مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره نوزدهم، شماره ۶، خرداد ۱۳۹۶، صفحه ۶۳-۵۷

اثر تمرین ورزشی تناوبی شدید بر بایومارکرهای بایوژنز میتوکندریایی عضلانی در رت‌های نر

فیروز شرفی دهرحم (MSc)[۱*]، رحمان سوری (PhD)[۲]، مهسا رستگار مقدم منصوری (PhD)[۳]، صادق عباسیان (PhD)[۳]

۱-گروه تربیت بدنی دانشگاه آزاد واحد اسلامی خرم آباد
۲-گروه فیزیولوژی ورزش دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه تهران
۳-مرکز تحقیقات سالمندی، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، تهران

دریافت: ۹۵/۱۰/۲۴، اصلاح: ۹۵/۱۲/۴، پذیرش: ۹۶/۱/۲۰

خلاصه

سابقه و هدف: تمرین ورزشی، تعداد و اندازه میتوکندری‌های عضله را افزایش می‌دهد. با این وجود، مطالعات معدودی بر پاسخ میتوکندریایی به تمرین ورزشی در عضلات انجام شده است. لذا، هدف از تحقیق حاضر، تعیین اثر تمرین ورزشی تناوبی شدید بر بایومارکرهای بایوژنز میتوکندریایی عضلانی در رت‌های نر می باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه نیمه تجربی بر روی ۱۸ سر رت نژاد ویستار در دو گروه تمرین تناوبی شدید (High Intensity Interval Training) و کنترل انجام شد. گروه HIIT ۱۵ وهله ۴ دقیقه‌ای را با ۹۰ – ۸۵ درصد VO_{2max} به مدت ۳ هفته متوالی اجرا کرد. سپس، نمونه گیری خونی و بافت‌برداری از عضلات باز کننده طویل انگشتان پا و نعلی انجام شد و هم‌فعالگر نوع ۱-آلفای گیرنده گامای فعال شده توسط تکثیرکننده پروکسیزومیِ و عامل نسخه بردار میتوکندریایی نوع ۱ با استفاده از کیت‌های تجاری و بیان ژن آنها با استفاده از روش Real-Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج بیانگر افزایش معنی‌دار سطوح سرمی PGC1α (۱۰/۶ تا ۶/۳، CI=۸/۵±۱/۰۲) و Tfam (۱۰/۳۳ تا ۵/۴۲، CI =۷/۹±۱/۱۶) در گروه HIIT در مقایسه با گروه کنترل بود. همچنین، مقادیر بیان ژنی PGC1α در عضلات تند انقباض (۱/۱۴±۰/۱۳) و کند انقباض (۱/۱±۰/۱۶) در گروه HIIT به طور معنی‌داری افزایش یافته بود (به ترتیب p=۰/۰۰۳ و p=۰/۰۰۰۱).

نتیجه‌گیری: بنظر می‌رسد تمرین تناوبی شدید قادر باشد تا مقادیر سرمی و عضلانی هر دو بایومارکر بایوژنز میتوکندریایی (PGC1α و Tfam) را در رت‌ها به طور معنی‌داری افزایش دهد. همچنین، این احتمال می‌رود که ماهیت HIIT عامل ایجاد افزایش بیشتر این بایومارکرها در عضلات تند انقباض به نسبت کند انقباض باشد.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، عامل A نسخه برداری میتوکندریایی، عضله اسکلتی.

مقدمه

شناخت سازوکارهای سلولی و مولکولی سازگاری با تمرینات ورزشی (به ویژه استقامتی) در دهه اخیر گسترش یافته است. بسیاری از مسیرهای پیام رسان و سازوکارهای نسخه بردار ژنی در عضله اسکلتی در سازگاری به تمرین ورزشی شناسایی شده‌اند که از جمله آنها می‌توان کلسی نورین، پروتئین کیناز‌های وابسته به کلسیم/کلسی نورین (CaMK)، پروتئین کیناز فعال شده توسط میتوژن p-38 (MAPK)، پروتدین کیناز فعال شده توسط AMP (AMPK) و PGC1α را نام برد(۱). به نظر می‌رسد موثرترین و قوی‌ترین سازوکار و فعال کننده بالادستی در اختیار PGC1α باشد(۱). یکی از این فاکتورهای نسخه بردار میتوکندریایی که در ارتباط با PGC1α عمل می‌کند، عامل A نسخه برداری میتوکندریایی یا Tfam است. اعتقاد بر این است که شروع صحیح نسخه برداری از پیشران های زنجیره سبک و سنگین منحصراً به Tfam RNA پلیمراز میتوکندریایی وابسته است. اما TFB1m و TFB2m دو ایزوفرم ویژه میتوکندریایی هستند که اخیراً شناسایی شده اند و نقش مهمی در شروع نسخه برداری دارند. همچنین، مطالعات نشان داده‌اند که بیان Tfam در عضله اسکلتی متعاقب تمرین استقامتی در انسان‌ها افزایش می‌یابد. لذا افزایش در بیان Tfam طی تمرینات ورزشی اساساً به بایوژنز میتوکندریایی در عضله اسکلتی نسبت داده می شود(۲). تمرین ورزشی، میتوکندری عضله را در نتیجه تمرین مقاومتی و بویژه عملکرد استقامتی افزایش می‌دهد(۳). مطالعات معدودی بر پاسخ میتوکندریایی به تمرین ورزشی در عضلات تمرکز کرده‌اند. نتایج مطالعه Krichner و همکاران بیانگر افزایش آنزیم‌های مرتبط میتوکندریایی در هر دو گروه تمرین اختیاری و تمرین روی تردمیل در مقایسه با گروه کنترل بود منتها تمرین روی تردمیل به نسبت چرخ گردان (اختیاری) افزایش بیشتری را در محتوای آنزیم‌های میتوکندریایی ایجاد کرد (۴). نتایج مطالعه Steiner و همکاران بیانگر آن بود که ۸ هفته تمرین روی تردمیل به مدت ۱ ساعت در روز، ۶ جلسه در هفته و با شدت ۲۵ متر/دقیقه با افزایش بیان PGC1α، SIRT1 و DNA میتوکندریایی همراه است(۳). در خصوص مطالعات انجام گرفته بر روی اثر تمرینات تناوبی شدید (HIIT) بر بایوژنز میتوکندریایی، تعداد

▣ این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۱۳۹۵-۱۴-۱۱-AU-KH دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم آباد می باشد

*مسئول مقاله: فیروز شرفی دهرحم
آدرس: خرم آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، گروه تربیت بدنی. تلفن: ۰۶۶-۳۳۱۲۰۰۲۷
E-mail: firuz.sharafi@yahoo.com

اندکی از مطالعات به بررسی این اثر پرداخته‌اند. HIIT را می‌توان به عنوان دوره‌های تمرینی کوتاه مدت تا میان مدت (۳۰ ثانیه الی ۵ دقیقه) که با شدت بالا انجام می‌گیرد، تعریف کرد. اصل اساسی HIIT ایجاد فشار پیوسته بر مؤلفه‌های فیزیولوژیکی به منظور ایجاد سازگاری است. در یک فرا تحلیل نشان داده شد که ۱۲-۴ هفته HIIT با دستاوردهای تمرینی بیشتری نسبت به سایر فرم‌های تمرینی همراه است(۵). همچنین، محققین نشان داده‌اند که تنها شش جلسه HIIT در ۲ هفته می‌تواند ظرفیت اکسایشی عضله و عملکرد استقامتی را بهبود بخشیده و کنترل متابولیکی را تغییر دهد(۶). در همین راستا، چندین مطالعه نشان دادند که فعالیت ورزشی می‌تواند نقش مهمی را در شتاب بخشیدن به نسبت بایوژنز میتوکندریایی در عضله اسکلتی دارا باشد(۷-۹).

در تحقیق Wright و همکاران مشخص شد که بیان پروتئین‌های نشان دهنده بایوژنز زودتر از افزایش PGC1α، افزایش می‌یابند(۹). Hoshino و همکاران در بررسی اثر HIIT بر تغییرات آنزیم‌های میتوکندریایی در عضلات قرمز و سفید، ۱۰ وهله ۱ دقیقه‌ای همراه با ۲ دقیقه استراحت را به مدت ۴ هفته و ۵ روز در هفته با شدت ۵۵-۳۰ متر/دقیقه اجرا کردند. نتایج آنها بیانگر افزایش بیشتر PGC1α پس از تمرینات و بویژه در عضله قرمز (۲۲ درصد) به نسبت عضله سفید (۱۶ درصد) بود(۱۰). همانگونه که بیان شد، تنها شواهد اندکی در خصوص اثر فعالیت ورزشی در ایجاد بایوژنز میتوکندریایی در عضلات وجود دارد. همچنین، طبق جستجوهای انجام گرفته در پایگاه‌های اطلاعاتی علمی، (احتمالا) تاکنون مطالعه‌ای اثر تمرین ورزشی تناوبی شدید (HIIT) را بر بایومارکرهای بایوژنز میتوکندریایی نظیر PGC1α و Tfam در عضله و به صورت ویژه در هر دو عضلات تند انقباض و کند انقباض رت‌ها مورد ارزیابی قرار نداده، لذا هدف تحقیق حاضر بررسی تمرین ورزشی تناوبی شدید بر بایومارکرهای بایوژنز میتوکندریایی در عضلات تند و کند انقباض رت‌های نر می باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق تجربی ۲۰ سر رت نر نژاد ویستار (۳ ماهه و وزن ۳۰۰-۲۷۰ گرم) انتخاب شدند. رت‌ها در آزمایشگاه حیوانات و در اتاقی به ابعاد ۵ ×۱۰ متر در شرایط کنترل شده به لحاظ دسترسی آزادانه به آب و غذای استاندارد، روشنایی (چرخه ۱۲ ساعتی)، دمایی (درجه حرارات ۲۲ تا ۲۶ درجه سانتی گراد) و رطوبتی (دامنه ۵۰ تا ۶۰ درصد) نگهداری شدند. سپس رت‌ها به طور تصادفی به دو گروه ده تایی HIIT و کنترل تقسیم شدند. دو رت از گروه HIIT به دلیل عدم تحمل تمرین ورزشی از روند کار خارج شدند (n= ۸). کلیه قوانین و نحوه رفتار با حیوانات (آشناسازی، تمرین، بیهوشی و کشتن حیوان) بر اساس AAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International) (۱۱) و تحت کد اخلاق در پژوهش (IR.ut.Rec.139500) رعایت گردید. برای کنترل بهتر شرایط نگهداری، وزن بدن رت‌ها، به صورت دوره‌ای در هر سه روز یکبار مورد ارزیابی قرار گرفتند. این تحقیق با کد اختصاصی مصوب کمیته اخلاق در پژوهش به تصویب رسید.

پروتکل تمرینی: رت‌ها به مدت ۵ روز با شرایط زندگی در حیوان‌خانه و نحوه دویدن روی نوارگردان آشنا شدند(۱۲). برای کاهش اضطراب در رت‌ها علاوه بر رعایت عوامل فوق، در طول دوره تحقیق، رت‌ها توسط یک فرد مورد ارزیابی قرار گرفته، تمرین داده شده و مورد رسیدگی قرار گرفتند(۱۳). حداکثر اکسیژن مصرفی (VO_{2max}) رت‌ها با استفاده از تردمیل شیبدار (چهار لاینه، شرکت سیستم‌های TSE، آلمان) با حداکثر شیب مثبت و منفیِ ۳۰+ تا ۱۵- درجه مورد ارزیابی قرار گرفت. VO_{2max} با استفاده از پروتکل رمپ بر طبق کار Hoydal و همکاران مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از گرم کردن با سرعتی معادل ۰/۲ متر/ثانیه، سرعت به طور فزاینده در هر ۲ دقیقه، به میزان ۰/۰۳ متر/ثانیه افزایش می‌یافت تا جایی که رت‌ها قادر به ادامه آزمون نبودند (عدم توانایی دویدن روی تردمیل و رفتن به فضای انتهایی تردمیل)(۱۳).

شیب توصیه شده ۲۵+ درجه بهترین کاربرد و نتیجه را برای اندازه گیری هر دوی VO_{2max} و جلسات تمرینی داراست(۱۳). HIIT به مدت ۶۰ دقیقه در جلسه و برای مدت چهار جلسه در هفته طی سه هفته متوالی انجام شد. پس از گرم کردن به میزان ۱۵-۱۰ دقیقه با ۶۰-۵۰ درصد VO_{2max}، گروه HIIT ۱۵ وهله ۴ دقیقه‌ای را با ۹۰ – ۸۵ درصد VO_{2max} با سه دقیقه ریکاوری با شدت ۷۰ VO_{2max} را بین وهله‌های HIIT اجرا کردند. همچنین، VO_{2max} در انتهای هر هفته (چهار بار در مجموع) ارزیابی شد. گروه کنترل تا انتهای هفته‌های تمرینی آزادانه در قفس بود و هیچ نوع تمرینی را انجام نمی‌داد. وزن آزمودنی‌ها طی وهله‌های تمرینی بدون تغییر معنی‌داری در قیاس با گروه کنترل افزایش یافته بود که حاکی از عدم اعمال فشار بیش از حد تمرینی بود.

آماده سازی بافت‌ها و نمونه‌گیری خونی: در این مطالعه، پس از اتمام هفته‌های تمرینی و ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، رت‌ها با استفاده از سووفلوران ۵-۴ درصد بیهوش شدند. سپس، مایع PBS (۱۵۰ میلی‌لیتر، pH = ۷/۴) به درون بطن چپ رت‌ها تزریق شد و بلافاصله توسط فورمالدآلدئید (۲۰۰ میلی‌لیتر، ۴ درصد) جایگزین شد. سپس، عضله نعلی (به عنوان عضله کند انقباض) و عضله بازکننده بلند انگشتان (یا EDL، به عنوان عضله تند انقباض) در حدود ۴۵ تا ۶۰ دقیقه پس از تکمیل تزریقات PBS و فورمالدآلدئید از رت‌ها نمونه برداری شدند.

سپس، اسلایزها در ترکیبی از ساکاروز (۳۰درصد) و PBS (۷۰ درصد) برای مدت ۱۲ ساعت نگهداری شدند. سپس با استفاده از N2 مایع به سرعت فریز و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از اتمام کامل مراحل فوق و دریافت کیت‌ها و مواد آزمایشگاهی مورد نظر، عضلات نعلی و بازکننده بلند انگشتان رت‌ها در اسلایزهای مورد نظر نمونه برداری شد و پس از شستشو مجدد با PBS، در میکروتیوب‌های حاوی مایع RNAlaterTM (RNA Stabilization reagent 50 mL)(۲۰ درصد) جهت انجام آزمایش‌های بیان ژنی غوطه‌ور گردید. همچنین، نمونه خونی از دم حیوان گرفته شد و با سرعت ۳۰۰۰ دور بر دقیقه و به مدت ۷ دقیقه و در درجه حرارت ۵ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ (مدل ۵۸۱۰، اپندورف، ساخت آلمان) و برای اندازه‌گیری متغیرهای سرمیِ PGC1α و Tfam (طی دو مرحله پیش از اجرای پروتکل HIIT و ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی) تا اتمام مرحله پس آزمون، در شرایط فریز ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند(۱۴).

PGC1α سرمی به روش الایزای ساندویچی و با استفاده از کیت تجاری شرکت cloud-clone (کد: SEH337Ra، کشور امریکا) اندازه گیری شد. دقت درونی(CV) و دقت بیرونی کیت PGC1α به ترتیب کمتر از ۱۰ و ۱۲ درصد و حساسیت اندازه‌گیری ۰/۱۲۷ نانوگرم/میلی‌لیتر بود. همچنین، Tfam سرمی به روش الایزای ساندویچی و با استفاده از کیت تجاری شرکت Cusabio (کد:

CSB-EL023413RA، کشور ژاپن) اندازه گیری شد. دقت درونی(CV) و دقت بیرونی کیت Tfam به ترتیب کمتر از ۸ و ۱۰ درصد و حساسیت اندازه‌گیری ۵/۸ پیکوگرم/میلی‌لیتر بود. همچنین، استخراج PGC1α RNA و Tfam تحت کدهای ژنی ۸۳۵۱۶ و ۸۳۴۷۴ با استفاده از کیت بالانویس (شرکت Qiagen، کشور آلمان) انجام گرفت(۱۵). سپس، استخراج RNA توسط روش Real time-PCR و بوسیله سیستم روتورژن ۶۰۰۰ انجام شد.

تجزیه و تحلیل منحنی ذوب به منظور تعیین اعتبار محصول PCR انجام پذیرفت. پروتکل چرخه حرارتی مورد استفاده دستگاه روتوژن در Real time-PCR شامل: ۴۰ چرخه حرارتی از ۶۰ تا ۹۵°C با زمان‌های ۱۰ ثانیه‌ای تا۲۰ دقیقه‌ای بود. پس از مرحله PCR، جهت مطالعه ویژگی پرایمرها، از دماهای ۵۰ تا ۹۹°C برای تهیه منحنی ذوب استفاده گردید. از بتا-اکتین (β-actin) جهت مقایسه و تعیین بیان ژن PGC1α و Tfam مطابق توالی پرایمرها استفاده گردید. در نهایت، جهت کمی‌سازی بیان mRNA، از روش ΔΔCT جهت مقایسه با ژن کنترلی β-actin استفاده شد. توالی پرایمرهای رفت برای PGC1α و Tfam به ترتیب TTCCACCAAGAGCAAGTAT و GAAGGGAATGGGAAAGGTAGA و توالی پرایمرهای برگشت برای PGC1α و Tfam به ترتیب CGCTGTCCCATGAGGTATT و AACAGGACATGGAAAGCAGAT بودند(۱۵).

همچنین، توالی پرایمرهای رفت و برگشت برای β-actin به ترتیب AACACAGCCTGGATGوTGTCACCAACTGGGACGATA GCTAC بود.

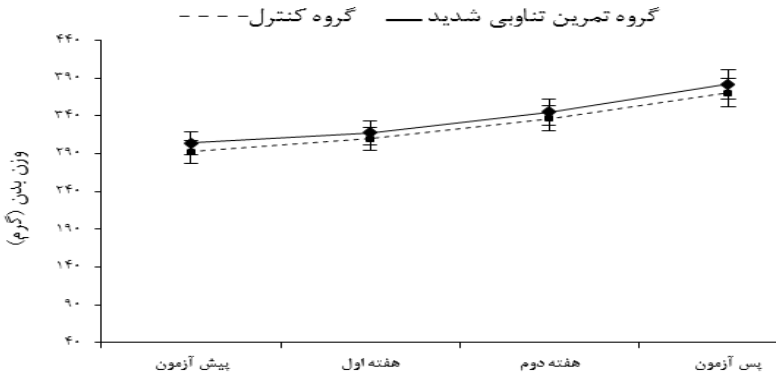
تجزیه و تحلیل آماری: پس از جمع‌آوری داده‌ها، با استفاده از نرم افزاری آماری Stata نسخه ۱۲ و تعیین برچسب‌هایی برای متغیرهای وابسته مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. به نحوی که از مقادیر گرایش مرکزی و پراکندگی (میانگین و انحراف استاندارد) و همچنین ترسیم گراف جهت برآورد آمار توصیفی تحقیق استفاده شد. سپس از آزمون تی مستقل و وابسته به ترتیب جهت برآورد تفاوت‌های بین گروهی و درون گروهی استفاده شد.

از آزمون اندازه‌های تکراری (و آزمون تعقیبی بونفرونی) نیز برای تعیین تفاوت‌های درون گروهی متغیرهای وزن و VO_{2max} (طی چهار بازه زمانی) استفاده شد و $p<۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.

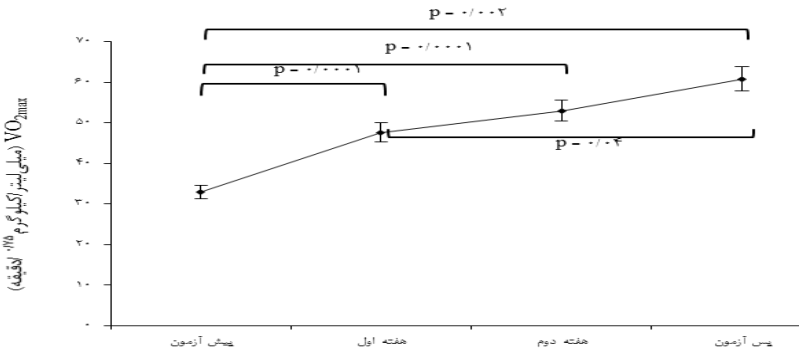
یافته‌ها

نتایج بیانگر عدم وجود تفاوت‌های درون گروهی و بین گروهی معنی‌دار در وزن رت‌های دو گروه HIIT و کنترل بود (نمودار ۱). همچنین، یافته‌ها بیانگر افزایش معنی‌دار مقادیر VO_{2max} گروه HIIT در هفته اول (۴۷/۶±۴/۵۸)، هفته دوم (۵۳±۸/۰۸) و مرحله پس آزمون (۶۰/۸±۷/۴۴) در مقایسه با مقادیر پیش آزمون (۶۰۲۳۳±۴/۸۶) بود (به ترتیب p=۰/۰۰۰۱، p=۰/۰۰۰۱، p=۰/۰۰۲). افزایش معنی‌دار مقادیر VO_{2max} گروه HIIT در مرحله پس آزمون (۶۰/۸±۷/۴۴) در مقایسه با مقادیر هفته اول (۳۳/۰۲±۴/۸۶) مشاهده شد (p=۰/۰۴؛ نمودار ۲). همچنین، یافته‌های تحقیق بیانگر آن بود که مقادیر سرمی PGC1α در رت‌های گروه HIIT در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری افزایش یافته بود (۱۰/۶ تا ۶/۳، ۱/۰۲± ۸/۵ =CI؛ جدول ۱).

به علاوه، یافته‌های تحقیق بیانگر آن بود که مقادیر سرمی Tfam در رت‌های گروه HIIT در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری افزایش یافته بود (۱۰/۳۳ تا ۵/۴۲، ۱/۱۶±۷/۹=CI؛ جدول ۱).



نمودار ۱. تغییرات وزن (گرم) رت‌های گروه HIIT و گروه کنترل به تفکیک مراحل مختلف



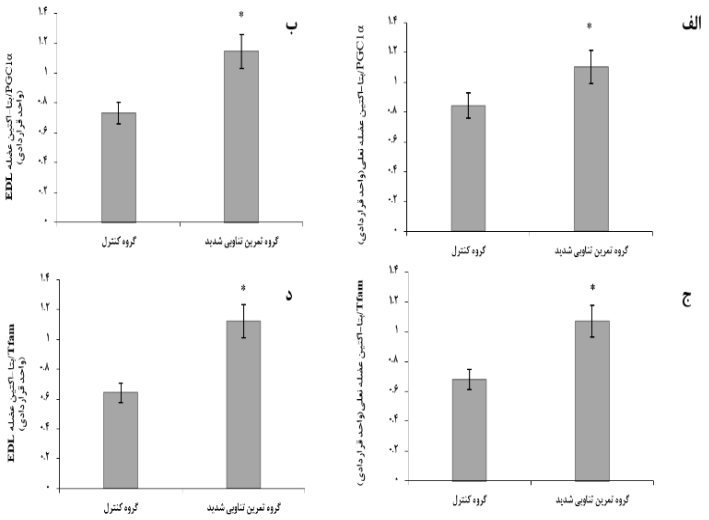
نمودار ۲. تغییرات درون گروهی VO2max (میلی‌لیتر/کیلوگرم ۰/۷۵ /دقیقه) رت‌های گروه HIIT به تفکیک مراحل مختلف

جدول ۱. مقادیر سرمی PGC1α و Tfam در رت‌های گروه HIIT (۸ سر رت) و گروه کنترل (۱۰ سر رت) پس از ۳ هفته مداخله HIIT

شاخص*	گروه	پیش آزمون (Mean±SD)	پس آزمون (Mean±SD)	مقادیر t درون گروهی	P-value	مقادیر t بین گروهی	P-value
PGC1α (نانوگرم/میلی‌لیتر)	HIIT	۲/۱۳±۰/۸۳	۱۰/۹۴±۳/۱۹	-۷/۴۳	۰/۰۰۰۱ *	۸/۳	۰/۰۰۰۱ *
	کنترل	۲/۱±۰/۷۳	۲/۴۵±۰/۵۹	-۱/۲۵	۰/۲۴۲		
Tfam (نانوگرم/میلی‌لیتر)	HIIT	۱۳/۶۱±۲/۳۴	۲۱/۴۷±۳/۲۲	-۴/۴۱	۰/۰۰۳ *	۶/۸	۰/۰۰۰۱ *
	کنترل	۱۳/۱۷±۱/۵۱	۱۳/۵۹±۱/۶	-۱/۳۲	۰/۲۱۸		

*- سطح معنی داری پذیرفته شده در p<۰/۰۵، M: میانگین و SD: میزان انحراف معیار را نشان می‌دهد

مقادیر بیان ژن PGC1α عضله نعلی در رت‌های گروه HIIT (۱/۱±۰/۱۶) در مقایسه با گروه کنترل (۰/۸۴±۰/۱۴) نیز به طور معنی‌داری افزایش یافته بود (p=۰/۰۰۳)(نمودار ۳ الف). به علاوه، مقادیر بیان ژن PGC1α عضله EDL در رت‌های گروه HIIT (۱/۱۴±۰/۱۳) در مقایسه با گروه کنترل (۰/۷۳±۰/۱۹) نیز به طور معنی داری افزایش یافته بود (p=۰/۰۰۰۱؛ نمودار۳ ب). همچنین، مقادیر بیان ژن Tfam عضله نعلی در رت‌های گروه HIIT (۱/۰۷±۰/۱۱) در مقایسه با گروه کنترل (۰/۶۸±۰/۲۲) نیز به طور معنی داری افزایش یافته بود (p=۰/۰۰۰۱)(نمودار ۳ج). به علاوه، مقادیر بیان ژن Tfam عضله EDL در رت‌های گروه HIIT (۱/۱۲±۰/۴) در مقایسه با گروه کنترل (۰/۶۴±۰/۲۷) نیز به طور معنی داری افزایش یافته بود (p=۰/۰۰۸؛ نمودار ۳ د).



نمودار ۳. الف) اثر مداخله HIIT بر بیان ژن PGC1α عضله نعلی در رت‌های گروه HIIT و گروه کنترل

مقادیر t بین‌گروهی برابر ۳/۵۵ و سطح معنی داری برابر ۰/۰۰۳ بود. ب) اثر مداخله HIIT بر بیان ژن PGC1α عضله EDL در رت‌های گروه HIIT و گروه کنترل. مقادیر t بین‌گروهی برابر ۵/۱۷ و سطح معنی داری برابر ۰/۰۰۰۱ بود. ج) اثر مداخله HIIT بر بیان ژن Tfam عضله نعلی در رت‌های گروه HIIT و گروه کنترل. مقادیر t بین‌گروهی برابر ۴/۴۱ و سطح معنی داری برابر ۰/۰۰۰۱ بود. د) اثر مداخله HIIT بر بیان ژن Tfam عضله EDL در رت‌های گروه HIIT و گروه کنترل. مقادیر t بین‌گروهی برابر ۳/۰۳۹ و سطح معنی داری برابر ۰/۰۰۸ بود. *بیانگر سطح معنی داری پذیرفته شده در p<۰/۰۵ است.

بحث و نتیجه گیری

نتایج تحقیق در خصوص مقادیر سرمی PGC1α و Tfam به ترتیب بیانگر افزایش ۵ برابری و ۵۷/۷۵ درصدی در گروه HIIT بود. به علاوه، تغییرات افزایشی در مقادیر بیان ژن PGC1α و Tfam عضلات نعلی و EDL مشاهده شد. بدین معنی که پس از هفته سوم HIIT مقادیر PGC1α در عضلات نعلی و EDL به ترتیب ۳۱/۰۵ و ۵۶/۶۵ درصد افزایش و در مقادیر Tfam عضلات نعلی و EDL به ترتیب ۵۷/۰۷ و ۷۴/۹۸ درصد افزایش در قیاس با گروه کنترل مشاهده شد. به طور کلی افزایش‌های مشاهده شده در هر دو بایومارکر PGC1α و Tfam در عضلات EDL بیشتر از عضلات نعلی رت‌های نر بود (عضله EDL> عضله نعلی). همچنین، افزایش معنی داری در مقادیر VO_{2MAX} پس از سه هفته HIIT مشاهده شد.

در خصوص اثرات فعالیت ورزشی بر بایوژنز میتوکندریایی در معدود نتایج موجود و در توافق با یافته‌های تحقیق حاضر، Derbre و همکاران اثر تمرین ورزشی با شدت ۷۵ درصد VO2max (Maximal oxygen consumption) را بر پاسخ PGC1α و بایوژنز میتوکندریایی رت‌های نر ارزیابی کردند. پروتکل تمرینی شامل ۳ هفته تمرین و ۵ روز در هفته و در هر جلسه ۲۵ (جلسات اول) - ۶۰ دقیقه (جلسات آخر) با سرعت ۲۶/۸ متر/دقیقه (جلسات اول) الی ۳۰ متر/دقیقه (جلسات آخر) تمرین روی تردمیل با شیب ۱۵ درصد بود. نتایج بیانگر افزایش بیان PGC1α، NRF-1 و سیتوکروم C پس از تمرین با شدت ۷۵ درصد VO2max بود(۱۶).

نتایج مطالعه Geng و همکاران بیانگر افزایش معنی دار PGC1α و آنزیم‌های میتوکندریایی (سیتوکروم اکسیداز نوع ۴ و سیتوکروم C) در سازگاری با تمرینات اختیاری در عضله اسکلتی بود(۱). Koltai و همکاران اثر ۶ هفته برنامه استقامتی روی تردمیل را بر ۱۲ رت نر مورد ارزیابی قرار دادند. تمرینات در دو هفته اول به صورت سه روز در هفته و از هفته دوم به بعد به صورت روزانه ۳۰ دقیقه تمرین با شدت ۶۰ درصد VO2max اولیه‌شان اجرا شد. در ادامه شدت به ۲۲ متر/دقیقه و شیب ۱۰ درصد افزایش یافت. نتایج آنها بیانگر افزایش عضلانی توده میتوکندریایی (سوکسینات دهیدروژناز، سیترات سنتاز، سیتوکروم C، DNA میتوکندریایی)، افزایش فعالیت PGC1α،SIRT1، AMPK و پروتئین‌های تجزیه کننده و ترکیب کننده میتوکندری (فیشن-۱ و میتوفیوژن-۱) بود (۱۷). همچنین در تحقیق Wright و همکاران مشخص شد که بیان پروتئین‌های نشان دهنده بایوژنز میتوکندریایی (NRF-1، پیشران سیتوکروم C، NRF-2 و پیشران سیتوکروم اکسیداز نوع ۴) زودتر از افزایش PGC1α، افزایش می‌یابند که احتمالا

فعال شدن PGC1α، مرحله ابتداییِ افزایش انطباق یافته/سازشی ناشی از فعالیت ورزشی را در میتوکندری عضله ایجاد می‌کند و افزایش بعدی در PGC1α پروتئین‌های درگیر در افزایش بایوژنز میتوکندریایی را بهبود می‌بخشد(۹).

به علاوه، Ramos-Filho و همکاران اثر HIIT را بر تغییرات تنفس و زنجیره میتوکندریایی در عضلات رت مورد ارزیابی قرار دادند. تمرین آنها ۶ هفته و ۳ جلسه در هفته و شامل وهله‌های ۲۰ ثانیه‌ای شنا با ۱۰ ثانیه تناوب استراحتی بود. بار اعمال شده ابتدایی ۹ درصد وزن بدن بود که هر هفته ۱ درصد وزن بدن به آن افزوده می‌شد (مجموعا ۱۴ درصد تا انتهای برنامه تمرینی). نتایج آنها بیانگر افزایش تنفس میتوکندریایی (آنزیم OXPHOS) در عضلات درشت نی قدامی و دو قلو و کاهش این تنفس در عضله نعلی بود.

همچنین، تولید H2O2 در عضلات درشت نی قدامی و دو قلو افزایش و در عضله نعلی کاهش یافته بود. به علاوه، نشت الکترونی در درشت نی قدامی(گلیسرول ۳ فسفات) و دو قلو (گلیسرول ۳ فسفات، سوکسینات) و نه در عضله نعلی پس از HIIT بالاتر بود(۱۸). نتیجه مطالعه Steiner و همکاران که اثر تمرین روی تردمیل را بر بایوژنز میتوکندریایی در رت‌های نر را ارزیابی کردند بیانگر آن بود که ۸ هفته تمرین روی تردمیل به مدت ۱ ساعت در روز، ۶ جلسه در هفته و با شدت ۲۵ متر/دقیقه با افزایش بیان PGC1α، SIRT1 و DNA میتوکندریایی همراه است(۳). همانگونه که مشاهده شد در مطالعات فوق با وجود مطابقت نتایج یافته‌ها در خصوص تغییرات افزایشی PGC1α از تمرینات تناوبی شدید استفاده نشده بود و هیچکدام از آنها به بررسی مقادیر Tfam در رت‌ها نپرداخته بودند. در خصوص اثر تمرینات HIIT بر بایوژنز میتوکندریایی، Hoshino و همکاران به بررسی اثر این تمرینات بر تغییرات آنزیم‌های میتوکندریایی در عضلات قرمز و سفید رت‌ها پرداختند. آنها ۱۰ وهله ۱ دقیقه‌ای همراه با ۲ دقیقه استراحت را به مدت ۴ هفته و ۵ روز در هفته با شدت ۳۰-۵۵ متر/دقیقه اجرا کردند. نتایج آنها بیانگر افزایش بیشتر PGC1α پس از تمرینات و بویژه در عضله قرمز (۲۲ درصد) به نسبت عضله سفید (۱۶ درصد) بود. به علاوه، آنزیم‌های میتوکندریایی (سیترات سنتاز، سیتوکروم اکسیداز نوع ۴ و بتا هیدروکسیل-کوآ دهیدروژناز) در هردوی عضلات قرمز و سفید پس از HIIT افزایش یافته بود. همچنین، نسبت‌های اکسیداسیون پالیمتات در میتوکندری پس از تمرینات و بویژه در عضله قرمز (۳۷ درصد در میتوکندری تحت سارکولمایی و ۱۹ درصد در میتوکندری بین میوفیبریلی) به نسبت عضله سفید (۳۶ درصد در میتوکندری تحت سارکولمایی و ۱۲ درصد در میتوکندری بین میوفیبریلی) بود(۱۰). با این حال، در این مطالعه نیز اثر HIIT بر مقادیر Tfam رت‌ها ارزیابی نشده بود. همچنین، در مطالعه Hoshino و همکاران از درصد شیب ۲۵ درجه برای تردمیل و شدت نسبی برای تمرین رت‌ها استفاده نکرده بودند. لذا در تطابق یافته‌های تحقیق حاضر با نتایج آنها و سایر مطالعات باید احتیاط کرد. از جمله محدودیت‌های تحقیق می‌توان به عدم ارزیابی مقادیر پروتئینی هر دو بایومارکر بایوژنز میتوکندریایی (PGC1α و Tfam) توسط روش وسترن بلات و عدم ارزیابی بیان ژنی از عضلات دو طرف بدن به دلیل محدودیت‌های مالی تحقیق اشاره کرد.

در نتیجه بنظر می‌رسد استفاده از پروتکل HIIT روی تردمیل (با شدت و مدت یاد شده) در رت‌های نر قادر باشد تا مقادیر سرمی و عضلانی هر دو بایومارکر بایوژنز میتوکندریایی (PGC1α و Tfam) را در رت‌ها به طور معنی داری افزایش دهد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که افزایش مقادیر PGC1α به ترتیب در سرم، عضلات EDL، و سپس در عضلات نعلی بیشتر است (سرم> EDL> نعلی). همچنین، افزایش مقادیر Tfam به ترتیب در عضلات EDL، سرم و سپس در عضلات نعلی بیشتر است (EDL> سرم> نعلی). به نظر می‌رسد ماهیت تمرینی HIIT (وهله‌های کوتاه مدت و با شدت بالا) عامل ایجاد افزایش بیشتر این بایومارکرها در عضلات تند انقباض به نسبت کند انقباض (نعلی) باشد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خرم آباد در این تحقیق، تشکر و قدردانی می‌گردد.

The Effect of High Intensity Interval Training on Muscular Biomarkers of Mitochondrial Biogenesis in Male Rats

F. Sharafi Dehrhm (MSc)[1*], R. Soori (PhD)[2], M. Rastegar Mogaddam Mansouri (PhD)[3], S. Abbasian (PhD)[3]

1.Department of Physical Education, Khorramabad Branch, Islamic Azad University, Khorramabad, I.R.Iran
2.Department of Physiology of Exercise, Tehran University of Physical Education and Sport Sciences, Tehran, I.R.Iran
3.Elderly Research Center, University of Social Welfare and Rehabilitation Sciences, Tehran, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 19(6); Jun 2017; PP: 57-63
Received: Jan 13th 2017, Revised: Feb 22th 2017, Accepted: Apr 9th 2017.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: PGC1α increases expression and coactivation of transcription factors for increases in mitochondria biogenesis-related genes. The purpose of the current study was to determine the effect of high intensity interval training on muscular biomarkers of mitochondrial biogenesis in male rats.

METHODS: Type of research design in the current study was semi-experimental. In the current study 18 Wistar rats were separated into HIIT and control groups. HIIT protocol was done 60 min in each session for four sessions in each week. HIIT group was carried out 15×4 min bouts of HIIT with 85 to 90% of VO_{2max} that sustained with three min recovery (between each bout of HIIT) with 70% of VO_{2max}. PGC1α and Tfam and their gene translations were evaluated by commercial kits and Real-Time PCR method, respectively.

FINDINGS: Outcomes indicated that serum levels of PGC1α (CI=8.5±1.02, 6.3 to 10.6) and Tfam (CI= 7.9±1.16, 5.42 to 10.33) were significantly increased. Also, PGC1α and Tfam gene expression in both fast- (1.14±0.13) and slow (1.1±0.16 muscles were significantly increased (p=0.003 and p=0.0001, respectively).

CONCLUSION: It appears that, present HIIT protocol has capability to significant increase in both muscular and serum levels of biomarkers of mitochondrial biogenesis (PGC1α and Tfam) in male rats. Likewise, there is a possibility that HIIT essence is an inducer factor for further expression of this biomarkers in slow-twitch than fast-twitch muscles.

KEY WORDS: *Gene Expression, Skeletal Muscles, Mitochondrial Transcription Factor A.*

Please cite this article as follows:
Sharafi Dehrhm F, Soori R, Rastegar Mogaddam Mansouri M, Abbasian S. The Effect of High Intensity Interval Training on Muscular Biomarkers of Mitochondrial Biogenesis in Male Rats. J Babol Univ Med Sci. 2017;19(6):57-63.

*** Corresponding author: F. Sharafi Dehrhm (MSc)**
Address: Department of Physical Education, khorramabad Branch, Islamic Azad University, khorramabad, I.R.Iran
Tel: +98 66 33120027
E-mail: firuz.sharafi@yahoo.com

References

1.Geng T, Li P, Okutsu M, Yin X, Kwek J, Zhang M, et al. PGC-1a plays a functional role in exercise-induced mitochondrial biogenesis and angiogenesis but not fiber-type transformation in mouse skeletal muscle. Am J Physiol Cell Physiol 2010;298(3):572-9.

2.Handschin C, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. End Rev. 2006;27(7):728-35.

3.Steiner JL, Murphy EA, McClellan JL, Carmichael MD, Davis JM. Exercise training increases mitochondrial biogenesis in the brain. J App Physiol. 2011;111(4):1066-71.

4.Kirchner L, Chen W-Q, Afjehi-Sadat L, Viidik A, Skalicky M, Harald H, et al. Hippocampal metabolic proteins are modulated in voluntary and treadmill exercise rats. Exp Neurol. 2008;212(1):145-51.

5.García-Hermoso A, Cerrillo-Urbina AJ, Herrera-Valenzuela T, Cristi-Montero C, Saavedra JM, Martínez-Vizcaíno V. Is high-intensity interval training more effective on improving cardiometabolic risk and aerobic capacity than other forms of exercise in overweight and obese youth? A meta-analysis. Obes Rev. 2016;17(6):531-40.

6.Alahmadi MA. High-intensity Interval Training and Obesity. J Novel Physioth. 2014;2014(4):211.

7.Bénédicte O, Mounia C, Dolores DP. Mitochondrial calcium signalling: Role in oxidative phosphorylation diseases: INTECH Open Access Publisher; 2012.

8.Hood DA, Chabi B, Menzies K, Oâ€™Leary M, Walkinshaw D. Role of physical exercise in preventing disease and improving the quality of life: Springer; 2007. p. 37-60.

9.Wright DC, Han D-H, Garcia-Roves PM, Geiger PC, Jones TE, Holloszy JO. Exercise-induced mitochondrial biogenesis begins before the Increase in muscle PGC-1α expression. J Bio Chem. 2007;282(1):194-9.

10.Hoshino D, Yoshida Y, Kitaoka Y, Hatta H, Bonen A. High-intensity interval training increases intrinsic rates of mitochondrial fatty acid oxidation in rat red and white skeletal muscle. Appl Physiol Nutr Metab. 2013;38(3):326-33.

11.Kregel KC, Allen DL, Booth FW, Fleshner MR, Henriksen EJ, Musch T, et al. Resource book for the design of animal exercise protocols. Am Physiol Soc Beth. 2006:1-80.

12.Van Sluyters R, Obernier J. Guidelines for the care and use of mammals in neuroscience and behavioral research. Contemp Top laborator Animal Sci. 2004;43(2):48.

13.Hoydal MA, Wisloff U, Kemi OJ, Ellingsen O. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil. 2007;14(6):753-60.

14.Khodadadi H, Rajabi H, Attarzadeh SR, Reza S, Abbasian S. The Effect of High Intensity Interval Training (HIIT) and Pilates on Levels of Irisin and Insulin Resistance in Overweight Women. Iran J Endocrinol Metabol. 2014;16(3):190-6. [In Persian]

15.Safdar A, Little JP, Stokl AJ, Hettinga BP, Akhtar M, Tarnopolsky MA. Exercise increases mitochondrial PGC-1alpha content and promotes nuclear-mitochondrial cross-talk to coordinate mitochondrial biogenesis. J Biol Chem. 2011;286(12):10605-17.

16.Derbre F, Gomez-Cabrera MC, Nascimento AL, Sanchis-Gomar F, Martinez-Bello VE, Tresguerres JA, et al. Age associated low mitochondrial biogenesis may be explained by lack of response of PGC-1a to exercise training. Age. 2012;34(3):669-79.

17.Koltai E, Hart N, Taylor AW, Goto S, Ngo JK, Davies KJ, et al. Age-associated declines in mitochondrial biogenesis and protein quality control factors are minimized by exercise training. Am J Physiol-Regulat, Int Comp Physiol. 2012;303(2):127-34.

18.Ramos-Filho D, Chicaybam G, de-Souza-Ferreira E, Martinez CG, Kurtenbach E, Casimiro-Lopes G, et al. High intensity interval training (HIIT) induces specific changes in respiration and electron leakage in the mitochondria of different rat skeletal muscles. PloS One. 2015;10(6):0131766.