

The effect of eight week of high intensity interval training on expression of mir-210 and ephrinA3 mrna in soleus muscle healthy male rats

Shafiee A^{1*}, Kordi MR¹, Gaeini AA¹, Soleimani M², Nekouei A¹, Hadidi V¹

1- Department of Exercise Physiology, Tehran University, Tehran, Iran

2- Department of Hematology, TarbiatModarres University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 4 Feb 2014, Accepted: 23 Apr 2014

Abstract

Introduction: Mir-210, is proangiogenic microRNA in endothelial cells. This microRNA, causes the repression of some genes and proteins target; so cause angiogenesis process. The purpose of this study was to determine the effect of a High Intensity Interval Training (HIIT) on Mir-210 and EphrinA3 receptor genes expression in soleus muscles of male rats.

Materials and Methods: In this experimental study, Twelve Wistar male rats (age of eight weeks, average weight of $210/5 \pm 9/77$) were randomly divided into exercise (n=6) and control (n=6) groups. High Intensity Interval Training was formed five days a week for eight weeks to tally including three intervals (four minutes with an intensity of 90 to 100% VO₂max and two minutes with an intensity of 50 to 60% VO₂max). 24 hours after exercise protocol, the rats were dissected and separated soleus muscle. Mir-210 and EphrinA3 receptor genes expression was performed by Real Time-PCR technique. Mir-210 and EphrinA3 receptor genes expression were calculated by using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ and independent t-test to determine the significance of variables.

Results: Results showed that HIIT there had no significant effects on Mir-210 gene expression (p=0/16); whereas EphrinA3 gene expression in the exercise group was statistically significant (p=0/000).

Conclusions: It seems that a non-significant increase of Mir-210 and reduce in EphrinA3 gene expression, causes proangiogenic operation of endothelial cells and an increase in VO₂max of rats following eight weeks of HIIT performance can be due to increased angiogenesis process.

Keywords: Angiogenesis, EphrinA3 receptor, High Intensity Interval Training, MicroRNA

*Corresponding author:

Address: Department of Exercise Physiology, Tehran University, Tehran, Iran

Email: A.shafiee@ut.ac.ir

تأثیر هشت هفته تمرینات تناوبی خیلی شدید بر بیان ژن‌های *Mir-210* و گیرنده *EphrinA3* در عضله نعلی رت‌های نر سالم

احد شفیعی^{1*}، محمدرضا کردی²، عباسعلی گائینی³، مسعود سلیمانی⁴، امین نکویی¹، وحید حدیدی¹

1- کارشناس ارشد فیزیولوژی ورزش، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

2- دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

3- استاد، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

4- دانشیار، گروه هماتولوژی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 92/11/15 تاریخ پذیرش: 93/2/3

چکیده

زمینه و هدف: *Mir-210*، میکرو RNA پروآنژیوژنزی سلول‌های اندوتلیال می‌باشد. این میکرو RNA، از طریق سرکوب برخی هدف‌های ژنی و پروتئینی باعث فرآیند آنژیوژنز می‌شود. هدف از این مطالعه، تعیین چگونگی اثرگذاری تمرین تناوبی خیلی شدید بر بیان ژن‌های *Mir-210* و گیرنده *EphrinA3* عضله نعلی رت‌های نر سالم بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تجربی - آزمایشگاهی 12 سر رت نر نژاد ویستار در سن هشت هفتهگی با میانگین وزن $210/5 \pm 9/77$ گرم انتخاب و به صورت تصادفی به دو گروه کنترل و تمرین تقسیم شدند. تمرین تناوبی خیلی شدید در پنج روز در هفته و در مجموع به مدت هشت هفته شامل سه تناوب (چهار دقیقه با شدت 90 تا 100 درصد VO_{2max} و دو دقیقه با شدت 50 تا 60 درصد VO_{2max}) بود. 24 ساعت پس از اتمام پروتکل تمرینی، رت‌ها تشریح و عضله نعلی آنها جدا شد. میزان بیان ژن‌های *Mir-210* و گیرنده *EphrinA3* با تکنیک Real time-PCR انجام گرفت. میزان بیان ژن‌های *Mir-210* و گیرنده *EphrinA3* با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد. برای تعیین معنی‌دار بودن متغیرها بین گروه‌های تحقیق از آزمون آماری تی مستقل استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد، اجرای تمرینات تناوبی خیلی شدید موجب تغییر معنی‌داری بر بیان ژن *Mir-210* نشد ($p=0/16$) ولی بیان ژن *EphrinA3* در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل معنی‌دار شد ($p=0/000$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد افزایش هرچند غیر معنی‌دار *Mir-210* و کاهش بیان ژن *EphrinA3* باعث عملکرد پروآنژیوژنزی سلول‌های اندوتلیالی می‌شود و افزایش VO_{2max} رت‌ها در پی هشت هفته اجرای تمرینات تناوبی خیلی شدید می‌تواند ناشی از افزایش فرآیند آنژیوژنز باشد.

واژگان کلیدی: رگ‌زایی، گیرنده اندوتلیالی *EphrinA3*، تمرینات تناوبی خیلی شدید، میکرو RNA

*نویسنده مسئول: تهران، امیرآباد شمالی، دانشگاه تهران، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی

Email: A.shafiee@ut.ac.ir

مقدمه

سازگاری های متعددی پس از تمرین های ورزشی در بدن ایجاد می شود که به کاهش آمار مرگ و میر ناشی از بیماری های قلبی - عروقی و به بهبود اجرای ورزشی کمک می کند. از اصلی ترین این سازگاری ها، افزایش جریان خون عضله می باشد، که این افزایش با تغییر چگالی مویرگی و حداکثر اکسیژن مصرفی همراه است (1-4). یکی از تغییراتی که هنگام تمرینات ورزشی در ساختار عروقی عضله اسکلتی برای رفع شرایط استرسی رخ می دهد، آنژیوژنز (Angiogenesis) است. آنژیوژنز به معنای افزایش چگالی مویرگی عضله اسکلتی و قلبی و شامل رشد مویرگ های جدید در عضله اسکلتی است که با تکثیر و مهاجرت سلول های اندوتلیال همراه و به دو شکل جوانه زدن (Sprout) و دو نیم شدن مویرگ های (Intussuseption) موجود می باشد (5). فرآیند آنژیوژنز یکی از سازگارهای بسیار مهم در بافت های متعدد بدن (عضله اسکلتی، قلب، مغز، کلیه و غیره) همراه با تمرینات ورزشی محسوب می شود، لذا هنگام فعالیت ورزشی حدود 80 درصد خون در حال گردش به سوی عضله اسکلتی (45 درصد وزن بدن را تشکیل می دهد) فرستاده می شود تا میزان اکسیژن بیشتری به عضله اسکلتی برسد و انرژی فعالیت ورزشی (تنفس میتوکندریایی) در حد مطلوبی تامین شود، از این منظر فرآیند آنژیوژنز در این بافت حائز اهمیت می باشد. در واقع، رگ زایی فرآیند پیچیده ای است که مستلزم درگیری انواع سلول ها (سلول های اندوتلیال و عضله صاف) و همچنین شامل مسیرهای پیام دهی شناخته شده (- MAPK) $Erk1/2$ - $PI3K$ -Akt، عوامل رشدی گوناگون (- TGF) $VEGF$ - FGF Kinase و وجود گیرنده هایی هم چون FMS -related KDR insert domain receptor (FLT-4 FMS -related tyrosine kinase 1 FLT-1 tyrosine kinase 4 و آنزیم هایی از خانواده MMPs و همچنین تنظیم کنندگی $miRNAs$ microRNA می باشد (6-10). $miRNAs$ مولکول های RNA رمزنگاری نشده کوچکی (18-25)

نوکلئوتیدی) هستند که این مولکول ها بیان ژن را پس از رونویسی از طریق مهار ترجمه mRNA یا القای تجزیه آن کنترل می کنند و این کار را از طریق اتصال به ناحیه ترجمه نشدنی انتهای mRNAs انجام می دهند. $miRNAs$ بسیاری از جنبه های آنژیوژنز را مثل تکثیر و مهاجرت سلول های اندوتلیال را تنظیم می کنند. $miRNAs$ تنظیم کننده آنژیوژنز، به دو دسته پرو آنژیوژنیک (Pro- $Mir-210$) (angiogenic) که آنژیوژنز را افزایش می دهند و آنتی آنژیوژنیک (Anti-angiogenic) که آنژیوژنز را مهار می کنند، تقسیم می شوند (11). از میان $miRNAs$ پرو آنژیوژنیک که باعث افزایش فرآیند رگ زایی می شوند، مشاهده شده است که $Mir-210$ به عنوان یک تنظیم گر اصلی عمل می کند و یکی از 35 ژن هدف شناخته شده آن گیرنده $EphrinA3$ می باشد. $Mir-210$ از طریق فاکتور القایی هیپوکسی ($Hypoxia$ inducible factor 1α) $HIF1\alpha$ در فرآیند آنژیوژنز شرکت می کند و $EphrinA3$ Receptor Tyrosine Kinases یکی از اثرگذاران اصلی این فرآیند است. $HIF-1\alpha$ باعث بیان افزایشی $Mir-210$ در سلول های اندوتلیال می شود و $Mir-210$ در پاسخ به هیپوکسی با تنظیم کاهشی گیرنده تیروزین کینازی $EphrinA3$ آنژیوژنز سلول های اندوتلیال را تعدیل می کند (12، 13). فاسنارو و همکاران در مطالعه ای با کشت سلول نشان دادند سطوح $Mir-210$ به شدت تحت تاثیر هیپوکسی می باشد. نتایج این مطالعه نشان داد $miR210$ چهار ساعت پس از هیپوکسی شروع به افزایش و پس از 48 ساعت 35 برابر گروه کنترل نورموکسی شده و تا 72 ساعت در شرایط تنظیم افزایشی $Mir-210$ باقی مانده است. سرکوب ایزوفرم $mRNAHIF-1\alpha$ به طور چشم گیری به کاهش القایی $Mir-210$ در شرایط هیپوکسی منجر می شود و بیان بیش از اندازه $Mir-210$ به شدت منجر به کاهش گیرنده پروتئینی $EphrinA3$ در سلول های اندوتلیال می شود (14). باگیس و همکاران تغییرات معنی داری را در سطوح پلاسمایی $Mir-210$ در اثر تمرینات استقامتی و امانده ساز در دانشجویان ورزشکار مشاهده نکردند (15). لذا

اول 7 تا 10 روز برای آشنا سازی با اجرای HIIT به تمرین پرداختند، 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 هوایی (جذب اکسیژن و ظرفیت اکسایشی عضلات اسکلتی، هر دو) در شدتی نزدیکی به VO_{2max} ، به مدت دو تا چهار دقیقه و زمان بازیافت فعال بین دو تا سه دقیقه پیشنهاد شده است (16)، که همین شرایط طراحی و اجرا شد. هر جلسه اجرای HIIT شامل 30 دقیقه فعالیت ورزشی بود که در جدول 1 ارائه شده است.

جدول 1. طرح پروتکل تمرین تناوبی خیلی شدید

مراحل تمرین مؤلفه تمرین	بدنه اصلی تمرین (3 تناوب)		گرم کردن	مراحل تمرین مؤلفه تمرین
	تناوب کم شدت	تناوب شدید		
زمان تمرین (دقیقه)	2 دقیقه	4 دقیقه	6 دقیقه	زمان تمرین (دقیقه)
شدت تمرین (VO_{2max})	50 تا 60 درصد	90 تا 100 درصد	50 تا 60 درصد	شدت تمرین (VO_{2max})

* شیب نوارگردان در همه مراحل تمرین صفر بود.

در کل، پروتکل ورزشی شامل هشت هفته تمرین تناوبی خیلی شدید بود. در انتهای دو هفته آشنایی، حداکثر اکسیژن مصرفی رت‌ها اندازه‌گیری شد و رت‌ها با توجه به پروتکل ورزشی و درصدی از 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 (17) و سرعت تمرینی جدیدی برای هفته تمرین بعد، در نظر گرفته شد. همه جلسات تمرین، عصر هنگام که بهترین زمان تمرین در ریتم فعالیت طبیعی رت‌ها می‌باشد، در زیر نور قرمز (به علت کمترین استرس زایی) انجام شد. شرایط زیستی حیوانات در گروه کنترل به جز انجام تمرینات روزانه در سایر اوقات، مشابه گروه تمرین بود و حتی جهت شبیه‌سازی بیشتر گروه کنترل در بازه زمانی تمرین، سه بار در هفته و هر بار به مدت 15 دقیقه روی دستگاه نوارگردان با سرعت دو متر بر دقیقه قرار

انتظار می‌رود تمرینات تناوبی خیلی شدید (High Intensity Interval Training-HIIT) که همراه با شدت بالایی انجام می‌شوند، باعث ایجاد شرایط هیپوکسی شوند که به افزایش بیان ژن Mir-210 و در نهایت به افزایش فرآیند آنژیوژنز منجر شود. با توجه به اثر مثبت فعالیت بدنی به نظر می‌آید که پژوهش‌ها بر عملکردهای سلولی و مولکولی ناشی از ورزش بتواند در آینده به استفاده از فعالیت بدنی به عنوان یک درمان هدفمند و بدون عوارض منجر شود. با توجه به اندک بودن مطالعات انجام شده در زمینه تأثیر فعالیت بدنی بر miRNAs مؤثر در فرآیند آنژیوژنز و با عنایت به جست و جوی انجام شده در مطالعه حاضر، تاکنون هیچ‌گونه پژوهشی تأثیر فعالیت بدنی بر میزان تغییرات در بیان ژن‌های Mir-210 و EphrinA3 را در عضله نعلی بررسی نکرده است، لذا این مطالعه با هدف شناسایی ساز و کارهای درگیر در سازگاری‌های اثر گذار تمرین تناوبی خیلی شدید بر فرآیند آنژیوژنز در عضله اسکلتی انجام شده است.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربی - آزمایشگاهی بود. تعداد 12 رت نر نژاد ویستار در سن هشت هفتهگی با میانگین وزنی 180 ± 20 گرم از انستیتو پاستور ایران خریداری و به آزمایشگاه حیوانات دانشگاه تهران منتقل و در شرایط دمایی 22 ± 3 درجه سانتی‌گراد تحت چرخه خواب و بیداری (12 ساعت روشنایی و 12 ساعت تاریکی) و رطوبت 40 تا 60 درصد نگهداری شدند. بدون هیچ‌گونه محدودیتی در غذا و آب، در قفس‌های پلی اتیلن نگهداری شدند. در مراحل مختلف ضمن رعایت مسایل اخلاقی سعی شد از هر گونه آزار جسمی و روش غیر ضروری اجتناب گردد (مجاز کد اخلاقی به شماره K/171/91). در ابتدا حیوانات، تصادفی به دو گروه کنترل ($n=6$) و گروه HIIT ($n=6$) تقسیم شدند. رت‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه حیوانات به مدت سه روز برای سازگاری با محیط و رسیدن به حد وزنی مطلوب (200 گرم) مراقبت شدند. گروه تمرینی در دو هفته

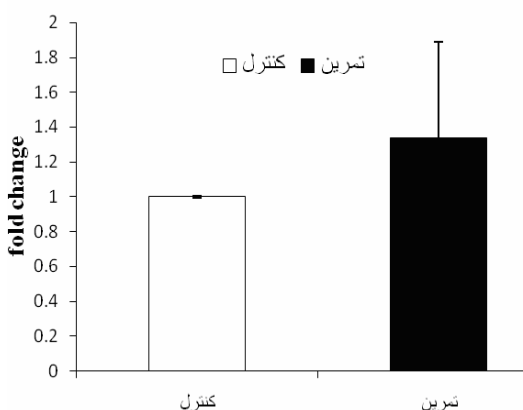
گرفتند (18). به علت نداشتن دسترسی به ابزار مستقیم (دستگاه تجزیه و تحلیل گازهای تنفسی)، توان هوازی رت‌ها غیر مستقیم با استفاده از پژوهش‌های اخیر (هویدال و همکاران) (19) انجام شد. ابتدا 10 دقیقه گرم کردن با شدت 40 تا 50 درصد VO_{2max} انجام شد. بعد از گرم شدن، آزمون با دویدن رت‌ها با سرعت 15 متر در دقیقه به مدت دو دقیقه شروع شد، سپس نوارگردان هر دو دقیقه یک بار به میزان 0/03 متر بر ثانیه (1/8 تا 2 متر بر دقیقه) افزایش یافت تا حیوانات، دیگر قادر به دویدن نبودند. ملاک برای رسیدن به VO_2 ، عدم افزایش VO_{2max} با وجود افزایش سرعت است. سرعت VO_{2max} سرعتی بود که در آن VO_2 به فلات برسد. رسیدن به فلات با غلظت لاکتات بالاتر از 6 میلی مول در لیتر و نسبت تنفسی VCO_2/VO_2 برابر 1/05 در نظر گرفته شد. پژوهش‌ها نشان می‌دهند، ارتباط زیادی بین سرعت نوارگردان و VO_{2max} رت‌ها وجود دارد ($p < 0/005$, $r = 0/94 - 0/98$). از این رو با توجه به سرعت دویدن، میزان VO_{2max} رت‌ها به دست آمد.

24 ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، رت‌ها پس از ناشتایی شبانه نمونه‌برداری شدند و برای جمع‌آوری نمونه‌ها ابتدا حیوان با ترکیبی از داروی زایلازین (10 میلی‌گرم/کیلوگرم) و کتامین (75 میلی‌گرم/کیلوگرم) به شکل تزریق درون صفاقی بی‌هوش شد. سپس، قفسه سینه حیوان شکافته و برای اطمینان از کمترین آزار حیوان، نمونه‌های خون، مستقیم از قلب حیوان گرفته شد، سپس عضله نعلی از اندام تحتانی حیوان برداشته شد و در سرم فیزیولوژیک شستشو داده و در ترازوی دیجیتال با دقت 0/0001 گرم وزن کشی شد، سپس بلافاصله با استفاده از ازت مایع منجمد و برای سنجش‌های بعدی به فریزر با دمای 80- منتقل شدند.

استخراج RNA با استفاده از 50 میلی‌گرم عضله نعلی انجام گرفت. بافت با استفاده از یک میلی‌مول محلول تریزول لیز شده و با دستگاه همگن‌کننده بافت هموژن شد. در مرحله بعد، جداسازی از فاز آبی به کمک 0/25 میلی‌لیتر

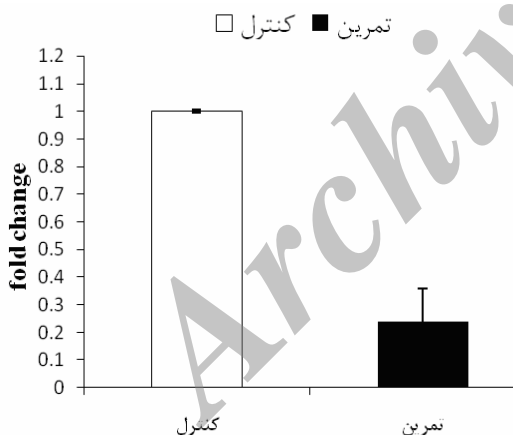
کلروفرم صورت گرفت. RNA استخراج شده با 1 میلی‌لیتر اتانول سرد 70 درصد شستشو و خشک شد و سپس به آن آب استریل (1/5 میکرولیتر بر میلی‌گرم بافت) اضافه شد. برای سنجش کمی RNA استخراج شده از دستگاه بايوفومتر با طول موج 260 نانومتر استفاده شد. میانگین OD خوانده شده 1/77 بود که نشان‌گر کارایی مناسب RNA استخراج شده بود. استخراج cDNA برای هر نمونه سه مرحله ساخت cDNA انجام گرفت. بدین ترتیب که در ابتدا 8 میکروگرم از RNA استخراج شده را با 0/8 میکرو لیتر از آنزیم DNase I و 2 میکرو لیتر از بافر 10x آن و آب DEPC خورده مخلوط کرده و حجم نمونه به 20 میکرو لیتر رسانده شد. محصول ایجاد شده را بدون ورتکس کردن و به آرامی مخلوط کرده و سپس با برنامه زیر در دستگاه ترموسایکر انکوبه شد: پنج دقیقه در دمای 55 درجه سانتی‌گراد، 15 دقیقه در دمای 25 درجه سانتی‌گراد، 30 دقیقه در دمای 42 درجه سانتی‌گراد (مرحله ساخت cDNA به وسیله آنزیم ترانس کریپتاز معکوس RT)، پنج دقیقه در دمای 95 درجه سانتی‌گراد (جهت غیر فعال کردن آنزیم RT). پس از اتمام مراحل ترموسایکلر 280 میکرولیتر آب تزریقی اضافه شد و برای استفاده در QPCR در دمای 20- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. برای هر نمونه cDNA نیز، یک نمونه کنترل مثبت با پرایمر b2m به عنوان کنترل داخلی، برای آزمون حضور cDNA تهیه شد. نمونه‌ها به آرامی و بدون ورتکس مخلوط شده و در دستگاه Real time PCR (Corbett) با برنامه زیر PCR شد:

10 دقیقه در دمای 95 درجه سانتی‌گراد (واسرشته شدن اولیه)، 10 ثانیه در دمای 95 درجه سانتی‌گراد (واسرشته شدن) 15 ثانیه در دمای 60 درجه سانتی‌گراد (اتصال پرایمرها)، 20 ثانیه در دمای 72 درجه سانتی‌گراد (گسترش)، واکنش از مرحله دوم به بعد، برای 40 سیکل تکرار شد. Cts مربوط به واکنش‌ها توسط نرم افزار دستگاه Real-time PCR استخراج و در نهایت Ct mean سه مرتبه ثبت شد. پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش در جدول 2 آورده شده‌اند. کمی‌سازی مقادیر بیان ژن هدف



نمودار 1. تغییرات بیان ژن mir-210 (برابر تغییر نسبت به گروه کنترل)

سطح بیان ژن EphrinA3، 24 ساعت پس از آخرین جلسه تمرین در عضله نعلی نسبت به گروه کنترل کاهش 76 درصد داشت و این افزایش از لحاظ آماری معنی دار بود ($t_{10} = -14/36$, $p = 0/00$). میزان بیان آن در نمودار 2 ارائه شده است.



نمودار 2. تغییرات بیان ژن EphrinA3 (برابر تغییر نسبت به گروه کنترل)

بحث

پژوهش حاضر، یکی از جدیدترین مطالعاتی است که نقش فعالیت بدنی را در تغییرات Mir-210 مورد بررسی قرار داده است. نتایج پژوهش نشان می‌دهد، هشت هفته اجرای HIIT، باعث افزایش بیان ژن Mir-210 در عضله نعلی رت‌های نر ویستار سالم شد، اما این افزایش معنی‌دار

مورد نظر از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ (2 به توان منفی $\Delta\Delta CT$) استفاده شد. اطلاعات مورد نیاز پس از جمع‌آوری، توسط نرم افزار آماری SPSS نسخه 19 و کلیه نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان و در سطح معنی‌داری $(p \leq 0/05)$ پردازش و سپس تحلیل شد. بعد از اطمینان از طبیعی بودن توزیع متغیرهای پژوهش، از آزمون آماری تی مستقل به منظور تعیین معنی‌دار بودن تفاوت بین میانگین داده‌ها استفاده شد.

جدول 2. پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش

پرایمر	میزبان	سکانس
rno-Mir-210	Rat	CUGUGCGUG- UGACAGCGGCUGA
EphrinA3	Rat	TCGCCTTCTTCCTCATGAC G

یافته‌ها

تغییرات وزن رت‌ها در جدول 3 گزارش شده است که نشان دهنده رشد طبیعی، در عین حال افزایش کمتر وزن رت‌ها در گروه تمرین نسبت به کنترل است.

جدول 3. میانگین و انحراف استاندارد وزن گروه‌ها

گروه	وزن اولیه (گرم)	وزن نهایی (گرم)
کنترل (n=6)	210/5 \pm 9/77	337/17 \pm 7/80
تمرین (n=6)	212 \pm 9/27	305/83 \pm 16/46

سطح بیان ژن Mir-210، 24 ساعت پس از آخرین جلسه تمرین در عضله نعلی نسبت به گروه کنترل افزایش 34 درصد داشت اما این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($t_{10} = 1/49$, $p = 0/16$). میزان بیان آن در نمودار 1 ارائه شده است.

کاهش می‌دهد(21). فعال سازی HIF-1 α همراه با اجرای HIIT اتفاق می‌افتد، زیرا این تمرینات با شدت بالایی اجرا می‌شوند که منجر به کاهش میزان اکسیژن رسانی به عضلات اسکلتی می‌شود و این محدودیت همانند یک بازخورد ناشی از تمرین باعث ایجاد سازگاری‌هایی در عروق خونی می‌شود که افزایش رت‌ها در پی هشت هفته اجرای HIIT مزید علت می‌باشد. در مطالعه‌ای، یام کوچی و همکاران نشان دادند، افزایش بیش از اندازه Mir-210 باعث مهاجرت سلول‌های اندوتلیال می‌شود که این عملکرد در مرحله پنجم فرآیند آنژیوژنز اتفاق می‌افتد و در شرایط هایپوکسی با مهار Mir-210 مشاهده کردند، تشکیل تیوب عروق سلول‌های اندوتلیال کاهش نشان می‌دهد(22). در مطالعه‌ای فاسنارو و همکاران نشان دادند سرکوب Mir-210 منجر به کاهش مهاجرت القا شده سلول‌های اندوتلیال در اثر VEGF می‌شود و در حالت هیپوکسی القا شده، افزایش بیان Mir-210 به افزایش مهاجرت سلول‌های اندوتلیال منجر شد(14)، که شاید این افزایش Mir-210 همانند یک عامل تسهیل کننده در عملکرد و افزایش بیان ژن VEGF باشد، که در پژوهش حاضر، افزایشی هرچند غیر معنی‌دار نسبت به گروه کنترل مشاهده شد و می‌توان احتمال داد که این افزایش 34 درصدی در Mir-210 باعث تسهیل سازوکار عمل VEGF شده است. در مطالعات، ژن‌ها و گیرنده‌های هدف متعددی برای Mir-210 شناسایی شده‌اند که یکی از این هدف‌ها EphrinA3 می‌باشد. یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد پس از هشت هفته اجرای HIIT میزان بیان ژن EphrinA3 کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشته است که در پژوهش فاسنارو و همکاران که در محیط کشت سلول انجام شده بود ناهمسو می‌باشد، زیرا در مطالعه آنها Mir-210 تنها باعث مهار گیرنده پروتئینی EphrinA3 شد و تأثیر بر ژن EphrinA3 نداشت، اما در واقع می‌توان، کاهش معنی‌دار این ژن نسبت به گروه کنترل را به سازگاری ایجاد شده حاصل از هشت هفته اجرای HIIT نسبت داد که این گیرنده جز خانواده گیرنده‌های تیروزین کینازی سلول‌های اندوتلیال می‌باشد،

نمود. مقادیر Mir-210 نسبت به گروه کنترل 34 درصد افزایش داشته است. باگیش و همکاران در پژوهشی تأثیر سازگاری تمرینات 90 روزه قایقرانی را بر پاسخ Mir-210 مورد مطالعه قرار دادند و نتایج آنان نشان داد اختلاف معنی‌داری بین دو پاسخ قبل و بعد از تمرینات 90 روزه وجود نداشت(15)، که نتایج این پژوهش هم‌سو با پژوهش حاضر است. در پژوهشی آنجابای و همکاران افزایش معنی‌داری را در سطوح بیان ژن Mir-210 در آزمودنی‌های مرد و زن با Vo2max پائین در پی فعالیت ورزشی گزارش نمودند، که این افزایش سطوح معنی‌دار Mir-210 در مقایسه با آزمودنی‌های با Vo2max بالا مشاهده شد و این نتایج با پژوهش حاضر هم‌سو نیست(15,20). یکی از تفاوت‌های پژوهش حاضر با مطالعه آنها اندازه‌گیری Mir-210 در سطوح پلاسمایی است که در تحقیق آنها انجام شد. این امکان وجود دارد Mir-210 توسط انواع مختلفی از بافت‌های بدن (قلب، عضلات صاف عروق، سلول‌های اندوتلیال و غیره) ترشح و وارد جریان خون شود، که معنی‌دار بودن نتایج آنها به علت همین موضوع باشد. به نظر می‌رسد عدم افزایش معنی‌داری Mir-210 در این پژوهش به علت مدت زمان پروتکل تمرینی باشد، چون این احتمال وجود دارد که Mir-210 در مدت زمان کمتر از هشت هفته به افزایش معنی‌دار خود نسبت به گروه کنترل برسد، زیرا احتمالاً میزان هیپوکسی ناشی از تمرین در ابتدا تمرینات هفتگی بیشتر هست و این عامل، باعث افزایش بیان HIF-1 α شده و در نهایت این افزایش به بیان Mir-210 منجر می‌شود. چنانچه بیان ژن Mir-210 در دوره‌های زمانی تمرینی متفاوتی مورد سنجش قرار گیرد، شناخت جامع‌تری از عملکرد Mir-210 به دست می‌آید. یکی از محدودیت‌های پژوهش حاضر عدم اندازه‌گیری ژن HIF-1 α است که احتمالاً افزایش این عامل در پی هشت هفته اجرای HIIT اتفاق افتاده است. به نظر می‌رسد فعال سازی HIF-1 α ، سازگاری‌هایی چون بیان ژنی اریتروپوئیتین، بیان ژنی VEGF، بیان ژنی آنزیم‌های گلیکولیتیک را آغاز می‌کند که اثرات منفی قرارگیری در معرض هایپوکسی را

افزایش رنگ‌زایی در سلول‌های اندوتلیال می‌شوند اما جهت روشن‌تر شدن موضوع لازم است مطالعات وسیع‌تری، در سطح مولکولی انجام شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این پژوهش مراتب سپاس و قدردانی خود را از همکاری آزمایشگاه سلولی مولکولی دانشکده علوم پایه دانشگاه تربیت مدرس، هم‌چنین معاونت آموزشی و پژوهشی دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه تهران ابراز می‌دارند.

منابع

1. Gustafsson T, Knutsson A, Puntchart A, Kaijser L, Nordqvist SA-C, Sundberg C, et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor in human skeletal muscle in response to short-term one-legged exercise training. *Pflügers Archiv*. 2002;444(6):752-9.
2. Siafakas N, Jordan M, Wagner H, Breen E, Benoit H, Wagner P. Diaphragmatic angiogenic growth factor mRNA responses to increased ventilation caused by hypoxia and hypercapnia. *European Respiratory Journal*. 2001;17(4):681-7.
3. Lloyd PG, Prior BM, Li H, Yang HT, Terjung RL. VEGF receptor antagonism blocks arteriogenesis, but only partially inhibits angiogenesis, in skeletal muscle of exercise-trained rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2005;288(2):H759-H68.
4. Van Royen N, Piek JJ, Buschmann I, Hofer I, Voskuil M, Schaper W. Stimulation of arteriogenesis; a new concept for the treatment of arterial occlusive disease. *Cardiovascular research*. 2001;49(3):543-53.
5. Prior BM, Yang H, Terjung RL. What makes vessels grow with exercise training? *Journal of Applied Physiology*. 2004;97(3):1119-28.
6. Gustafsson T, Rundqvist H, Norrbom J, Rullman E, Jansson E, Sundberg CJ. The influence of physical training on the angiotensin and VEGF-A systems in human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*. 2007;103(3):1012-20.

که کاهش بیان ژن EphrinA3 منجر به کاهش این گیرنده پروتئینی در سلول‌های اندوتلیال عضله اسکلتی نعلی می‌شود. به طور کلی شاید در اثر هیپوکسی، که همراه با اجرا HIIT اتفاق افتاده است Mir-210 که افزایشی 34 درصد نسبت به گروه کنترل داشته است، منجر به سرکوب بیان ژن EphrinA3 شده است که این سازگاری می‌تواند ناشی از اجرای HIIT باشد. به نظر می‌رسد افزایش VO_2max رت‌ها در پی هشت هفته اجرای HIIT نشان دهنده افزایش روند آنژیوژنز باشد و Mir-210 تاثیرات پروآنژیوژنیک خود را در هفته‌های اولیه تمرینات ورزشی به مقدار بیشتری می‌گذارد که روند افزایشی فرآیند آنژیوژنز سریع‌تر اتفاق بیفتد. احتمالاً اگر شرایط تمرینی رت‌ها در یک محیط هیپوکسی (در ارتفاع) اتفاق رخ دهد، میزان بیان ژن Mir-210 افزایش معنی‌داری دارد. اجرای HIIT که همراه با شدت بالایی انجام می‌شوند و در چند سال اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند از این منظر مهم هستند که میزان سازگاری‌های موجود در عضلات اسکلتی را در مدت زمان کوتاه‌تری ایجاد می‌کنند و این نوع تمرینات که باعث افزایش فرآیند آنژیوژنز می‌شوند، احتمالاً می‌توانند در مدت زمان کوتاه‌تری نسبت به تمرینات تداومی هوازی باعث ایجاد این سازگاری شوند و این سازگاری برای افراد چاق و دیابتی مفید است، زیرا این افراد نیازمند فرآیند آنژیوژنز سریع‌تری برای افزایش مصرف ذخایر چربی بدن هستند و از دیدگاهی دیگر می‌توان با شناخت کامل‌تر ساز و کار عمل Mir-210 در فرآیند آنژیوژنز و هم‌چنین سرکوب Mir-210 به طور مصنوعی، شاید بتوان درمان برخی بیماری‌ها از جمله سرطان گام‌های را برداشت.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از مطالعه حاضر، اثرات احتمالی تمرینات ورزشی HIIT را بر سطوح برخی عوامل تاثیر گذار بر فرآیند آنژیوژنز نشان می‌دهد که این تمرینات باعث سازگاری‌های سریع‌تری نسبت به تمرینات تداومی هوازی در بدن موجود زنده می‌شود. اگرچه تمرینات ورزشی باعث

7. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nature medicine*. 2003;9(6): 653-60.
8. Hudlicka O, Brown M, Egginton S. Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle. *Physiological reviews*. 1992;72(2):369-417.
9. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB Journal*. 1999;13(1):9-22.
10. Olsson A-K, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling? In control of vascular function. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2006;7(5):359-71.
11. Tallquist MD, Soriano P, Klinghoffer RA. Growth factor signaling pathways in vascular development. *Oncogene*. 1999;18(55):7917-32.
12. Ghosh G, Subramanian IV, Adhikari N, Zhang X, Joshi HP, Basi D, et al. Hypoxia-induced microRNA-424 expression in human endothelial cells regulates HIF- α isoforms and promotes angiogenesis. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(11):4141-54.
13. Mounier R, Pialoux V, Schmitt L, Richalet J-P, Robach P, Coudert J, et al. Effects of acute hypoxia tests on blood markers in high-level endurance athletes. *European journal of applied physiology*. 2009;106(5):713-20.
14. Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V, Melchionna R, Romani S, Pompilio G, et al. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *Journal of biological chemistry*. 2008;283(23):15878-83.
15. Baggish AL, Hale A, Weiner RB, Lewis GD, Systrom D, Wang F, et al. Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training. *The Journal of physiology*. 2011;589(16):3983-94.
16. Burniston JG. Adaptation of the rat cardiac proteome in response to intensity-controlled endurance exercise. *Proteomics*. 2009;9(1):106-15.
17. Maclaren D, Morton J. *Biochemistry for Sport and Exercise Metabolism: Translate* by Gaëini A. Tehran, Iran. Samt publication; 2012.
18. Wisløff U, Loennechen JP, Falck G, Beisvag V, Currie S, Smith G, et al. Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats. *Cardiovascular research*. 2001;50(3):495-508.
19. Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen Ø. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation*. 2007;14(6):753-60.
20. Bye A, Røsjø H, Aspenes ST, Condorelli G, Omland T, Wisløff U. Circulating microRNAs and aerobic fitness—the HUNT-Study. *PloS one*. 2013;8(2):e57496.
21. Mounier R, Pialoux V, Roels B, Thomas C, Millet G, Mercier J, et al. Effect of intermittent hypoxic training on HIF gene expression in human skeletal muscle and leukocytes. *European journal of applied physiology*. 2009;105(4):515-24.
22. Yamakuchi M. MicroRNAs in vascular biology. *International journal of vascular medicine*. 2012;2012.