(مقاله پژوهشی)

بررسی تغییرات بیان ژن‌های HSP60 و HSP70 متعاقب تمرین بی هوازی با شدت بالا پس از ایسکمی – ریپرفیوژن در عضله قلبی رت های صحرایی نر: اثر مکمل ملاتونین

مسعود جوکار[1*]، پژمان معتمدی[1]

۱-استادیار گروه فیزیولوژی ورزشی.

۱-گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه خوارزمی تهران، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول:
مسعود جوکار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه خوارزمی تهران، تهران، ایران.
تلفن:۰۰۹۸۹۳۶۰۶۰۳۷۱۵۷
Email: masoudjokar20@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: هدف از پژوهش حاضر بررسی تغییرات بیان ژن HSP60 و HSP70 متعاقب تمرین بی هوازی با شدت بالا در عضله قلبی رت های صحرایی نر پس از ایسکمی – ریپرفیوژن: اثر مکمل ملاتونین بود.

روش بررسی: بدین منظور ۲۴ رت نر صحرایی ویستار با وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم به ۴ گروه ۶ تایی شامل گروه کنترل، ملاتونین، تمرین بی‌هوازی، و تمرین بی‌هوازی + ملاتونین تقسیم شدند. پروتکل تمرین بی‌هوازی به مدت یک ماه اجرا شد؛ ضمنا گروه تمرین بی‌هوازی ملاتونین در مدت تمرین نیز تحت عمل گاواژ ملاتونین قرار داشتند. در پایان یک ماه رت‌ها بعد از دو روز استراحت تحت تزریق داروی ایزوپرنالین برای ایجاد ایسکمی ریپرفیوژن قرار گرفتند. بعد از دو روز رت‌ها تشریح و بطن چپ آنها خارج گردید. سپس میزان بیان ژن HSP60 و HSP70 رت‌ها با استخراج RNA و با تکنیک Real Time اندازه‌گیری شد.

یافته ها: نتایج تحقیق نشان داد که مصرف ملاتونین میزان بیان ژن آپوپتوزی HSP60 زا کاهش و HSP70 را پس از تمرین بی هوازی افزایش داد ($p\leq ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تمرینات بی‌هوازی شدید با مصرف ملاتونین موجب کاهش حجم آپوپتوز میوکارد پس از ایسکمی ریپرفیوژن ناشی از تزریق ایزوپرنالین می‌شود.

واژگان کلیدی: ملاتونین، HSP70، HSP60، تمرینات بی‌هوازی، ایسکمی – ریپرفیوژن.

دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۷/۲۰ دریافت مقالهٔ اصلاح‌شده: ۱۳۹۸/۹/۱۹ اعلام قبولی: ۱۳۹۸/۱۰/۱

مقدمه

توسعه بیماری شریان کرونری، سرآغازی است که منجر به ایسکمی میوکارد می‌شود. بیماری ایسکمی میوکارد به نبود اکسیژن ناشی از خونرسانی ناکافی اطلاق می‌گردد که این خود از عدم تعادل بین عرضه و تقاضای اکسیژن میوکارد ناشی می‌شود (۱).

در عین حال، یکی از اختلالات ایسکمی یا اختلال در خون شریان کرونری، شکل‌گیری بافت مرده در میوکارد است که انفارکتوس میوکارد یا سکته قلبی نام دارد (۱). بعد از یک انفارکتوس حاد، برقراری جریان خون مجدد یا ریپرفیوژن میوکاردی به موقع و موفقیت-آمیز، موثرترین استراتژی برای کاهش اندازه آسیب انفارکتوس و بهبود عوارض بالینی است. چرا که پروسه برقراری جریان خون مجدد(ریپرفیوژن) به میوکارد ایسکمی شده می‌تواند آسیب را افزایش دهد(۲). این پدیده که آسیب ریپرفیوژن میوکارد نامیده می‌شود؛ می-تواند به طور متناقضی اثرات سودمند ریپرفیوژن میوکارد را کاهش دهد، و منجر به آسیب کشنده میوکارد شود(۲). در طی آسیب ایسکمی ریپرفیوژن قلبی، تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد مشتق شده از اکسیژن، افزایش HSP60 در گردش خون، افزایش کلسیم درون سلولی، نشت H در سطوح میتوکندری و التهاب تحمیل می‌شود؛ که منجر به بازشدن منافذ نفوذپذیر میتوکندری می‌گردد(۳). این موضوع می‌تواند به کاهش ATP، اکسیداسیون غیرقابل برگشت پروتئین، چربی و DNA در کاردیومیوسیت‌ها منجر گردد؛ و فرآیند آپوپتوز را شروع کنند (۴). شواهد نشان می‌دهند که HSP70 و HSP27 مهم ترین پروتئین‌های درگیر در آپوپتوز هستند که بیشترین محافظت سلولی در مقابل آسیب ایسکمی ریپرفیوژن را عهده دارند(۵). زیرا HSP70 و HSP27 مسدودکننده‌های Apaf-1 و سیتوکروم c می باشند و متعاقباً مهارکننده کاسپاز ۹ در آپوپتوز می باشند و سپس آبشار کاسپازی پایین دست مهار می‌گردد. در مقابل HSP60 به تنهایی یا همراه با HSP10 به طور مستقیم آپوپتوز را با افزایش پروتئولیز کاسپاز ۳ تحریک می‌کند (۵).

در زمینه پیش آماده‌سازی برای محافظت از قلب، تا به امروز رویکردهای متعددی شناسایی و بررسی شده است. این راهبردها شامل فعالیت ورزشی، استرس گرمایی، پیش آماده‌سازی ایسکمی، استرس اکسیداتیو و مداخلات دارویی هستند. با این حال مطالعات متعددی نتیجه‌گیری کرده‌اند که تنها راهبرد عملی و قابل تحمل برای دستیابی به محافظت قلبی، فعالیت منظم ورزشی می‌باشد(۶). از طرف دیگر درمان دارویی بلند مدت شامل داروهای مسدود کننده بتا، ملاتونین، ممانعت از عمل آنزیم مبدل آنژیوتانسین، آسپرین، پلاویکس، وارفارین و کنترل چربی خون با استاتین مورد توجه قرار گرفته-اند(۷). مصرف این مواد بیشتر به علت نقش گشادکنندگی عروق توسط آنها می‌باشد؛ به طوری که وقوع سکته در ابتدای صبح به دلیل کاهش ترشح ملاتونین در بدن است (۸). در عین حال فعالیت ورزشی نسبت به حالت طبیعی تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را افزایش می‌دهد؛ اما در مقابل یک سیستم حمایتی–حفاظتی به نام سیستم آنتی اکسیدان را برای به حداقل رساندن اثرات مخرب گونه‌های فعال، بیشتر افزایش می‌دهد(۹). از طرفی یکی از دلایل فواید ورزشی جهت محافظت قلبی، تغییرات مارکرهای آپوپتوزی نظیر HSP60 و همچنین افزایش مارکرهای آنتی آپوپتوزی نظیر HSP70 در سلول‌های میوکاردی است. در این راستا، تأثیر دویدن با شدت‌های پایین‌تر از ۶۰٪ VO_{2MAX} یا بالاتر از ۷۵٪ VO_{2MAX} برای جلوگیری از انفارکتوس میوکارد مشخص نیست اما برخی تحقیقات نشان داده‌اند تمرین‌های منظم و طولانی مدت بی هوازی (تا ۸۵٪ VO_{2MAX}) کاهش معنی‌داری در نشانگرهای حوادث قلبی و عروقی دارند؛ به طوری که پس از ورزش بی‌هوازی میزان HSP70 در ورزشکاران افزایش دارد(۱۰)؛ لذا به نظر می‌رسد زمان و شدت فعالیت ورزشی نیز عامل مهمی در القاء محافظت قلبی

باشد. در مجموع با توجه به اینکه فعالیت ورزشی و ملاتونین با کاهش التهاب، استرس اکسیداتیو و آپوپتوزیس رابطه دارند؛ و سبب بهبود اثرات حفاظتی مهمی در قلب می‌شوند؛ و همچنین تمرینات ورزشی و ملاتونین قبل از ایسکمی می‌توانند حجم ضایعه ایجاد شده را کاهش دهند؛ و از طرفی پیش‌آماده‌سازی به عنوان یک مکانیسم مفید برای کاهش ضایعه و بهبود عملکرد قلب پس از ایسکمی- ریپرفیوژن است؛ فرض بر این است که ورزش بی‌هوازی با مصرف مکمل ملاتونین می‌توانند نقش کلیدی جهت کاهش ضایعه و بهبود عملکرد قلب پس از سکته در افراد ایفا کنند. به هر حال با توجه به اینکه تحقیقات اندکی اثر تمرینات بی‌هوازی با مصرف ملاتونین را به دنبال ایسکمی بررسی کرده‌اند؛ مطالعه حاضر سعی بر آن دارد که تغییرات بیان ژن HSP60 و HSP70 متعاقب تمرین بی هوازی با شدت بالا در عضله قلبی رت های صحرایی نر پس از ایسکمی – رپرفیوژن: اثر مکمل ملاتونین، را مورد مطالعه قرار دهد.

روش بررسی

پژوهش حاضر از نظر طراحی تجربی و از نظر هدف توسعه ای می‌باشد. در این پژوهش ۲۴ رت صحرایی نر ویستار با وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم و سن ۲ تا ۳ ماهه استفاده شد؛ سپس حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و با دسترسی آزاد به آب و غذا در دمای ۴±۲۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. کلیه مراحل تحقیق با مجوز کمیته اخلاق معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بهبهان با کد اخلاق IR.AJUMS.REC.1394.462 و بر اساس پروتکل اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام گردید. با توجه به اهداف پژوهش حیوانات به طور تصادفی به ۴ گروه زیر تقسیم بندی شدند: ۱-گروه کنترل(n=۶): نمونه‌ها بدون هیچ فعالیت ورزشی و مصرف مکمل ملاتونین در پایان پروتکل یک ماهه تحت ایسکمی ریپرفیوژن قرار گرفتند. ۲- گروه ملاتونین (n=۶): نمونه‌ها به مدت یک ماه فقط تحت مصرف مکمل ملاتونین قرار گرفتند و سپس بر روی آنها ایسکمی ریپرفیوژن انجام شد. ۳- گروه تمرین بی‌هوازی (n=۶): نمونه‌ها به مدت یک ماه ورزش بی‌هوازی انجام دادند و سپس تحت ایسکمی ریپرفیوژن قرار گرفتند. ۴- گروه تمرین بی‌هوازی و ملاتونین (n=۶): نمونه‌ها به مدت یک ماه تمرین بی‌هوازی همراه با مصرف ملاتونین انجام دادند و سپس تحت ایسکمی ریپرفیوژن قرار گرفتند.

در این طرح ابتدا رت‌ها به مدت یک هفته آشناسازی با تردمیل را داشتند؛ سپس پروتکل تمرین بی‌هوازی به مدت یک ماه اجرا شد؛ در عین حال مکمل ملاتونین به گروه‌های ملاتونین، گروه تمرین بی‌هوازی با ملاتونین نیز گاواژ می‌شد. در پایان یک ماه تمرین، رت‌ها به مدت ۴۸ ساعت استراحت کردند و در روز بعد تحت تزریق ایزوپرنالین با دوز ۱۵۰ میلی‌گرم برحسب کیلوگرم قرار گرفتند. و بعد از یک روز استراحت تزریق دوم ایزوپرنالین با دوز ۱۲۵ میلی‌گرم بر حسب کیلوگرم انجام شد. در نهایت رت‌ها یک روز استراحت کردند و سپس تحت جراحی برای برداشت بطن چپ قرار گرفتند (۱۰).

روش تعیین دز ایجاد سکته قلبی: هدف از مطالعه پایلوت تعیین میزان تزریق ایزوپرنالین برای ایجاد سکته در قلب رت‌ها بود. بدین منظور از مطالعه‌ایی که در این زمینه انجام شده بود استفاده گردید؛ در این پژوهش تزریق ایزوپرنالین با سه دوز ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن در دو روز متوالی با فاصله ۲۴ ساعت به صورت تزریق درون صفاقی استفاده شده بود؛ که در نتیجه محققین گزارش کردند که دوز ۱۵۰ و ۲۰۰ باعث فیبروز و نکروز قلب می‌شود اما به دلیل کاهش تلفات دوز ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن انتخاب شده است. بنابراین در تحقیق حاضر در روز اول رت‌ها تحت تزریق ایزوپرنالین با دوز ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن قرار گرفتند که یک رت در روز اول به دلیل تزریق ایزوپرنالین مُرد و به دلیل کاهش تلفات تزریق دوم

با دوز ۱۲۵ میلی گرم برحسب کیلوگرم انجام گرفت؛ سپس رت‌های گروه پایلوت بعد از تزریق دوم ایزوپرنالین به مدت ۲۴ ساعت استراحت کردند و سپس به منظور بررسی ایجاد ایسکمی ریپرفیوژن در قلب کشته شدند؛ و با روش رنگ آمیزی تری کروماسون میزان آپوپتوز و نکروز بطن چپ آنها اندازگیری شد. این روش هیستوتکنیک نشان دادکه تزریق ایزوپرنالین با دوز ۱۵۰ و ۱۲۵ میلی گرم برحسب کیلوگرم در روز اول و دوم باعث آپوپتوز و نکروز در بطن چپ رت‌ها می‌شود؛ بدین منظور این دوز به عنوان دوز پایه برای تحقیق حاضر در نظر گرفته شد.

گاواژ ملاتونین

پودر ملاتونین محصول شرکت سیگما آمریکا با توجه به وزن رت‌ها به میزان ۱۰ میلی‌گرم برحسب کیلوگرم با ترازوی دیجیتال وزن شد؛ و سپس با اتانول در میکروتیوب حل شد؛ و سپس با محلول سالین رقیق گردید و با سرنگ و نیدل گاواژ تزریق ملاتونین انجام - گرفت. گاواژ ملاتونین هر روز به مدت ۳۰ روز به گروه-های ملاتونین تحقیق به میزان ۱۰ میلی‌گرم بر حسب کیلوگرم در بعد از ظهرها با توجه به چرخه خواب و بیداری رت‌ها و جمع جبری ساعت گاواژ مطالعات پیشین خورانده شد(۱۱). بعد از پایان یک ماه، رت‌های گروه تجربی تحقیق به مدت ۴۸ ساعت استراحت کردند و تحت اولین تزریق ایزوپرنالین با دوز ۱۵۰ میلی گرم بر حسب کیلوگرم قرار گرفتند. در روز بعد به فاصله ۲۴ ساعت تزریق دوم با دوز ۱۲۵ میلی‌گرم بر حسب کیلوگرم انجام شد. سپس ۲۴ ساعت بعد، عمل خارج کردن بطن چپ رت‌ها با عمل جراحی انجام شد.

روش جراحی رت‌ها

به منظور عمل جراحی، رت‌ها به طور دقیق وزن شدند. سپس با کلروفرم بی‌هوش گردیدند. برای تشخیص بی‌هوشی با پنس قسمت ابتدایی دم فشرده شد و در صورت عدم وجود رفلکس و اطمینان از بی‌هوشی کامل، پوست و عضلات سینه کنار زده شد تا عضله قلب مشخص شود. سپس بطن چپ قلب از بقیه قلب جدا گردید و سپس با محلول سرم فیزیولوژی شستشو داده - شد و سپس در میکروتیوب قرار گرفت و در کپسول ازت مایع جهت عمل انجماد قرار داده شد.

روش استخراج RNA

به منظور مطالعه تغییرات بیان ژن پروتئین HSP60 و HSP70، از روش Real-Time PCR استفاده شد. بدین منظور نمونه‌های بطن چپ که در میکروتیوب در درون کپسول ازت مایع بودند؛ برای هموژنیزه کردن از کپسول بیرون آورده شدند؛ سپس بوسیله ازت مایع و هاون سنگی در ظرفی به صورت ذرات بسیار ریز تبدیل شدند؛ و سپس با محلول ترایزول در میکروتیوب ریخته شدند. به طوری که به ازای هر ۳۰ تا ۶۰ میلی‌گرم بافت، یک میلی لیتر محلول ترایزول به میکروتیوب حاوی بافت اضافه شد. سپس به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس انجام شد و در ادامه با سمپلر عمل پیپتاژ انجام گردید؛ در عین حال کلیه این مراحل بر روی رک‌های یخ زده انجام گرفت. سپس این مراحل ادامه یافت تا اینکه محلول بوجود آمده بتواند از سرنگ ۵ سی‌سی عبور کند؛ و نمونه‌های حل شده به مدت چند روز در فریز منفی ۸۰ نگهداری شدند. در ادامه نمونه‌ها از فریز خارج شدند و به اندازه ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به محلول مایع اضافه گردید؛ و با استفاده از تکان‌های دست محلول‌های موجود در میکروتیوب ترکیب شدند. سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. در ادامه محلول رویی پس از سانتریفیوژ برداشته شد و به همان اندازه ایزوپروپانول به آن اضافه گردید. سپس نمونه‌ها بعد از ماندن در فریزر منفی ۸۰ به مدت یک شب نگهداری و در ادامه به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سپس محلول رویی دور ریخته شد و رسوب ایجاد شده در ته میکروتیوب بوسیله الکل ۷۵ ٪ (تهیه شده با آب دپس) به مقدار یک میلی لیتر به مدت ۵ دقیقه با دور ۷۵۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. در ادامه این مرحله برای بار دوم تکرار گردید و سپس الکل رویی دور ریخته شد و میکروتیوب در زیر هود در دمای محیط قرار داده شد تا الکل مانده در میکروتیوب از رسوب جدا گردد. در نهایت ۳۳ میکرولیتر آب تثبیت

کننده RNA به رسوب اضافه شد و به مدت ۵ تا ۷ دقیقه در انکوباتور با دمای ۵۵-۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵-۱۰ دقیقه قرار داده شد تا RNA در آب حل شود. سپس محلول ایجاد شده به میکروتیوب‌های۵ میکرولیتری تقسیم و در نهایت در فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان سنتز cDNA نگهداری شد. به منظور تعیین کیفیت RNA استخراج شده ژل الکتروفورز تهیه شد. بدین منظور نیم گرم آگارز با ۵۰ میلی لیتر TEA یک درصد، داخل ارلن ترکیب شد و با حرارت حل شدند. بعد به ازای هر ۵۰ میلی لیتر از این ترکیب ۵ لاندا رنگ DNA Green viewer در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد ریخته شد. سپس با تکان‌های ارلن، رنگ و محلول ترکیب شدند و در ادامه این ترکیب در داخل کاست شانه داری ریخته شد و حدود نیم ساعت به همین حالت رها شد تا اینکه ژل آماده لود کردن نمونه‌ها گردید. در ادامه ژل مورد نظر در تانک الکتروفورز که با بافر یک درصد TEA (تریس، استیک اسید و EDTA) پر شده بود گذاشته شد؛ سپس RNA با لودینگ دای به نسبت ۵ به ۵ مخلوط گردید و در داخل چاهک‌ها ریخته شد. سپس دستگاه با ولتاژ ۹۰ و آمپر ۱۰۰ راه اندازی شد. در نهایت بعد از گذشت حدود ۱/۳۰ تا ۲ ساعت ژل در داخل دستگاه ژل داک بررسی گردید.

به منظور تهیه cDNA حدود ۳ لاندا از RNA استخراج شده بوسیله دستگاه نانودراپ تعیین غلظت شد؛ تا میزان غلظت RNA و آلودگی آنها با DNA با توجه به OD (نسبت طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰) مشخص شوند. در صورتی که OD نمونه‌ها از ۱/۸-۲/۲ کمتر بودند نشان از آلودگی DNA بود. مقدار غلظت RNA و OD تمام نمونه‌ها در جدول ۱ ارائه شده است.

روش سنتز cDNA

برای سنتز cDNA پس از اینکه مقدار ۳ میکرولیتر از RNA استخراج شده بوسیله دستگاه نانودراپ تعیین غلظت شد؛ در صورتی که OD (نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰) RNA استخراج شده کمتر از ۲/۲-۱/۸ گزارش می‌شد که آلودگی DNA را نشان می‌داد یک مرحله DNAase I انجام می‌شد. بدین منظور RNA موجود نمونه‌ها به نسبت همسان همراه با مواد جدول ۲ به یک میکروتیوب ریخته شدند. قابل ذکر است که بیان گردد حتماً آنزیم DNase I باید در مرحله آخر ریخته شود.

در ادامه، محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس مقدار یک ماکرولیتر EDTA با غلظت ۵۰ میلی مولار به آن اضافه گردید؛ و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. در ادامه سنتز cDNA با استفاده از کیت شرکت ویوانتیس انجام شد؛ به طوری که ۸ میکروگرم از محلول RNA، به مقادیر ۱ ماکرولیتر پرایمر Oligo (dT) 18 یا رندوم هگزامر و ۱ ماکرولیتر dNTP mixاضافه گردید و با استفاده از آب فاقد نوکلئاز به حجم ۱۰ ماکرولیتر رسید. محلول حاصل به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد انکوبه گردید و سپس برای آماده‌سازی مرحله بعد به مدت ۲ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. در ادامه میزان ۱۰ ماکرولیتر از ترکیب محلول cDNA synthesis mix (جدول۳) به آن اضافه شد؛ سپس در صورت استفاده از پرایمر رندوم هگزامر یک مرحله انکوباسیون با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه اعمال گردید در غیر این صورت از این مرحله چشم پوشی شد و سپس محلول حاصل به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد و سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس محلول cDNA حاصل به مقدار ۲۰ میکرولیتر به فریزر منفی ۸۰ یا ۲۰ درجه سانتی گراد منتقل شد.

طراحی پرایمرها

به منظور پیدا کردن توالی پرایمرها ابتدا مقالات در این زمینه پیدا شدند و سپس توالی ژن HSP60، HSP70 و همچنین house keeping بررسی گردیدند (۱۲،۱۳،۱۴)؛ سپس از طریق سایت ncbi تأیید شدند

(جدول ۴). در نهایت دمای مطلوب پرایمرها از سایت محاسبه الیگونوکلئوتید کسب شد.

روش آماده سازی Real-time

به منظور آماده سازی مواد ریل تایم ۲۰ لاندا cDNA موجود با آب دپس به نسبت ۱ به ۵ رقیق شد؛ سپس ۲ لاندا cDNA از هر گروه تحقیق به چاهک‌های دستگاه ریل تایم ریخته شد؛ در ادامه ۱۸ لاندا از محلول مستر میکس، آب و پرایمر (یک لاندا از پرایمر فوروارد و ریورز، ۱۳ لاندا آب و ۴ لاندا مستر میکس) به آن اضافه گردید (جدول ۵). در نهایت حجم نهایی چاهک‌ها ۲۰ لاندا شد زیرا کمتر از این مقدار باعث افزایش واریانس داده‌ها می‌گردید.

پروتکل تمرین

گروه‌های تجربی تحقیق به مدت یک هفته به منظور آشناسازی با پروتکل تمرین بر روی تردمیل عمل دویدن را با سرعت ۱۵ تا ۲۰ متر بر دقیقه به صورت یک روز در میان انجام دادند. سپس بعد از وزن کشی، پروتکل اصلی تمرین بی‌هوازی با مصرف مکمل ملاتونین به مدت یک ماه انجام شد. پروتکل تمرین بی‌هوازی تحقیق حاضر با کمی تغییر با توجه به مطالعات پیشین بدست آمد (۱۵،۱۶). تمرینات بی‌هوازی شامل دویدن بر روی تردمیل مخصوص حیوانات با افزایش سرعت و شدت در طول یک ماه تمرین بود. برنامه تمرین به مدت یک ماه هر هفته سه جلسه اجرا شد (جدول ۶). شیب تردمیل در پروتکل بی‌هوازی از ۵ درجه تا ۲۰ درجه در طول یک ماه تمرین هر هفته به میزان ۵ درجه نیز افزایش یافت؛ به طوری که پروتکل تمرین با شیب ۵ درجه شروع شد و با ادامه تمرین بی‌هوازی هر هفته ۵ درجه به شیب هر دو پروتکل افزوده می‌شد؛ در نهایت پروتکل تمرینات بی-هوازی با شیب ۲۰ درجه پایان یافتند (۱۵،۱۶).

روش آماری

برای مقایسه میانگین وزن رت‌ها در گروه‌های مختلف از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه استفاده شد. سپس برای بررسی تفاوت میانگین فیبروز در گروه پایلوت و سالم از آزمون تی مستقل استفاده گردید. در ادامه برای کمی‌سازی مقادیر بیان ژن‌های مورد نظر از فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ استفاده گردید؛ سپس از فرمول Fold change برای چند برابری بیان ژن استفاده شد. همچنین برای تفاوت بیان ژن بین گروه‌ها از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. در صورتی که داده همگن نبودند از آزمون ناپارامتریک کراسکال والیس استفاده گردید. در نهایت برای تمام آزمون‌ها سطح معناداری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

جدول ۱: مقدار غلظت RNA و OD نمونه‌های تحقیق

نمونه‌های تحقیق	OD					
	۱	۲	۳	۴	۵	۶
گروه ایسکمی ریپرفیوژن	۱/۸۶	۱/۸۶	۱/۹۰	۱/۸۲	۱/۹۰	۱/۹۲
غلظت ng/µl	۱۹۱۷	۳۶۹۰	۳۵۴۲	۳۲۹۵	۲۰۶۹	۴۹۴۴
گروه ملاتونین	۱/۹۷	۱/۹۴	۱/۹۴	۱/۹۷	۲	۱/۹۶
غلظت ng/µl	۱۷۶۹	۲۱۰۳	۱۶۶۶	۲۴۳۹	۳۴۱۵	۲۶۵۸
گروه بی‌هوازی	۱/۹۷	۱/۹۵	۱/۹۴	۱/۸۲	۱/۸۹	۱/۹۴
غلظت ng/µl	۲۱۴۴	۳۹۳۵	۲۵۷۷	۳۸۵۰	۱۸۹۸	۳۵۵۲
گروه بی‌هوازی ملاتونین	۲/۰۲	۲/۰۸	۲/۰۷	۲/۰۳	۲	۲/۰۸
غلظت ng/µl	۸۳۸۸	۲۵۱۹	۲۲۰۲	۱۷۱۷	۲۱۹۳	۶۲۱۰

جدول ۲: پروتکل DNAase I برای رفع آلودگی DNA

مواد مورد نیاز	مقادیر مورد نیاز
RNA	1 µg
10X reaction buffer with MgCl2	1 µl
DNaseI, RNase-free	0.5µl (0.5u)
DEPC-treated Water	to 10 µl

جدول۳: محتویات محلول cDNA synthesis mix

مواد مورد نیاز	مقادیر مورد نیاز
10x buffer m-Mulv	2 µl
M-MulV Revers Transcriptase	0.5µl (100 unit)
nuclease-free Water	top up to 10 µl

جدول ۴ : توالی پرایمرها

ژن مورد نیاز		توالی پرایمر	دمای بهینه
HSP60	F	CAATAACACAAATGAAGAGGCTGG	۶۷
	R	TACAGCATCAACAGCCAACATC	
HSP70	F	GGTCTCAAGGGCAAGATCAG	۶۰
	R	TTTCTCAGCCAGCGTGTTAG	
GAPDH	F	GAACATCATCCCTGCATCCA	۶۰
	R	CCAGTGAGCTTCCCGTTCA	

جدول۶: پروتکل تمرین بی‌هوازی

مراحل تمرین مؤلفه تمرین	گرم کردن	بدنه اصلی تمرین بی‌هوازی	سرد کردن
زمان تمرین (دقیقه)	۶ دقیقه	۲۳ تا ۱۵ دقیقه	۶ دقیقه
شدت‌تمرین (VO_{2max})	۵۰ تا ۶۰ ٪	۸۰ تا تقریباً ۱۰۰ ٪	۵۰ تا ۶۰ ٪
سرعت دویدن (m/ min)	۱۵ تا ۲۰	۳۰ تا تقریباً ۵۰	۲۰–۱۵
مسافت کل بی هوازی	۹۰ تا ۱۲۰ متر	۶۹۰ تا ۷۵۰	۹۰ تا ۱۲۰ متر
شیب تردمیل (درجه)	صفر	۵ تا ۲۰ درجه	صفر

یافته ها

به منظور محاسبه fold change گروه‌های مختلف، میانگین بیان نسبی گروه کنترل تحقیق (کنترل) محاسبه گردید؛ سپس fold change تمام گروه‌های تحقیق، نسبت به بیان نسبی گروه کنترل گزارش شد. نتایج fold change ژن HSP60 نشان داد که میزان بیان این ژن در گروه ملاتونین افزایش داشته است (۱/۰۹ برابر)؛ اما در بقیه گروه‌ها کاهش داشته است؛ و همچنین کاهش در گروه تمرین بی‌هوازی ملاتونین بیشتر گزارش شد(۰/۳۸ برابر). نتایج fold change ژن HSP70 نشان داد که میزان بیان این ژن در گروه ملاتونین افزایش داشته است (۱/۴ برابر)؛ اما در بقیه گروه‌ها این افزایش بیشتر بود. نتایج این تحقیق نشان داد میزان بیان ژن HSP70 در گروه‌های تحقیق تغییرات معنی‌داری نداشته است؛ زیرا مقدار آماره (۰/۹۸۹) بزرگتر از مقدار معنی‌داری (۰/۰۵) است. به عبارت دیگر تیمار ملاتونین و تمرین بی‌هوازی بر بیان ژن HSP70 تأثیر معنی‌داری نداشته است(جدول ۸).

همچنین نتایج این تحقیق نشان داد میزان بیان ژن HSP60 در گروه‌های تحقیق تغییرات معنی‌داری نداشته است؛ زیرا مقدار آماره (۰/۲۹۷) بزرگتر از مقدار (۰/۰۵) است. به عبارت دیگر تیمار ملاتونین و تمرین بی‌هوازی بر بیان ژن HSP60 تأثیر معنی-داری نداشته است (جدول ۹).

جدول ۷: محاسبه مقادیر fold change تمام گروه‌های تحقیق

گروه‌ها	میانگین بیان نسبی گروه کنترل برای HSP60	میانگین بیان نسبی گروه کنترل برای HSP70	Fold change HSP60	Fold change HSP70	Final Fold change HSP60	Final Fold change HSP70
کنترل	۴۴۵/۳۶۴۵	۰/۷۲۱۴۱۶	۰/۰۳۹۹۰۴۱۶۳	۰/۰۴۴۲۲۷۷۵۳	۱	۱
			۳/۶۸۳۷۰۳۸۹۲	۲/۱۶۰۰۹۶۵۰۱		
			۰/۱۲۹۵۱۱۹۴۷	۰/۱۲۴۲۳۰۸۸۳		
			۰/۱۴۷۷۷۴۲۵۳	۱/۶۷۱۴۴۴۸۶۳		
ملاتونین			۰/۵۸۲۸۳۴۰۶۱	۰/۷۱۷۵۲۲۳۹۴	۱/۴۴۵۸۳۹	۱/۰۹۳۴۱۲
			۰/۲۸۵۴۱۹۷۵	۰/۴۲۹۶۰۸۸۹۴		
			۱/۱۹۰۱۶۱۲۸۸	۱/۲۹۳۳۳۴۷۸		
			۲/۳۱۵۲۳۲۵۳	۳/۳۴۲۸۸۹۷۲۷		
بی هوازی			۰/۹۴۰۲۷۶۵۸۵	۰/۶۷۸۸۱۷۵۴۸	۱/۵۷۲۶۵۶	۰/۷۸۰۷۳
			۱/۴۰۵۵۷۱۷۴۷	۱/۱۵۷۵۶۷۰۵۳		
			۰/۵۱۸۰۴۷۷۹	۴/۰۵۸۹۱۹۶۰۶		
			۰/۲۵۹۰۲۳۶۸۹۵	۰/۳۹۵۳۲۰۷۹۹		
ملاتونین بی هوازی			۰/۲۴۸۴۷۷۲۳۲۸	۲/۲۶۳۷۷۹۹۹۵	۱/۷۷۸۰۸۱	۰/۳۸۳۵۸۲
			۰/۰۴۶۷۵۱۵۲۱	۰/۳۰۱۶۸۱۰۰۵		
			۰/۷۰۲۷۸۵۸۷۴	۳/۷۰۹۱۶۸۳۹		
			۰/۵۳۶۳۱۶۷۰۶	۰/۷۳۷۶۹۴۶۹۵		

جدول ۸: آزمون تحلیل واریانس مقادیر بیان ژن HSP70 در گروه‌های تحقیق

متغییر تحقیق	گروهای تحقیق	میانگین	انحراف استاندارد	لون	F	Sig
2-ΔΔCT HSP70	کنترل	۱				
	ملاتونین	۱/۴۴۵۸۳	۱/۳۱۴۶			
	بی‌هوازی	۱/۵۷۲۶۵	۱/۶۸۷۰	۰/۶۶۴	۰/۱۰۷	۰/۹۸۹
	بی هوازی ملاتونین	۱/۷۷۸۰۸	۱/۵۶۳۵			

جدول ۹: آزمون کراسکال والیس برای مقادیر بیان ژن HSP60 در گروه‌های تحقیق

متغییر تحقیق	گروهای تحقیق	تعداد گروه‌ها	رتبه‌بندی میانگین‌ها	انحراف استاندارد	Sig
2-ΔΔctHSP60	کنترل	۴	۸/۵	۰/۸۴۳	۰/۲۹۷
	ملاتونین	۴	۱۷/۲۵		
	بی‌هوازی	۴	۱۵/۷۵		
	بی‌هوازی ملاتونین	۴	۱۰/۵۰		

بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که مصرف ملاتونین میزان بیان ژن آپوپتوزی HSP60 و HSP70 را افزایش می‌دهد؛ اما این افزایش معنی دار گزارش نشد (سطح آماره گروه ملاتونین برای ژن‌های HSP60 و HSP70 به ترتیب ۰/۲۹۷و ۰/۹۸۹ گزارش شد). نتایج تحقیق حاضر با تحقیقات پیشین از نظر افزایش بیان HSP60 و HSP70 همسو است اما از نظر معنی‌داری غیر همسو است. که این نتایج با یافته‌های تحقیق فورمن و همکاران در سال ۲۰۱۰ غیرهمسو است (۱۱). زیرا این محققان اثرات مفید ملاتونین را بر تغییرات قلب رت‌های پیر بررسی کردند؛ در حالی که تحقیق حاضراز رت‌های ۲ تا ۳ ماهه استفاده کرده است؛ و به نظر می‌رسد که در تحقیق فورمن و همکاران ملاتونین بیشتر نقش آنتی اکسیدانی خود را اعمال کرده است زیرا آنتی اکسیدان‌ها در رت‌های پیر کاهش می‌یابد و متعاقباً با تیمار ملاتونین تا حدودی این کاهش جبران می‌شود و می‌تواند از حجم آپوپتوز و نشانگرهای آن بکاهد. در حالی که در تحقیق حاضر ملاتونین بیشتر نقش خواب‌آوری و رگ‌گشایی خود را در رت‌های ۲ تا ۳ ماهه اعمال کرده است؛ به طوری که با خواب آوری و عدم تحرک و عمل رگ گشایی میزان نفوذ چربی در میوکارد افزایش می‌یابد و در ادامه شاخص‌های التهابی مانند TNF-α و رادیکال‌های آزاد مانند ROS و RNS بیشتر می‌شوند و در نهایت میوکارد مستعد به آسیب ایسکمی می‌گردد. در تأیید این مطلب تحقیق فورمن و همکاران بیان کردند پس از درمان با ملاتونین پارامترهای التهابی، استرس اکسیداتیوی و آپوپتوزی در رت‌های مستعد به پیری نسبت به رت‌های جوان بیشتر معکوس شدند. حال به نظر می‌رسد ملاتونین با ویژگی‌های خود مانند خاصیت آنتی اکسیدانی، رگ گشایی و خواب‌آوری می‌تواند نقش دوگانه ایفا کند؛ به طوری که اگر خاصیت آنتی اکسیدانی آن غالب شود می‌تواند نقش مفیدی اعمال کند؛ اما در صورتی که نقش رگ گشایی و خواب آوری آن غالب گردد می‌تواند نقش زیان‌آوری اعمال کند. از طرفی دیگر تحقیقی نشان داد که ملاتونین منجر به کاهش VEGF و افزایش ROS در تخمدان می‌شود؛ بنابراین به نظر می‌رسد تیمار ملاتونین در تحقیق حاضر میزان آنژیوژنز میوکارد را به دلیل عدم تحرک و کاهش شیر استرس کاهش داده است و از این طریق شاید بطن چپ رت‌ها را بیشتر مستعد به آسیب ایسکمی ریپرفیوژن کرده است (۱۷). زیرا میزان اکسیژن رسانی به میوکارد کاهش و از طرفی میزان نفوذ لیپیدها، مواد التهابی افزایش می‌یابد؛ به این دلایل میوکارد بیشتر مستعد به آسیب می‌گردد.

یافته‌های دیگر تحقیق نشان داد که تمرین بی‌هوازی میزان بیان ژن HSP60 و HSP70 را کاهش و افزایش داده است. اما این کاهش در مقایسه با گروه ایسکمی ریپرفیوژن معنی‌دار بیان نشد (سطح آماره HSP60 ۰/۲۷۹ بیان شد). این نتایج از نظر اینکه میزان بیان ژن HSP60 کاهش و HSP70 افزایش داشته است با تحقیق شیرین بیان و همکاران (۱۳۹۰) همسو است (۱۸)، اما از نظر معنی‌داری غیر همسو است. رت‌های پژوهش شیرین بیان و همکاران، گروه های ۱ و ۲ به مدت ۳ هفته

(۵ جلسه در هفته) با سرعت ۱۷-۱۵ متر در دقیقه و مدت ۳۹-۲۵ دقیقه و گروه های ۳ و ۴ به مدت ۶ هفته با سرعت ۲۰-۱۵ متر در دقیقه و مدت ۵۴-۲۵ دقیقه تمرین کرده‌اند؛ در حالی که رت‌های تحقیق حاضر۴ هفته و در هر هفته ۳ بار تمرین داده شدند. حال به نظر می‌رسد مدت تمرین به منظور سازگاری ویژگی‌های تمرین می-تواند مفید باشد. تمرین بی‌هوازی که دارای شدت بیشتری بوده است به دلیل سازگاری کمتر میزان بیان ژن HSP70 آن کمتر بوده است. حال به نظر می‌رسد اگر مدت زمان جلسات تمرین بیشتر شود و یا تواتر آن در هفته افزایش یابد بتوان بر میزان بیان نشانگرهای HSP70 تأثیر گذار باشد. زیرا با سازگاری تمرین عوامل اکسیدانی، التهابی، پروفایل‌های چربی و در نهایت عوامل آپوپتوزی مانند کاسپاز ۳ کاهش می‌یابند در مقابل عوامل آنتی اکسیدانی، پیش بقای سلولی مانند مسیر IGF1-R/PI3K/AKT افزایش می‌یابند که در مجموع می-توانند آپوپتوز قلبی را کاهش دهند. از طرف دیگر رت-های تحقیق شیرین بیان و همکاران ۶ هفته تمرین هوازی داشته‌اند اما رت‌های تحقیق حاضر ۴ هفته تمرین کرده‌اند. بنابراین به نظر می‌رسد مدت زمان تمرین به منظور سازگاری ویژگی‌های تمرین می‌تواند عامل مهمی برای تحت تأثیر قرار دادن بیان ژن HSP70 در میوکارد باشد. زیرا تحقیقات نشان داده‌اند که سازگاری سیستم اکسایشی نسبت به تمرینات ورزشی برای افراد ضروری است؛ زیرا افرادی که تمرینات منظم ندارند و یا معمولاً در پایان هفته، یک وهله تمرین شدید و خستگی ساز را انجام می‌دهند علاوه بر آسیب مکانیکی دچار آسیب بافتی بیشتر به دلیل رادیکال‌های آزاد می‌شوند (۱۹). بنابراین به نظر می رسد با افزایش مدت تمرین ورزشی می‌توان عوامل پیش آپوپتوزی میوکارد را کاهش داد. در تأیید مطالب بالا اسکات و همکاران در سال ۲۰۰۸ در طی تحقیقی بیان کردند که تمرین ورزشی، محافظتی در مقابل آسیب ایسکمی ریپرفیوژن میوکارد است(۲۰). زیرا تمرین استقامتی در مقابل تمام سطوح آسیب‌های ایسکمی ریپرفیوژن از قلب محافظت می‌کند. این تحقیق مکانیزم-های مورد نظر اثرات محافظت قلبی ناشی از ورزش را شامل افزایش گردش خون شریان کرونری، بیان پروتئین-های استرس شبکه آندوپلاسمی، افزایش فعالیت سیکلواکسیژناز ۲، القای پروتئین‌های شوک گرمایی میوکارد، افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سیتوزولی میوکارد، افزایش سیگنالینگ نیتریک اکساید، تغییر فنوتیپ میتوکندریایی، تغییر و افزایش کانال‌های پتاسیم حساس به ATP سارکولمایی و غشای داخلی میتوکندریایی ذکر کرد. در نهایت محققین نشان دادند افزایش سطوح آنتی اکسیدانی میوکارد و افزایش بیان کانال‌های پتاسیمی حساس به ATP به محافظت قلبی ناشی از ورزش در مقابل آسیب ایسکمی ریپرفیوژن کمک می‌کند؛ چرا که این عوامل سبب کاهش آسیب به میتوکندری می‌شود و استحکام غشای میتوکندری را افزایش می‌دهند در نهایت سبب افزایش ژن HSP70 در میتوکندری می‌گردد (۲۰) (شکل ۵-۲).

یافته‌های دیگر تحقیق نشان داد که تمرین بی‌هوازی با مصرف ملاتونین میزان بیان ژن HSP60 و HSP70 را به ترتیب کاهش و افزایش داده است. اما این کاهش و افزایش در مقایسه با گروه ایسکمی ریپرفیوژن معنی‌دار بیان نشد (سطح آماره به ترتیب برای ژن HSP60 ۰/۲۹۷ و در ژن HSP70 ۰/۹۸۹ بیان شد)؛ این نتایج نشان می‌دهد که تمرین بی‌هوازی با مصرف ملاتونین توانسته است میزان بیان HSP60 را نسبت به سایر گروه‌ها به مقدار بیشتر کاهش دهد؛ زیرا از طرفی مصرف ملاتونین با خاصیت آنتی اکسیدانی خود توانسته به عدم سازگاری تمرین در گروه تمرین بی‌هوازی کمک کند و کمبودهای آنتی اکسیدانی گروه هوازی و بی‌هوازی را جبران کند؛ و از طرف دیگر تمرین ورزشی میزان نفوذ پروفایل‌های چربی را مانند LDL و VLDL در گروه ملاتونین به دلیل عدم تحرک و خواب آوری جبران کرده است و این عوامل اثر افزایشی بر هم گذاشته‌اند که در نهایت منجر به کاهش میزان HSP60 در میوکارد شده-اند.

اما دلیل افزایش بیشتر بیان ژن HSP70 در گروه تمرین ورزشی با ملاتونین در مقابل تمرین ورزشی به تنهایی به نظر می‌رسد میزان التهاب کمتر در گروه ورزشی

با مصرف ملاتونین باشد. زیرا ونوروسو و همکاران در سال ۲۰۰۹ بیان کردند هنگامی که عضله قلب تحت ورزش حاد قرار می‌گیرد باعث افزایش علائم آسیب سلولی می‌شود (۲۱)؛ چرا که ورزش همراه با افزایش معنی‌دار فعالیت مالوپراکسیدازها و سطوح mRNA TNF-α، IL-1 و IL-6 است. علاوه بر این، محققین نشان دادند هر دو غلظت mRNA و پروتئین مولکول چسبان درون سلولی ۱، نیتریک اکساید سنتتاز القایی و سیکلواکسیژناز ۲ افزایش یافت. همچنین فعالیت معنی‌دار NF-KB در رت‌های تمرین کرده مشاهده شد. در مقابل این اثرات به طور کلی و جزئی با تیمار ملاتونین مسدود شد. بنابراین می‌توان گفت ملاتونین از آسیب قلبی ناشی از ورزش محافظت می‌کند (۲۱).

در تأیید این مطلب کومار و همکاران در سال ۲۰۰۲ تحقیقی تحت عنوان اثرات ملاتونین خوراکی و استرس اکسیداتیو ناشی از ورزش در افراد سالم انجام دادند (۲۲). در این تحقیق به افراد سالم اجازه داده شد تا بر روی تردمیل به مدت ۱۲ دقیقه بر اساس پروتکل بروس بدوند. خون افراد پیش و پس از ورزش جمع-آوری شد تا محصولات پراکسیداسیون لیپید، فعالیت کل آنتی اکسیدان در پلاسما و سوپراکسید دسموتاز برآورد شود. پس از سه روز، همان افراد ۱۰ میلی گرم قرص ملاتونین دو ساعت پیش از ورزش دریافت کردند. سپس پراکسیداسیون لیپید، فعالیت کل آنتی اکسیدان در پلاسما و سوپراکسید دسموتاز پیش و پس از ورزش سنجش شد. در افراد پس از ورزش محصولات پراکسیداسیون لیپید مانند مالونیل دی آلدئید به طور معنی‌داری افزایش داشت؛ در حالی که سوپر اکسید دسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز کاهش داشت. تغییری در فعالیت کل آنتی اکسیدان پلاسما یا فعالیت کاتالاز در RBC پیش و پس از ورزش وجود نداشت. سطح پایه محصولات پراکسیداسیون لیپید در افراد تحت درمان با ملاتونین در مقایسه با مطالعه بدون ملاتونین به طور معنی‌داری کاهش داشت؛ همچنین از کاهش سوپراکسید دسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز ناشی از ورزش پس از درمان با ملاتونین جلوگیری شد (۲۲). از طرف دیگر همچنین ورزش و ملاتونین با توجه به افزایش عوامل پیش بقا مانند مسیرهای سلولی IGF1-R/PI3K/AKT و JAK2/STAT3 توانسته‌اند میزان پیش بقای میوکارد را افزایش دهند که احتمالاً با افزایش مدت زمان تمرین و مصرف ملاتونین می‌توان به یک نتیجه بهتری دست یافت. چرا که ورزش و ملاتونین هموستاز کلسیم، نفوذپذیری میتوکندری، رهایش سیتوکروم C و آدرنالین را بهبود می‌بخشند که همه این عوامل می‌توانند به کاهش آسیب ایسکمی ریپرفیوژن دخالت کنند(۲۳). حال با توجه به یافته تحقیق حاضر و تحقیقات پیشین به نظر می‌رسد ملاتونین همراه با ورزش می‌تواند از اختلالات سیستم قلبی عروقی مانند افزایش رادیکال‌های آزاد، ROS، RNS، اکسیدان‌ها و عوامل آپوپتوزی مانند HSP60 جلوگیری کند و از طرف دیگر عوامل آنتی اکسیدانی را مانند سوپراکسید دسموتازها و گلوتاتیون و همچنین عوامل آنتی آپوپتوزی را مانند HSP70 و پروتئین‌های شوک گرمایی مانند HSP72 و پروتئین‌های کانال‌های یونی مانند کلسیم و پتاسیم را افزایش دهد. از این رو توصیه می‌گردد با افزایش مدت زمان تمرین و تواتر تمرین در هفته همراه با مصرف ملاتونین بتوان از میزان حجم آپوپتوز احتمالی ناشی از ایسکمی ریپرفیوژن کاست(۲۴).

نتیجه‌گیری

به طور خلاصه اصلی‌ترین یافته پژوهش حاضر این است که تمرینات بی‌هوازی با مصرف ملاتونین موجب کاهش حجم آپوپتوز میوکارد پس از ایسکمی ریپرفیوژن ناشی از تزریق ایزوپرنالین می‌شود. زیرا ایسکمی موجب سلسله رویدادهایی مانند کاهش اکسیژن و مواد غذایی سلول و متعاقباً افزایش کلسیم، لاکتات و رادیکال‌های آزاد می‌شود که در نهایت منجر به آپوپتوز و مرگ برنامه ریزی شده سلول می گردد. بنابراین براساس یافته‌های

پژوهش حاضر، سازوکارهای احتمالی به منظور کاهش حجم آپوپتوز میوکارد تمرین ورزشی و مصرف داروها می‌باشد. چرا که موجب ارتقای هموستاز سلول از نظر غشای سلول، آنتی اکسیدان‌ها، غشای میتوکندری، کانال-های یونی مانند کلسیم و پتاسیم و در نهایت افزایش مقاومت سلول در مقابل ایسکمی ریپرفیوژن می‌گردد. در عین حال، بخش‌های ناشناخته زیادی در سطح سلول وجود دارد؛ اما بیان ژن HSP60 و HSP70 از مهمترین نشانگرهای آپوپتوزی می‌باشند؛ که یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که تمرین بی‌هوازی با مصرف ملاتونین می‌توانند بر بیان ژن HSP60 و HSP70 تأثیر بگذارند؛ و میزان بیان آنها را به ترتیب کاهش و افزایش دهند. بنابراین رویکرد پیش آماده‌سازی ورزش می‌تواند به عنوان روشی در دستور کار بیماران مستعد دارای بیماری قلبی شریان کرونر قرار گیرد؛ زیرا برخلاف دارو درمانی که عوارض جانبی و اثربخشی محدود به همراه دارد تمرین ورزشی هیچگونه عوارض جانبی ندارد؛ به همین دلیل یافته تحقیق حاضراز اهمیت ویژه ایی برخوردار است.

قدردانی

تحقیق حاضر برگرفته از رساله دکتری دانشکده تربیت بدنی دانشگاه خوارزمی تهران می‌باشد. مراتب سپاس و قدردانی خود را از تمام افرادی که در انجام این تحقیق کمک نمودند اعلام می نماییم.

منابع

1-Borges JP, França GdO, Cruz MD, Lanza R, Nascimento ARd, Lessa MA. Aerobic exercise training induces superior cardioprotection following myocardial ischemia reperfusion injury than a single aerobic exercise session in rats. Motriz: Revista de Educação Física. 2017;23(SPE).

2-Ghahremani R, Salehi I, Komaki A, Damirchi A. Preconditioning Effect of High-Intensity Aerobic Training on Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury and Beclin-1 Gene Expression in Rats. PTJ. 2018; 8 (2) :115-121

3-Younis NS, Mohamed ME. β-Caryophyllene as a Potential Protective Agent Against Myocardial Injury: The Role of Toll-Like Receptors. Molecules. 2019;24(10):1929.

4-Ha S-J, Kim W. Mechanism of ischemia and reperfusion injury to the heart: from the viewpoint of nitric oxide and mitochondria. Chonnam Medical Journal. 2010;46(3):129-39.

5-Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. The Journal of clinical investigation. 2013;123(1):92-100.

6-Borges JP, da Silva Verdoorn K. Cardiac ischemia/reperfusion injury: the beneficial effects of exercise. Exercise for Cardiovascular Disease Prevention and Treatment: Springer; 2017. p. 155-79.

7-Rasouli M, Fazel Bakhsheshi M. Brand Positioning of the Sport Sciences Research Institution of Iran using Perceptual Mapping Technique. Annals of Applied Sport Science. 2018;6(1):103-13.

8-Zhai M, Li B, Duan W, Jing L, Zhang B, Zhang M, et al. Melatonin ameliorates myocardial ischemia reperfusion injury through SIRT 3- dependent regulation of oxidative stress and apoptosis. Journal of pineal research. 2017;63(2):e12419.

9-Sen CK. Oxidants and antioxidants in exercise. Journal of applied physiology. 1995;79(3):675-86.

10-Yamada P, Amorim F, Moseley P, Schneider S. Heat shock protein 72 response to exercise in humans. Sports Medicine. 2008;38(9):715-33.

11-Forman K, Vara E, García C, Kireev R, Cuesta S, Acuña- Castroviejo D, et al. Beneficial effects of melatonin on cardiological alterations in a murine model of accelerated aging. Journal of pineal research. 2010;49(3):312-20.

12-Hosseinzadeh L, Behravan J, Mosaffa F, Bahrami G, Bahrami A, Karimi G. Curcumin potentiates doxorubicin-induced apoptosis in H9c2 cardiac muscle cells through generation of reactive oxygen species. Food and Chemical Toxicology. 2011;49(5):1102-9.

13-Shi J, He J, Lin J, Sun X, Sun F, Ou C, et al. Distinct response of the hepatic transcriptome to Aflatoxin B 1 induced hepatocellular carcinogenesis and resistance in rats. Scientific reports. 2016; 6:31898.

14-Yang B, Jain S, Ashra SY, Furness PN, Nicholson ML. Apoptosis and caspase-3 in long-term renal ischemia/reperfusion injury in rats and divergent effects of immunosuppressants. Transplantation. 2006;81(10):1442-50.

15-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.

16-Haram PM, Kemi OJ, Lee SJ, Bendheim MØ, Al-Share QY, Waldum HL, et al. Aerobic interval training vs. continuous moderate exercise in the metabolic syndrome of rats artificially selected for low aerobic capacity. Cardiovascular research. 2008;81(4):723-32.
17-Li Y, Liu H, Sun J, Tian Y, Li C. Effect of melatonin on the peripheral T lymphocyte cell cycle and levels of reactive oxygen species in patients with premature ovarian failure. Experimental and therapeutic medicine. 2016;12(6):3589-94.
18-Milne KJ, Noble EG. Exercise-induced elevation of HSP70 is intensity dependent. Journal of Applied Physiology. 2002;93(2):561-8.
19-Gomez-Cabrera M-C, Domenech E, Viña J. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. Free radical biology and medicine. 2008;44(2):126-31.
20-Powers SK, Quindry JC, Kavazis AN. Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia–reperfusion injury. Free Radical Biology and Medicine. 2008;44(2):193-201.
21-Veneroso C, Tuñón MJ, González- Gallego J, Collado PS. Melatonin reduces cardiac inflammatory injury induced by acute exercise. Journal of pineal research. 2009;47(2):184-91.
22-Kumar KV, Naidu M. Effect of oral melatonin on exercise-induced oxidant stress in healthy subjects. Indian Journal of Pharmacology. 2002;34(4):256-9.
23-Ekeløf SV, Halladin NL, Jensen SE, Zaremba T, Aarøe J, Kjærgaard B, et al. Effects of intracoronary melatonin on ischemia–reperfusion injury in ST-elevation myocardial infarction. Heart and vessels. 2016;31(1):88-95.
24-Ozban M, Aydin C, Cevahir N, Yenisey C, Birsen O, Gumrukcu G, et al. The effect of melatonin on bacterial translocation following ischemia/reperfusion injury in a rat model of superior mesenteric artery occlusion. BMC surgery. 2015;15(1):18.

Evaluation of Melatonin on HSP60 and HSP70 Gene Expression Following High-Intensity Anaerobic Training after Ischemia-Reperfusion in Male Rats

Masoud Jokar[1*], Pejman Motamedi[1]

1-Assistant Professor of Exercise Physiology.

1-Department Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Kharazmi University Tehran, Tehran, Iran.

**Corresponding author:*
Masoud Jokar; Department Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Kharazmi University Tehran, Tehran, Iran.
Tel:+989306037157
Email: masoudjokar20@gmail.com

Abstract

Background and Objective: The aim of the present study was to evaluate the effect of melatonin supplementation on HSP60 and HSP70 gene expression changes following high intensity anaerobic exercise in male rats after ischemia-reperfusion.

Materials and Methods: Twenty four male Wistar rats weighing approximately 200-250g were divided into 4 groups of 6 each: study groups including control, melatonin, anaerobic training, and anaerobic+melatonin training. The anaerobic exercise protocol was performed for one month, while the melatonin anaerobic training group underwent melatonin gavage during the exercise. At the end of one month, rats were injected with isoprenaline after two days of rest to induce ischemia-reperfusion. After two days the rats were killed, their left ventricle removed and the expression levels of HSP60 and HSP70 genes were measured by RNA extraction and Real Time technique.

Results: Results showed that melatonin consumption decreased HSP60 and increased HSP70 apoptotic gene expression after anaerobic exercise ($P < 0.05$).

Conclusion: The results of this study showed that intake of melatonin concurrent with intensive anaerobic exercise reduce the volume of myocardial apoptosis after ischemia-reperfusion-induced ischemia-reperfusion.

Keywords: Melatonin, HSP70, HSP60, Anaerobic Training, Ischemia-Reperfusion.

►*Please cite this paper as:*
Jokar M, Motamedi P. Evaluation of Melatonin on HSP60 and HSP70 Gene Expression Following High-Intensity Anaerobic Training after Ischemia-Reperfusion in Male Rat . Jundishapur Sci Med J 2020; 18(5):471-484

Received: Oct 12, 2019 **Revised: Dec 10, 2019** **Accepted: Dec 22, 2019**