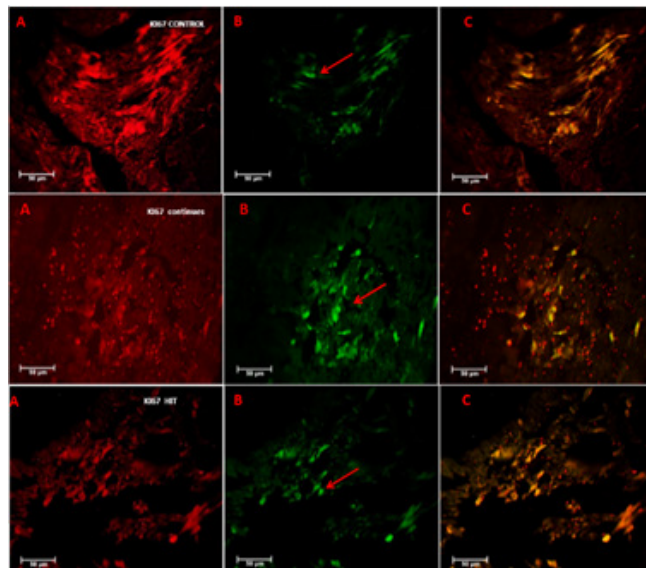
نتایج

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 ($p > 0.001$) و در تمرین تداومی ($p < 0.018$) نسبت به گروه کنترل، به طور معنی‌دار بیشتر بود.

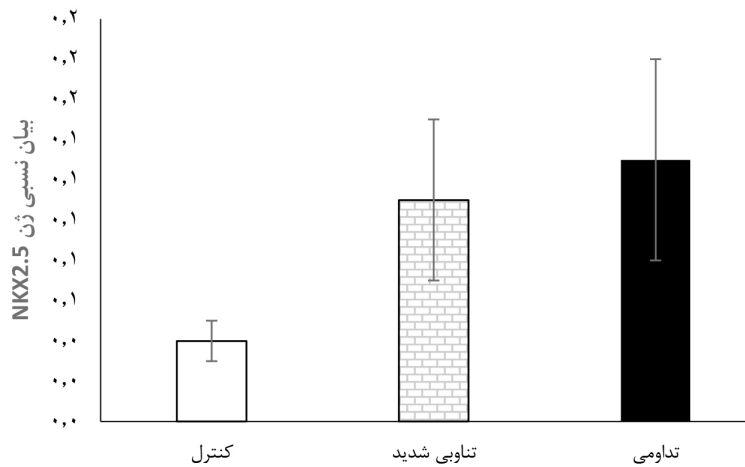


شکل ۱: نمودار تغییرات سلول‌های مثبت c-Kit و ایمونوهیستوشیمی سلول‌های c-Kit پس از ۶ هفته تمرین در گروه تمرین HIIT و گروه تداومی نسبت به گروه کنترل (مقادیر به شکل انحراف معیار ± میانگین بیان شده است)

سلول‌های مثبت Ki67 بعد از شش هفته HIIT ($P > 0.001$) و تداومی ($P \leq 0.05$) نسبت به گروه کنترل، افزایش معنی‌دار نشان داد که در گروه HIIT بیشتر بود.



شکل ۲: نمودار تغییرات سلول‌های مثبت Ki67 و ایمونوهیستوشیمی سلول‌های Ki67 پس از ۶ هفته تمرین در گروه تمرین HIIT و گروه تداومی نسبت به گروه کنترل (مقادیر به شکل انحراف معیار \pm میانگین بیان شده است) بیان ژن NKX2/5 بعد از شش هفته HIIT ($p < 0.015$) و تمرین تداومی ($p < 0.03$) در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل، به طور معنی‌دار بالاتر بود.



شکل ۳. نمودار تغییرات بیان ژن Nkx2.5 پس از ۶ هفته تمرین در گروه HIIT و گروه تداومی نسبت به گروه کنترل. (مقادیر به شکل انحراف معیار \pm میانگین بیان شده است)

بحث و نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که احتمالاً تعداد سلول های بنیادی قلبی، تحت تأثیر تمرینات بدنی افزایش می یابد. این میزان در گروه تمرینات HIIT نسبت به گروه تمرینات تداومی در سلول های c-Kit و Ki67 بیشتر بود. از آنجا که Ki67 بیانگر تعداد سلول های در چرخه یا growth fraction بوده و با توجه به اینکه به نظر می رسد مثبت شدن Ki67 به عنوان نشانگری از فعالیت تکثیری سلول ها است، افزایش Ki67 در اثر تمرینات در بافت قلب گروه های تمرینی، نشان دهنده افزایش تکثیر سلول های جدید در بافت قلب است. همچنین، بیان ژن Nkx2.5 در گروه های 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 سلول های بنیادی ساکن در قلب به سلول های قلبی جدید است.

نتایج این پژوهش، با یافته های شیائو و همکاران (۲۰۱۴) و وارینگ و همکاران (۲۰۱۲) همسو می باشد. شیائو و همکارانش (۲۰۱۴)، نشان دادند که در موش هایی که به مدت ۲۱ روز شنا کرده بودند، مقادیر c-Kit و Sca-1، به صورت معنی داری افزایش می یابد. علاوه بر این، پژوهش

آنها نشان داد که فعالیت ورزشی شنا به هایپرتروفی فیزیولوژیکی موش ها منجر شده و باعث فعال سازی سلول های بنیادی پیش ساز قلبی می شود (۱۹). وارینگ و همکاران (۲۰۱۲) نیز نشان دادند، در موش هایی که با دو شدت بالا و پایین فعالیت ورزشی انجام داده اند، ظرفیت هوازی، کسر تزریقی، کسر کوتاه شدگی و سایر شاخص های آناتومیکی قلب در حد معنی داری افزایش یافت. همچنین، تشکیل کاردیومیوسیت های جدید در مقایسه با گروه کنترل غیرفعال، افزایش معنی داری داشت که این تغییرات، در گروه شدت بالا قابل توجه تر می باشد (۱۸). همچنین، وارینگ و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که تحریک سلول های بنیادی قلب با ۴ هفته تمرین کنترل شده شدید افزایش می یابد و ۴ هفته بی تمرینی، باعث از بین رفتن این اثر می شود (۲۶). به نظر می رسد 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 سلول های بنیادی c-Kit شده و با افزایش مقادیر پروتئین Ki67 همراه می شود. لیته و همکارانش (۲۰۱۵) گزارش کردند که ۴ هفته شنا، تعداد CSCs ساکن در قلب را در موش ها، به صورت قابل توجهی افزایش می دهد و این با هایپرتروفی فیزیولوژیکی ناشی از فعالیت ورزشی همراه است (۲۵). به

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.

پی‌نوشت‌ها

¹Human cardiac stem cells

²Cardiac stem cell

³Adult 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?

نظر می‌رسد که ورزش از طریق تحریک سلول‌های بنیادی، تعداد کاردیومیوسیت‌ها 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، احتمالاً 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 کاردیومیوسیت‌های 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 $Ki67$ و $c-Kit$ 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

- 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 driven 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/EBP β 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.



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

Arezoo Eskandari¹, Rahman Soori^{*1}, Siroos Chobineh¹, Zohreh mazaheri tirani²

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

²Histogenotac 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 ($P \leq 0.05$).

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