اثر تمرین استقامتی بر بیان ژن هیپوکامپی عوامل رشد عصبی و فیبروبلاستی رت‌ها متعاقب سکته مغزی

عقیل آسا[1]، عبدالحسین طاهری کلانی[2*]، محمود نیک‌سرشت[3]

تاریخ دریافت ۱۳۹۸/۰۷/۰۹ تاریخ پذیرش ۱۳۹۸/۱۰/۰۵

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: مشخص شده است که عوامل نوروتروفیک و رشدی آثار مثبتی بر تکثیر عصبی دارند. بااین‌حال، یافته‌ها در مورد آثار تمرین ورزشی بر این عوامل به دنبال سکته مغزی محدود است. بنابراین، مطالعه حاضر با هدف تعیین اثر ۸ هفته تمرین استقامتی بر روی نوارگردان پس از القای سکته بر بیان ژنی عوامل رشد عصبی (NFG) و فیبروبلاستی (FGF) در رت‌های نر ویستار اجرا شد.

مواد و روش کار: بیست و یک سَر رت صحرایی نر بالغ نژاد ویستار (وزن ۲۵۲-۲۱۰ گرم) به طور تصادفی به سه گروه کنترل، سکته و سکته+ تمرین تقسیم شدند. گروه تمرین استقامتی طی هشت هفته به مدت ۵۰- ۲۰ دقیقه و با سرعت ۳۰- ۱۸ متر بر دقیقه در هر جلسه و پنج جلسه در هفته روی نوارگردان دویدند. برای القای سکته مغزی هر دو سرخرگ کاروتید مشترک (CCA) به مدت ۴۵ دقیقه مسدود شد. چهل و هشت ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، رت‌ها معدوم شده و بیان ژن NGF و FGF با استفاده از تکنیک Real Time-PCR در سطح هیپوکامپی رت‌ها اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد، سکته مغزی باعث کاهش معنادار میزان بیان ژن NGF (p=۰/۰۰۰۱) و FGF (p=۰/۰۰۰۱) هیپوکامپی رت‌ها نسبت به گروه کنترل سالم گردید. به‌علاوه، تمرین استقامتی میزان بیان ژن NGF (p=۰/۰۰۱) و FGF (p=۰/۰۲۳) هیپوکامپی رت‌ها را پس از القای سکته مغزی به‌طور معناداری افزایش داد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد، تمرین استقامتی از راه تنظیم افزایشی عوامل نوروتروفیک و آنژیوژنیک می‌تواند در برابر آسیب‌های ناشی از ایسکمی-ریپرفیوژن اثر درمانی داشته باشد و اختلالات ناشی از سکته را کاهش دهد.

کلید واژها: تمرین استقامتی، سکته مغزی، عامل رشد عصبی، عامل رشد فیبروبلاستی.

این پژوهش مستخرج از پایان‌نامه آقای عقیل آسا مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ایلام است.

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی‌ام، شماره یازدهم، ص ۹۲۳-۹۱۲، بهمن ۱۳۹۸

آدرس مکاتبه: ایلام- انتهای بلوار دانشجو- دانشگاه آزاد اسلامی واحد ایلام- دانشکده علوم انسانی- گروه علوم ورزش، تلفن: ۳۲۲۲۸۰۷۵- ۰۸۴

Email: htaheriedu@gmail.com

مقدمه

ایسکمی مغزی (سکته) مجموعه‌ی پیچیده‌ای از مکانیسم‌های بیوشیمیایی و مولکولی را راه‌اندازی می‌کند که اعمال نورولوژیکی را از راه تخریب انسجام سلولی به وسیله‌ی عدم تعادل یونی، واکنش‌های رادیکال‌های آزاد، سیگنال‌های سمیت گلوتامات[1] و غیره مختل می‌کند (۱). در چنین شرایط پاتولوژیکی، تخریب عصبی از نوزایش عصبی پیشی می‌گیرد. این اختلال ناشی از نقصان‌هایی است که در یک یا چند مجموعه از فرایندهای عصبی شامل؛ تأخیر در شروع نوزایش، کاهش در نرخ نوزایش و اختلال در بالیدگی تارهای عصبی نوزایش شده رخ می‌دهد (۲).

مدت‌هاست که مشخص شده است فعالیت‌های بدنی منظم با تأثیر بر کنترل وزن، فشار خون بالا، پروفایل لیپیدی و دیابت می‌تواند به کاهش بروز سکته‌ی مغزی منجر شود (۳). شواهد جدید نشان داده‌اند، فعالیت ورزشی می‌تواند علاوه بر تعدیل عوامل خطر به حفاظت عصبی اندوژن و حفظ حیات نورونها در شرایط

[1] کارشناس ارشد، گروه علوم ورزش، دانشکده علوم انسانی، واحد ایلام، دانشگاه آزاد اسلامی، ایلام، ایران.

[2] استادیار، گروه علوم ورزش، دانشکده علوم انسانی، واحد ایلام، دانشگاه آزاد اسلامی، ایلام، ایران (نویسنده مسئول)

[3] استادیار، گروه علوم ورزش، دانشکده علوم انسانی، واحد ایلام، دانشگاه آزاد اسلامی، ایلام، ایران

[1] Excitotoxic glutamatergic signalling

آسیب ایسکمی خونرسانی مجدد[2] و نیز کاهش حجم انفارکت[3] و بهبود بازتوانی عصبی[4] و عملکردی منجر شود (۴، ۵).

عوامل نوروتروفیک یا نوروتروفین‌ها[5]، نقش مهمی در حفظ حیات، رشد، تمایز و پلاستیسیتی[6] نورون‌ها دارند (۶). این عوامل تروفیک از جمله عامل مشتق از مغز (BDNF)[7] و عامل رشد عصبی (NGF)[8] و نوروتروفین- ۳ (NT-3) به میزان زیادی در هیپوکامپ و مغز یافت می‌شوند و نشان داده شده است که موجب گسترش شبکه‌های عصبی، سیناپسی و افزایش نورون‌زایی، سیناپس‌زایی و در نهایت افزایش یکپارچگی مغزی و واحد پایه‌ی آن یعنی واحد عصبی- عروقی می‌شوند (۷- ۹).

مطالعات متعددی افزایش بیان و میزان BDNF و NGF را در خون و مغز پس از انواع فعالیت‌های ورزشی در آزمودنی‌های انسانی و حیوانی گزارش کرده‌اند (۱۰- ۱۲). نشان داده شده است در موش‌های صحرایی که فعالیت ورزشی انجام داده بودند، میزان BDNF و NGF را پس از آسیب ایسکمی خون‌رسانی مجدد بیشتر بود و میزان زیاد این عوامل با نقایص عصبی و حجم انفارکت کمتر -در مقایسه با گروه کنترل- ارتباط داشت (۱۲، ۱۳). این توانایی تنظیم افزایشی عوامل نوروژنیک در مرحله‌ی خون‌رسانی مجدد به طور بالقوه احتمال حیات و بازسازی نورونی را به ویژه در نواحی مرزی ناحیه‌ی ایسکمی شده افزایش می‌دهد (۹).

در شرایط طبیعی، رگ‌زایی و تکثیر سلول‌های اندوتلیال در مغز انسان اندک است (۹). با این وجود در پاسخ به فعالیت ورزشی، سیستم عروق‌ریز مغزی برای برآورده کردن نیازهای متابولیک مغز دچار دگرگونی می‌شود. افزایش چگالی (تراکم) مویرگی عضله اسکلتی، قلبی و دیگر بافت‌ها با رشد مویرگ‌های جدید، با عنوان آنژیوژنز[9] یاد می‌شود. فرایند آنژیوژنز با تکثیر و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال شروع شده و به دو شکل جوانه زدن و دو نیم‌شدن مویرگ‌های موجود می‌باشد (۱۴). یکی از عوامل رگ‌زایی، عامل رشد فیبروبلاست پایه (bFGF)[10] است که یک عضو خانواده رشد فیبروبلاست است. در بافت طبیعی، bFGF در غشای پایه و در ماتریکس خارج سلولی زیراندوتلیال[11] رگ‌های خونی وجود دارد و تا زمانی که پپتید پیام‌رسانی وجود نداشته باشد، به صورت متصل به غشا باقی می‌ماند (۱۵).

یافته‌های پژوهشی آثار سودمند فعالیت ورزشی بر آسیب مغزی ناشی از سکته را مورد تأیید قرار داده‌اند (۱۳، ۱۶، ۱۷). بهبود معناداری در بقاء و کاهش آسیب نورونی موش‌های صحرایی با اجرای دو هفته فعالیت‌های جابجایی اختیاری پیش از ایسکمی موقت مغز پیشین مشاهده شد (۱۸). همچنین، پس از ۴- ۲ هفته تمرین روی نوارگردان کاهش انفارکتوس در رتهایی گزارش گردید که به مدت ۶۰ دقیقه انسداد سرخرگ میانی مغز با ایسکمی مواجه شده بودند (۱۹). با این حال، در مطالعه‌ی دیگری پس از انسداد سرخرگ میانی مغز کاهش حجم انفارکتوس در رتهایی که فعالیت ورزشی شدیدی را اجرا کردند، مشاهده نشد (۲۰).

در هردوی آزمودنی‌های انسانی و حیوانی نشان داده شده است که فعالیت ورزشی طولانی مدت به افزایش چگالی عروق مغزی، رگ‌زایی و آرتریوژنز در نواحی مختلف مغزی منجر می‌شود (۸، ۱۲، ۲۱). علت این تغییرات افزایش مزمن انرژی مغز به هنگام فعالیت ورزشی است، زیرا این تغییرات ساختاری امکان تحویل مواد مُغذی ضروری برای نورون‌ها را فراهم می‌کند.

مطالعات در زمینه بررسی آثار درمانی تمرین ورزشی بر بیان ژنی عوامل رشد عصبی و رگ‌زایی به ویژه در شرایط پس از بروز سکته‌ی ایسکمیک مغزی محدود است؛ بنابراین پژوهش حاضر با هدف تعیین اثر هشت هفته تمرین استقامتی پس از القای سکته بر بیان ژنی NGF و FGF در هیپوکامپ رت‌های نر نژاد ویستار اجرا گردید.

مواد و روش کار

پژوهش حاضر به لحاظ روش اجرا از نوع تجربی با طرح پس‌آزمون با گروه کنترل و از نظر هدف، بنیادی- کاربردی بود. تعداد ۲۱ سَر رت صحرایی نر نژاد ویستار در دامنه‌ی وزنی ۲۵۲- ۲۱۰ گرم، به‌طور تصادفی به سه گروه کنترل سالم (n=۷)، سکته (n=۷) و سکته+ تمرین استقامتی (n=۷) تقسیم شدند. حیوانات در آزمایشگاه ویژه حیوانات و محیط کنترل شده با دمای ۲۴c°-۲۲، رطوبت ۵۰-۴۵ درصد و چرخه روشنایی- تاریکی ۱۲: ۱۲ ساعت نگهداری شدند. ضمن این‌که رت‌ها در طول مطالعه به آب و غذای مخصوص دسترسی آزاد داشتند. فرایند کار مربوط به رت‌های صحرایی و اصول اخلاقی و دستورالعمل‌های مراقبت از حیوانات

[2] Ischemia-Reperfusion injury
[3] Infarct volume
[4] Neurologic recovery
[5] Neurotrophin
[6] Plasticity
[7] Brain derived neurotrophic factor (BDNF)
[8] Nerve growth factor (NGF)
[9] Angiogenesis
[10] Basic fibroblast growth factor (FGF)
[11] Subendothelial

آزمایشگاهی، در این مطالعه به تأیید کمیته‌ی اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد ایلام رسید.

در گروه‌های سکته و سکته+ تمرین برای القای سکته‌ی مغزی، ابتدا رت‌ها با داروی کتامین (۵۰-۳۰mg/kg) و زایلازین (۵-۳mg/kg) بی‌هوش شدند. سپس هر دو سرخرگ کاروتید مشترک از صفحه کاروتید خود آزاد شده، و عصب واگ به دقت از سرخرگ کاروتید جدا گردید. در ادامه هر دو سرخرگ کاروتید مشترک به مدت ۴۵ دقیقه با استفاده از گیره‌های جراحی مسدود شدند. پس از آن، با برداشتن گیره‌ها سرخرگ‌های کاروتید آزاد و بلافاصله جریان خون برقرار شد. برقراری مجدد جریان خون در سرخرگ‌های کاروتید با مشاهده تأیید شد. در طول عمل جراحی، درجه حرارت مقعدی رت‌ها با استفاده از یک سیستم گرمایش تنظیم بازخوردی در ۰/۵±۳۶/۵ درجه سانتیگراد حفظ شد. رت‌ها پس از القای سکته و جراحی با دسترسی آزاد به آب و غذا به قفس خود بازگردانده شدند.

در ادامه رت‌های گروه تمرین، ۲۴ ساعت پس از القای سکته ۸ هفته تمرینات استقامتی منتخب را اجرا کردند. ابتدا گروه تمرینی طی یک هفته و ۳ جلسه متناوب به منظور آشناسازی با فعالیت ورزشی و دستگاه نوارگردان با سرعت ۱۵ متر در دقیقه و به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه تمرین کردند. پس از یک روز استراحت، اجرای پروتکل تمرینی با ۵ جلسه در هفته شروع شد. جهت رعایت اصل اضافه بار در رت‌های گروه تمرین، پروتکل تمرینی با سرعت ۱۸ متر بر دقیقه، مدت ۲۰ دقیقه و شیب صفر درصد در هفته‌ی اول شروع و به‌طور فزاینده به سرعت ۳۰ متر بر دقیقه، مدت ۵۰ دقیقه با شیب ۱۵ درجه در هفته‌ی ۸ رسید. پیش از تمرین اصلی، گرم کردن به مدت ۳ دقیقه با شدت ۱۰ متر بر دقیقه و به دنبال آن به مدت ۲ دقیقه با شدت ۱۵ متر بر دقیقه اجرا شد. به منظور سرد کردن پس از اجرای تمرین اصلی، حیوانات به مدت ۱ دقیقه با شدت ۱۵ متر بر دقیقه و سپس مدت ۲ دقیقه با شدت ۱۰ متر بر دقیقه روی نوارگردان دویدند. به منظور کاهش استرس در حیوانات از هیچ‌گونه شوک الکتریکی یا تحریک دیگری به‌جز لمس کردن و مالیدن دُم برای تحریک استفاده نشد.

دو روز پس از اتمام دوره تمرینی (۸ هفته)، عملیات جراحی و آسان‌کُشی صورت گرفت. رت‌ها با تزریق درون صفاقی ترکیبی از داروی کتامین (۵۰-۳۰mg/kg) و زایلازین (۵-۳mg/kg) بی‌هوش شدند. سپس سر آن‌ها از ناحیه گردن توسط قیچی مخصوص جدا شد. با استفاده از تیغ جراحی جمجمه آنها شکافته و با احتیاط مغز خارج گردید. مغز سالم توسط تیغ جراحی دقیقاً از وسط به دو نیم تقسیم شده، هیپوکامپ از سیستم لمبیک جدا و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد گردید.

بیان ژن NGF و FGF با استفاده از تکنیک Real-time PCR بررسی شد. جهت سنجش تعداد کپی‌های ژن‌های هدف و مرجع (جدول ۱) از روش مقایسه‌ای سیکل آستانه استفاده شد؛ این روش برای آنالیز بیان نسبی ژن‌ها به کار رفت. به طور خلاصه در این روش، ژن مورد نظر (NGF و FGF) و ژن مرجع (GAPDH) با کارایی نزدیک به ۱۰۰ درصد (با ۵ درصد اختلاف یعنی از ۵±۱۰۰) درون دستگاه PCR (Foster City, CA, USA) تکثیر شدند.

برای جداسازی RNA از کیت Qiagen (RNeasy Mini Kit(50)- Netherland)طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. کیت QuantiTect Reverse Transcription Kit cDNA synthesis (Qiagen) برای ساخت cDNA طبق دستورالعمل شرکت سازنده به‌کار رفت. از دستگاه BIO RAD (C1000™Thermal Cycler)برای اندازه‌گیری میزان بیان ژنی استفاده شد. برنامه زمانی- گرمایی دستگاه در سه مرحله انجام گردید. مرحله اول که منجر به دناتوره شدن مولکول‌های DNA و فعال شدن آنزیم پلی‌مراز گردید، به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، مرحله دوم ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای ۴۵ سیکل متوالی و مرحله‌ی نهایی جهت ترسیم منحنی تفکیک یا ذوب به صورت ۵۵ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد، با افزایش ۰/۵ درجه در مدت ۵ ثانیه انجام شد. واکنش‌های Real-Time PCR در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر در پلیت‌های ۹۶ چاهکی انجام شدند. در مطالعه‌ی حاضر از ماده‌ای با رنگ فلوئورسنت سبز به نام SYBR-Green استفاده شد که قادر است در میان شیار کوچک مولکول DNA دو رشته‌ای قرار گرفته و نور فلوئورسنت را منتشر کند. میزان تولید نور فلوئورسنت، نسبت مستقیم با میزان تولید محصول PCR دارد. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ گزارش شده است.

جدول (۱): مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر

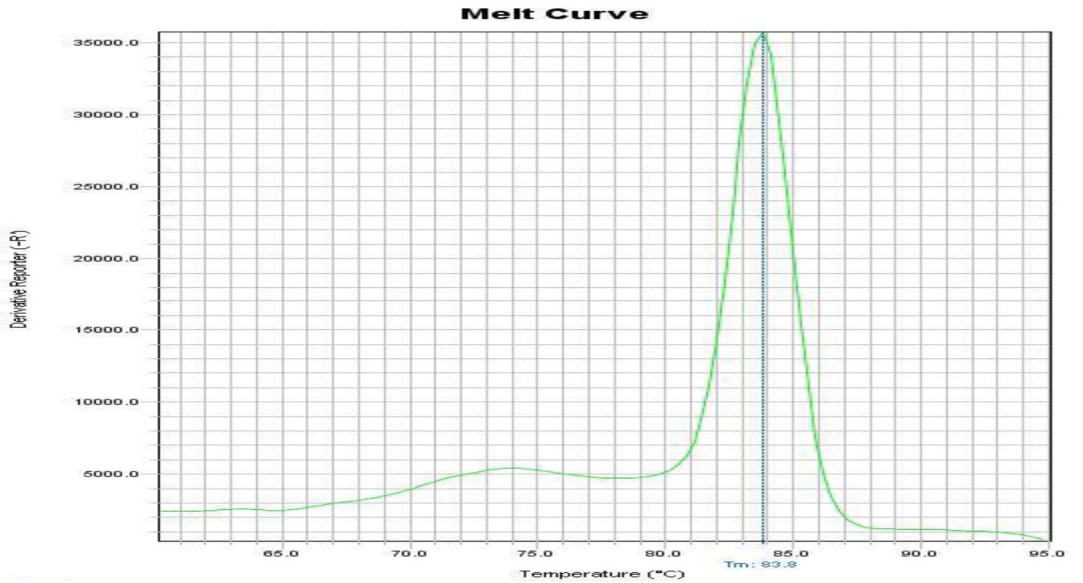
نام پرایمر	توالی پرایمر	طول پرایمر (bp)	طول محصول (bp)
NGF	Forward: GCCTGTTTGTCGTCTGTTGT	۲۰	۱۱۳
	Reverse: GCCCCGAATCCTGTAGAGAG	۲۰	
FGF	Forward: GGAATGGATTGAGGGATGTGA	۲۱	۲۱۰
	Reverse: GAGCAGTTTGGGTTTTTTGTAG	۲۲	

GAPDH	Forward: AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG	۲۲	۱۲۱
	Reverse: CATACTCAGCACCAGCATCACC	۲۲	

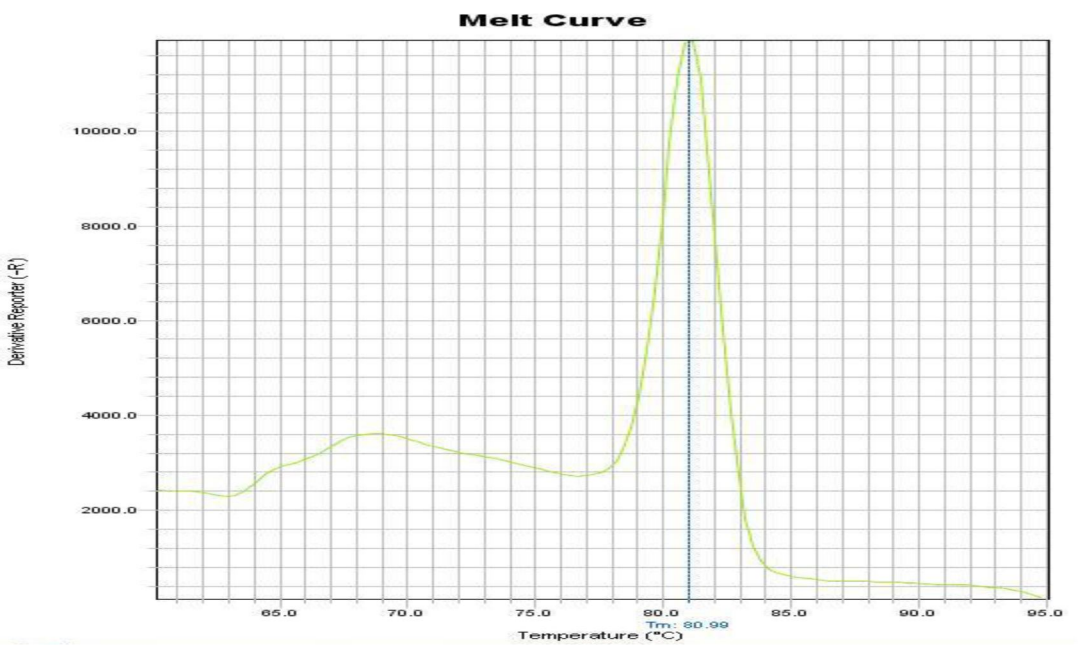
طبیعی بودن توزیع داده‌ها و تجانس واریانس‌ها با اســـتفاده از آزمون شـاپیرو- ویلک و لون مورد بررسی قرار گرفت. برای مقایسه تفـاوت بین گروهی از آزمون واریـانس یـک‌طرفه (ANOVA) در سـطح معناداری ۰/۰۵ اسـتفاده شـد. هنگامی که تفاوت معناداری وجود داشت، آزمون تعقیبی شفه برای یافتن محل تفاوت بین گروه‌ها به‌کار رفت.

یافته‌ها

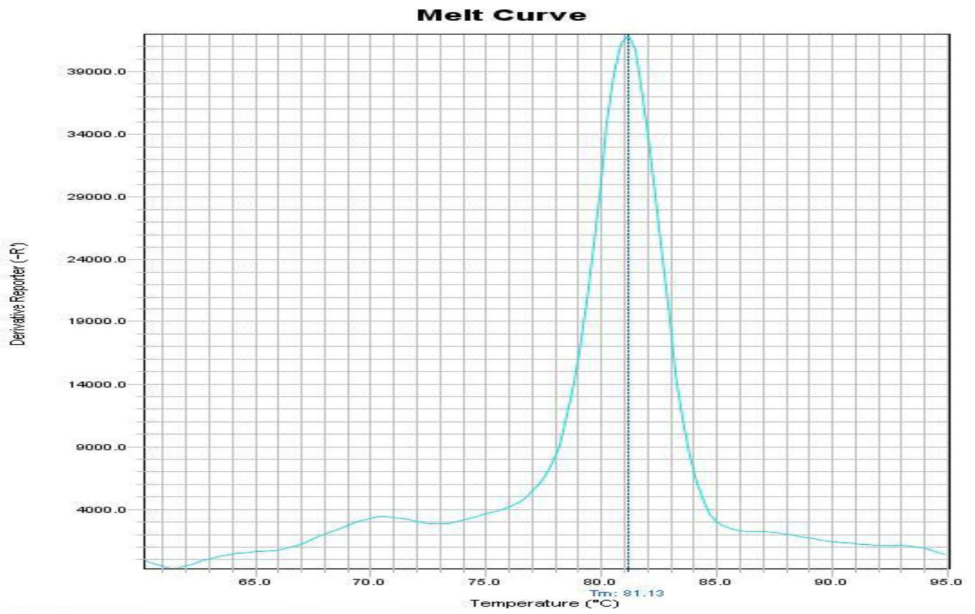
نمودارهای مربوط به ذوب ژن‌های NGF، FGF و GAPDH در نمودارهای ۱ تا ۳ مشخص شده‌اند که دارای تک منحنی بوده و اتصال اختصاصی آن‌ها را نشان می‌دهد.



نمودار (۱): منحنی ذوب ژن NGF.



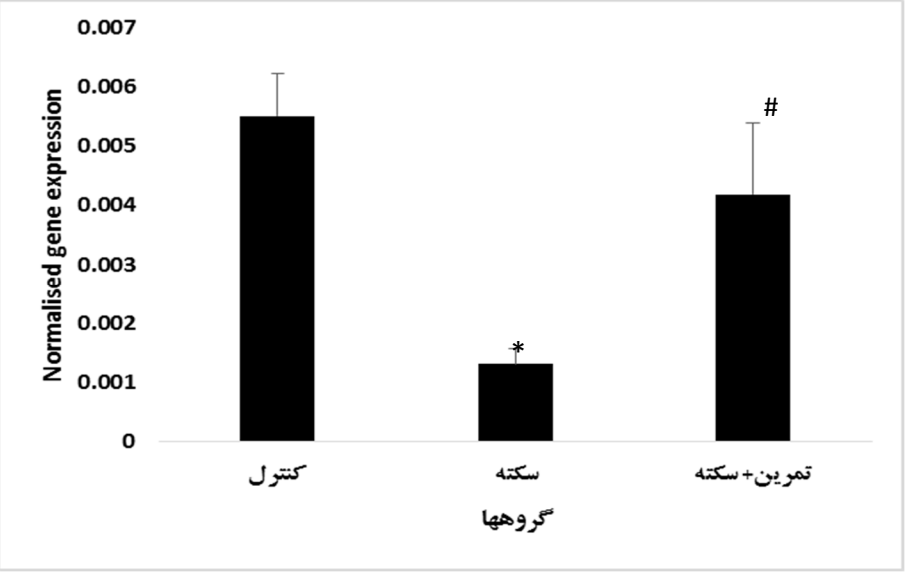
نمودار (۲): منحنی ذوب ژن FGF.



نمودار (۳): منحنی ذوب ژن GAPDH.

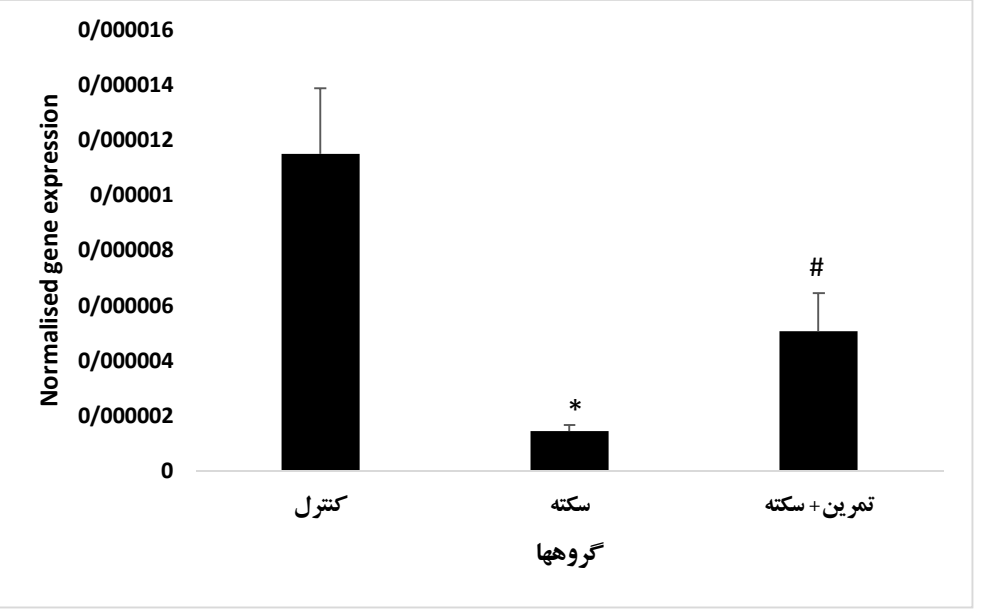
تجزیـه و تحلیل داده‌ها با اســـتفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌راهه نشان داد، در میزان بیان ژن NGF و FGF در هیپوکامپ مغزی بین گروه‌هـا تفاوت معناداری وجود داشـــت (p=۰/۰۰۰۱). جهت تعیین محل تفاوت از آزمون تعقیبی شفه استفاده شد.

نتایج آزمون تعقیبی شـفه نشان داد، میزان بیان ژن NGF در گروه ســـکته به‌طور معناداری از گروه کنترل (p=۰/۰۰۰۱) و گروه سکته+ تمرین (p=۰/۰۰۱) کمتر بود. با این وجود، بین میزان بیان ژن NGF در گروه‌های کنترل و ســـکته+ تمرین تفاوت معناداری (p=۰/۱۱۵) وجود نداشت (نمودار ۴).



نمودار (۴): میزان بیان ژن NGF (انحراف استاندارد ± میانگین) در گروههای کنترل، سکته و سکته+ تمرین.
* تفاوت معنادار با گروه کنترل (p=۰/۰۰۰۱). #تفاوت معنادار با گروه سکته (p=۰/۰۰۱)

نتایج آزمون تعقیبی شفه نشان داد، میزان بیان ژن FGF در گروه‌های سکته (p=۰/۰۰۰۱) و سکته+ تمرین (p=۰/۰۰۰۱) به‌طور معناداری از گروه کنترل کمتر بود. به‌علاوه، میزان بیان ژن FGF در گروه تمرین+ سکته به‌طور معناداری از گروه سکته (p=۰/۰۲۳) بیشتر بود. میزان بیان ژن FGF در سه گروه مورد مطالعه در نمودار ۵ ارائه شده است.



نمودار (۵): میزان بیان ژن FGF (انحراف استاندارد ± میانگین) در گروههای کنترل، سکته و سکته+ تمرین.
* تفاوت معنادار با گروه کنترل (p=۰/۰۰۰۱). #تفاوت معنادار با گروه سکته (p=۰/۰۲۳).

بحث

در پژوهش حاضر اجرای ۸ هفته تمرین استقامتی توانست افزایش معناداری در بیان ژن NGF هیپوکامپی رت‌ها را پس از القای سکته مغزی ایجاد کند. در واقع، تمرین ورزشی کاهش بیان ژن NGF در اثر القای سکته مغزی را جبران کرد.

مطالعات نشان داده‌اند که اجرای فعالیت ورزشی به‌طور بالقوه از طریق آثار آن بر عوامل نوروتروفیکی با کاهش ضایعات عصبی ناشی از سکته ایسکمیک مغزی همراه است. در این زمینه یو و همکاران ۲۰۱۷، در مطالعه‌ای به بررسی نقش دویدن اختیاری روی نوارگردان بر بیان ژنی NGF و BDNF در هیپوکامپ موش‌های نر پرداختند. نتایج آنان نشان داد که ۸ هفته تمرین موجب افزایش این دو فاکتور در هیپوکامپ موش‌ها شده است. آنان مکانیسم افزایش NGF در اثر فعالیت ورزشی را ناشی از تکثیر سلولی در شکنج‌های دندانه‌دار[1] مغز از طریق مکانیسم MAPK دانستند (۲۲). همچنین فرانزونی و همکاران ۲۰۱۷، پس از ۶ هفته فعالیت ورزشی متوسط افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی و بیان ژن NGF در هیپوکامپ رت‌ها را گزارش کردند (۲۳). اگرچه در این دو پژوهش از حیوانات سالم استفاده شده ولی یافته‌های آنان با نتایج پژوهش ما هم‌خوانی دارد.

به علاوه همسو با نتایج مطالعه‌ی حاضر، افزایش معنادار بیان یا رهایش NGF پس از تمرینات ورزشی گزارش شده است (۱۲، ۲۴- ۲۶). دینگ و همکاران ۲۰۰۴، افزایش معنادار مقادیر خونی و بیان ژن NGF در کورتکس و جسم مخطط مغز را متعاقب ۳ هفته و روزانه ۳۰ دقیقه دویدن روی نوارگردان در رت‌های با انسداد دو ساعته سرخرگ میانی نشان دادند (۱۲). هم‌چنین، اجرای ۶ هفته تمرینات استقامتی با شدت متوسط در رت‌های دیابتی با افزایش بیان ژن NGF در بخش حسی نخاع همراه بوده است (۲۴). به نظر می‌رسد نوع برنامه تمرینی استفاده شده، بیمار بودن حیوانات و روش اندازه‌گیری در این پژوهش‌ها نسبت به مطالعه حاضر از عوامل مشابهت نتایج می‌باشد.

آنگ و همکاران ۲۰۰۳، کاهش ۳۳ درصدی حجم انفارکت ایجاد شده در اثر انسداد سرخرگ میانی را پس از ۱۲ هفته دویدن اجباری در رت‌ها گزارش کردند. در این مطالعه افزایش بیان ژنی NGF، p75 (گیرنده NGF) و تعداد نورون‌ها نیز نشان داده شد. بر

[1] Dentate gyrus

این اساس، آن‌ها نورون‌زایی و حفاظت عصبی ایجاد شده را به NGF و دیگر نورتروفین‌های درون‌زا نسبت دادند (۱۳). به‌طور مشابهی، در مطالعه دیگری افزایش سطح NGF هیپوکامپی و تحریک نوروژنز پس از ۸ هفته تمرینات شنا و دویدن روی نوارگردان گزارش گردید، ولی تأثیری بر عملکرد شناختی رت‌ها نداشت. آنان پیشنهاد دادند که تحریک نوروژنز هیپوکامپی ممکن است که آثار سودمندی بر حافظه و توانایی یادگیری در شرایطی مانند سالمندی و بیماری‌های عصبی داشته باشد، ولی افزایش NGF و تولید سلول‌های عصبی جدید در افراد نرمال تأثیری ندارد (۲۷).

پژوهش جیانگ و همکاران ۲۰۱۴، تنها مطالعه‌ای بود که تمرینات اجرا شده در آن تأثیری بر بیان ژنی NGF نداشت. طول دوره‌ی تمرینات در این مطالعه ۴ هفته بود که ممکن است برای ایجاد تغییرات معنادار در بیان ژنی NGF کافی نبوده است (۲۸). به‌علاوه، رت‌های مورد مطالعه در معرض استرس پیش‌بینی نشده قرار گرفتند و فعالیت ورزشی استفاده شده شنا بود که ممکن است این عوامل سبب مغایرت نتایج آن با پژوهش حاضر شده باشد. این احتمال وجود دارد که برای اثرگذاری تمرینات ورزشی بر عوامل نوتروفیکی در هر بیماری خاص به دوره‌های تمرینی ویژه نیاز باشد.

تاکنون مکانیسمی که از طریق آن تمرینات ورزشی موجب افزایش میزان نوروتروفین‌ها می‌شود، به خوبی مشخص نشده است. با این وجود مطالعات زیادی گزارش کرده‌اند که، فعالیت ورزشی ممکن است از طریق افزایش نوروتروفین‌ها موجب محافظت از نورون‌ها در برابر آسیب‌های ناشی از ایسکمی- خون‌رسانی مجدد مغزی شود. نوروتروفین‌ها افزون بر افزایش پیوستگی مغزی، موجب افزایش نوروژنز و سیناپتوژنز خواهند شد. مطالعات انسانی و حیوانی نشان داده‌اند که BDNF و NGF این فرایندها را تسهیل می‌کنند (۲۹، ۳۰). این عوامل تروفیکی، شبکه‌های عصبی و سیناپسی بیشتری را ایجاد می‌کنند، هم‌چنین موجب محافظت از سیستم‌های عصبی و عروقی مغزی خواهند شد. به‌علاوه، مطالعات نشان داده‌اند که نوروتروفین‌ها با تأثیر مستقیم بر پروتئین‌های خانواده Bcl-2 سبب تغییر در بیان پروتئین‌های آپوپتوزی خواهد شد. همچنین، BDNF موجب فعال شدن مسیرهای سیگنالینگ درگیر در تنظیم افزایشی بیان Bcl-2 می‌شود (۳۱). به‌علاوه مشخص شده که سطوح mRNA و پروتئین Bcl-xL در ناحیه CA1 هیپوکمپ موش صحرایی با تزریق نوروتروفین‌ها افزایش می‌یابد (۳۲). گزارش شده که سطوح ژنی BDNF و NGF پس از چند هفته ورزش مداوم افزایش می‌یابد، این افزایش به‌طور خاص در آستروسیت‌ها و سلول‌های عصبی دیده شده است (۱۲). تنظیم افزایشی این پروتئین‌ها پس از فعالیت ورزشی مزمن موجب افزایش نوروژنز می‌شود که یک سازوکار محافظتی پیش از آسیب ایسکمی- خون‌رسانی مجدد می‌باشد. مطالعات متعدد نشان داده است که در موش‌های پیش‌آماده‌سازی شده با ورزش سطوح BDNF و NGF به دنبال ایسکمی- خون‌رسانی مجدد افزایش می‌یابد که با کاهش اختلالات نورولوژیک و کاهش حجم ضایعه همراه است (۱۲، ۱۳).

افزایش معنادار بیان ژن FGF هیپوکامپی رت‌ها متعاقب القای سکته مغزی، در اثر اجرای ۸ هفته تمرین استقامتی از دیگر یافته‌های مطالعه‌ی حاضر بود. با این وجود، تمرین ورزشی نتوانست کاهش بیان ژن FGF در اثر القای سکته مغزی را به سطح طبیعی بازگرداند به طوری که، بیان ژن FGF در گروه سکته+ تمرین نسبت به گروه کنترل سالم کمتر بود.

همسو نتایج این پژوهش، در مطالعه دیگری افزایش عوامل آنژیوژنز (FGF و VGEF) پس از شرکت در تمرین ورزشی گزارش شده است (۳۳). با این‌که در مطالعه ذکر شده، از ۱۰ هفته تمرین مقاومتی استفاده شده و اندازه‌گیری FGF در سطح سرمی بوده است، احتمال دارد که بیمار بودن آزمودنی‌های دو مطالعه دلیل یکسانی نتایج به دست آمده باشد. بر این اساس، به نظر می‌رسد ممکن است کارایی تمرین ورزشی در افزایش بیان ژنی و مقدار سرمی FGF در آزمودنی‌های بیمار بیشتر باشد.

FGF یکی از شاخص‌های آنژیوژنز (رگ‌زایی) به حساب می‌آید. از این رو، دلیل افزایش FGF در پاسخ به تمرین ورزشی را می‌توان به افزایش محرک‌های رگ‌زایی دانست. محرک‌های رگ‌زایی، مجموعه‌ای از عوامل هستند که موجب تشکیل عروق جدید می‌شوند. مهم‌ترین این عوامل هایپوکسی، نیروهای همودینامیکی، متابولیت‌ها، اتساع کننده‌های عروقی مثل نیتریک اُکساید (NO)، انقباض عضلانی، برخی سایتوکین‌ها و انواع کشش‌ها است (۳۳). هایپوکسی از علل اصلی افزایش عوامل رگ‌زایی است. در شرایط ایجاد هایپوکسی، سلول‌های هسته‌دار قادرند به کمبود اکسیژن پاسخ دهند. در نمونه‌های پژوهش حاضر به دلیل قطع جریان خون ناشی انسداد سرخرگ‌های مشترک کاروتید، و همچنین اجرای تمرینات استقامتی هایپوکسی در سلول‌های مغزی تشدید شده که این وضعیت افزایش قابل توجهی را در پروتئین و mRNA، عامل القایی هیپوکسی (HIF-1)[2] رخ می‌دهد که در انواع مختلفی از بافت‌های پستانداران بیان می‌شود. کمپلکس HIF-1 پس از شکل‌گیری می‌تواند عناصر واکنش دهنده به هایپوکسی را که روی ژن‌های هدف که در هسته قرار دارند، شناسایی کنند (۳۴) که در

[2] Hypoxia inducible factor-1

نهایت سبب رونویسی ژن عوامل رگ‌زا مثل VEGF و FGF می‌شود. درجه‌ای از هایپوکسی که موجب بیان عوامل رگ‌زا می‌شود مشخص نیست، و بین گونه‌های حیوانی و انواع بافت‌ها متفاوت است (۳۳).

انجام فعالیت‌های ورزشی با افزایش جریان خون همراه است که می‌تواند باعث ایجاد نیروهای همودینامیکی (استرس بُرشی[3]) شود (۳۵). منظور از استرس برشی نیروهای همودینامیکی موازی با جداره‌ی دیواره رگ‌هاست که از اصطکاک جریان خون با جداره به وجود می‌آید. به نظر می‌رسد افزایش حاد و آنی استرس برشی، موجب ترشح اتساع کننده‌های عروقی به ویژه NO می‌گردد که موجب گشادشدن رگ‌ها می‌شود. در حالی که افزایش مزمن استرس برشی سبب تغییرات ساختاری، به ویژه افزایش قطر و هایپرتروفی رگ‌ها می‌شود (۳۶). استرس برشی از طریق فعال‌سازی کانال‌های یونی به ویژه کانال‌های پتاسیمی موجب تولید و افزایش NO شده که این تغییرات موجب فعال‌سازی گیرنده‌های تیروزین کینازی عوامل رشدی می‌گردد. هم‌چنین نشان داده شده که استرس برشی از طریق گیرنده‌های اینتگرینی αvβ3 موجب بیان bFGF از سلول‌های اندوتلیال عروقی شده و در نهایت منجر به افزایش FGF می‌شود (۳۳).

از دیگر دلایل اثرگذار بر بیان عوامل رگ‌زا، دگرگونی سیستم عروق ریز مغزی برای برآورده کردن نیازهای متابولیکی آن است (۳۷). علت این تغییرات، افزایش مزمن نیاز انرژی مغز هنگام فعالیت ورزشی است. در این شرایط متابولیسم ATP در مغز افزایش یافته و موجب تولید آدنوزین می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که آدنوزین افزایش یافته باعث گسترش اتساع‌پذیری رگ‌های بافت‌ها، ارتقاء تعادل انرژی، افزایش بیان عوامل رشدی، افزایش تکثیر و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال و در نهایت تشکیل عروق جدید می‌شود (۳۸).

درمجموع، تغییرات ساختاری ناشی از عوامل آنژیوژنز امکان تحویل مواد مغذی ضروری برای نورون‌ها را فراهم می‌کند. افزون بر آن، تشکیل رگ‌های جدید با افزایش جریان خون به مغز موجب کاهش آسیب مغزی در شرایط بروز ایسکمی می‌شود. مزیت دیگر رگ‌زایی متعاقب ایسکمی، افزایش جریان خون جانبی[4] است که در حفاظت از مغز به ویژه مناطق مرزی ناحیه‌ی انفارکت شده حائز اهمیت است که بازتوانی عصبی را تسریع می‌بخشد.

برخلاف نتیجه به دست آمده در این مطالعه، عدم تغییر میزان FGF در پاسخ به تمرین ورزشی گزارش شده است (۲۸، ۳۹، ۴۰). نشان داده شده که مقدار bFGF عضله اسکلتی انسان متعاقب پروتکل ۴ هفته‌ای بازکردن زانو با ۹۰ و ۱۵۰٪ اکسیژن مصرفی بیشینه پا تغییری نیافت (۳۹). همچنین، مقدار bFGF خون پس از ۵ هفته تمرین مقاومتی در آزمودنی‌های انسانی بدون تغییر بود (۴۰). در مطالعه‌ی دیگری که پس از تمرینات شنا تغییری در بیان ژن هیپوکامپی موش‌های در معرض استرس پیش‌بینی نشده به وجود نیامد، طول دوره‌ی تمرینات ۴ هفته بود (۲۸). تفاوت در طول دوره‌ی تمرینات، نوع آزمودنی‌ها و سالم بودن آن‌ها و محل اندازه‌گیری FGF (عضله در مقابل هیپوکامپ) از جمله دلایل مغایرت این پژوهش‌ها با نتایج مطالعه‌ی حاضر است. در این مطالعات برنامه‌های تمرینی طی ۴ تا ۵ هفته اجرا شده که به نظر می‌رسد برای اثرگذاری بر میزان FGF کافی نیست، لذا ممکن است برای ایجاد تغییرات معنادار در این فاکتور به تمرینات با دوره‌های طولانی‌تر از ۵ هفته نیاز باشد.

نتیجه‌گیری

چنین به نظر می‌رسد که انجام تمرین ورزشی پس از القای سکته مغزی در رت‌ها از راه افزایش بیان ژن NGF و FGF هیپوکامپی، موجب نوعی فرآیند جبرانی و مقابله با اختلالات فیزیولوژیکی، عصبی و روند پیشرفت این بیماری می‌شود. می‌توان گفت، فعالیت ورزشی از جمله تمرین استقامتی موجب تشکیل نورون‌های جدید از طریق روند نورون‌زایی و افزایش دسترسی بافت مغز به مواد مغذی ضروری از طریق رگ‌زایی می‌شود. در نتیجه، به نظر می‌رسد تمرین ورزشی می‌تواند موجب تغییر شرایط بیماران مبتلا به سکته مغزی از شرایط پاتولوژیک به وضعیت فیزیولوژیک گردد. با این‌حال، برای درک سازوکارهای دقیق و نحوه‌ی اثرگذاری فعالیت ورزشی و همچنین میزان و شدت فعالیت ورزشی مؤثر به مطالعات کنترل شده‌ی بیشتری نیاز است.

تشکر و قدردانی

این مقاله از پایان‌نامه تحصیلی آقای عقیل آسا کارشناس ارشد فیزیولوژی ورزشی دانشکده علوم انسانی در دانشگاه آزاد اسلامی واحد ایلام با کد ۲۰۱۲۱۴۲۳۹۶۲۰۱۵ مستخرج گردیده است. بدین وسیله از کلیه کسانی که ما را در اجرای این پژوهش یاری رساندند، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

[3] Shear sress

[4] Collateral circulation

References

1- Mehta SL, Manhas N, Raghubir R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. Brain Res Rev 2007; 54(1): 34-66.

2- Yasuda H, Terada M, Maeda K, Kogawa S, Sanada M, Haneda M, et al. Diabetic neuropathy and nerve regeneration. Progress Neurobiol 2003; 69: 229-85.

3- Hu G, Barengo NC, Tuomilehto J, Lakka TA, Nissinen A, Jousilahti P. Relationship of physical activity and body mass index to the risk of hypertension: a prospective study in Finland. Hyperten 2003; 43(1): 25-30.

4- Liebelt B, Papapetrou P, Ali A, Guo M, Ji X, Peng C, et al. Exercise preconditioning reduces neuronal apoptosis in stroke by up-regulating heat shock protein-70 (heat shock protein-72) and extracellular-signal-regulated-kinase 1/2. Neurosci 2010; 166(4): 1091-100.

5- Zwagerman N, Sprague S, Davis MD, Daniels B, Goel G, Ding Y. Pre-ischemic exercise preserves cerebral blood flow during reperfusion in stroke. Neurol Res 2010; 32(5): 523-9.

6- Deister C, Schmidt CE. Optimizing neurotrophic factor combinations for neurite outgrowth. J Neural Eng 2006; 3(2): 172-9.

7- Wang X, Zhang M, Feng R, Li WB, Ren SQ, Zhang J, et al. Physical exercise training and neurovascular unit in ischemic stroke. Neurosci 2014; 271: 99-107.

8- Kochanski R, Dornbos III D, Ding Y. Neuroprotection and Physical Preconditioning: Exercise, Hypothermia and Hyperthermia. Innate Tolerance CNS: Springer 2013; 105-31.

9- Dornbos D, Ding Y. Mechanisms of Neuroprotection Underlying Physical Exercise in Ischemia-Reperfusion Injury. In Tech 2012; 299-326.

10- Zoladz JA, Pilc A. The effect of physical activity on the brain derived neurotrophic factor: from animal to human studies. J Physiol Pharmacol 2010; 61(5): 533-41.

11- Hillman CH, Erickson KI, Kramer AF. Be smart, exercise your heart: exercise effects on brain and cognition. Nat Rev Neurosci 2008; 9(1): 58-65.

12- Ding Y, Li J, Luan X, Ding YH, Lai Q, Rafols J, et al. Exercise pre-conditioning reduces brain damage in ischemic rats that may be associated with regional angiogenesis and cellular overexpression of neurotrophin. Neurosci 2004; 124(3): 583-91.

13- Ang ET, Wong PT, Moochhala S, Ng Y. Neuroprotection associated with running: Is it a result of increased endogenous neurotrophic factors? Neurosci 2003; 118: 335–45.

14- Olfert I, Mark Richard A, Howlett D, Wagner E, Ellen C, Breen D. Myocyte vascular endothelial growth factor is required for exercise-induced skeletal muscle angiogenesis. Am J Physiol 2010; 4: 1059-67.

15- Turner M, Cortney A, Stanley J, Watson H. The fibroblast growth factor family: Neuro modulation of affective behavior. Neuron 2012; 76(1): 160-74.

16- Ding YH, Young CN, Luan X, Li J, Rafols JA, Clark JC, et al. Exercise preconditioning ameliorates inflammatory injury in ischemic rats during reperfusion. Acta Neuropathol 2005; 109(3): 237-46.

17- Li J, Luan X, Clark JC. Neuroprotection against transient cerebral ischemia by exercise pre-conditioning in rats. Neurol Res 2004; 26: 404-8.

18- Stummer W, Weber K, Tranmer B. Reduced mortality and brain damage after locomotor activity in gerbil forebrain ischemia. Stroke 1994; 25: 1862-9.

19- Wang CX, Yang T, Shuaib A. An improved version of embolic model of brain ischemic injury in the rat. J Neurosci Methods 2001;109(2):147-51.

20- Hu FB, Stampfer MJ, Colditz GA. Physical activity and risk of stroke in women. JAMA 2000; 283: 2961–7.

21- Bullitt E, Rahman F, Smith J, Kim E, Zeng D, Katz L, et al. The effect of exercise on the cerebral vasculature of healthy aged subjects as visualized by MR angiography. Am J Neuroradiol 2009; 30(10): 1857-63.

22- Xu B, Zhang X, Song C, Liang F, Zhang L. Voluntary running enhances hippocampal proliferation by increasing hippocampal NGF, BDNF, and IGF-1. Advan Biochem 2017; 5: 1-6.

23- Franzoni F, Federighi G, Fusi J, Cerri E, Banducci R, Petrocchi A, et al. Physical exercise improves total antioxidant capacity and gene expression in rat hippocampal tissue. Archiv Italien boil 2017; 155:1-10.

24- Dakhili AB, Gharakhanlou R, Movaheddin M, Khazani A, Keshavarz M. The effect of 6 weeks endurance training on gene expression of nerve growth factor (NGF) in the sensory spinal cord of rats with diabetic neuropathy. Iran J Diabet Metabol 2014; 13(3): 263-271. (Persian)

25- Shahed A, Ravasi AA, Choubineh S, Khodadadi D. Effect of four weeks exercise prior preparation before alzheimer's induction on the levels of nerve growth factor and beta amyloid in the hippocampus of wistar male rats. Arak Med Univer J 2018; 20(128): 56-66. (Persian)

26- Shamsaei N, Rajabi H, Aboutaleb N. Exercise preconditioning reduces spatial memory disorder induced by cerebral ischemia via increasing the expression of neurotrophins in rat hippocampus. Sport Physiol 2017; 9(34): 63-78. (Persian)

27- Chae CH, Lee HC, Jung SL, Kim TW, Kim JH, Kim NJ, et al. Swimming exercise increases the level of nerve growth factor and stimulates neurogenesis in adult rat hippocampus. Neurosci 2012; 212:30-7.

28- Jiang P, Dang R, Li H, Zhang L, Zhu WY, Xue Y, Tang MM. The impacts of swimming exercise on hippocampal expression of neurotrophic factors in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. Evid Based Compl Alternat Med 2014; 729827: 1-8.

29- Kuipers SD, Bramham CR. Brain-derived neurotrophic factor mechanisms and function in adult synaptic plasticity: new insights and implications for therapy. Curr Opin Drug Discov Devel 2006; 9(5):580-6.

30- Cohen-Cory S, Kidane AH, Shirkey NJ, Marshak S. Brain-derived neurotrophic factor and the development of structural neuronal connectivity. Dev Neurobiol 2010; 70(5):271-88.

31- McKernan DP, Timothy DG, John CF. "Killing the Blues": a role for cellular suicide (apoptosis) in depression and the antidepressant response? Progress Neurobiol 2009; 88:246-63.

32- Chao CC, Ma YL, Lee EHY. Brain-derived neurotrophic factor enhances bcl-xl expression through protein kinase casein kinase2-activated and nuclear factor kappa B-mediated pathway in rat hippocampus. Brain Pathol 2010; 21:150-62.

33- Fathollahi shoorabeh F, Faramarzi M, Hemmati R, Nuri R. The effects of ten weeks resistance training on resting levels of some angiogenesis factors among men with prostate cancer. Yafte 2017; 19(4):129-39. (Persian)

34- Myllyharju J, Koivunen P. Hypoxiainducible factor prolyl 4-hydroxylases: common and specific roles. Biol Chem 2013; 394(4): 435-48.

35- Greer SN, Metcalf JL, Wang Y, Ohh M. The updated biology of hypoxia-inducible factor. EMBOJ 2012; 31(11): 2448-60.

36- Friedmann B, Frese F, Menold E, Bartsch P. Effects of acute moderate hypoxia on anaerobic capacity in endurance-trained runners. Eur J Appl Physiol 2007; 101(1): 67-73.

37- Zhang F, Wu Y, Jia J. Exercise preconditioning and brain ischemic tolerance. Neurosci 2011; 177: 170-6.

38- Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. Nat Rev Immunol 2011; 11(9): 607-15.

39- Jensen L, Bangsbo J, Hellsten Y. Effect of high intensity training on capillarization and presence of angiogenic factors in human skeletal muscle. J Physiol 2004; 557(Pt 2):571-82.

40- Mehri Alvar Y, Sayevand Z, Erfani Adab F, Heydari Moghadam R, Samavat Sharif MA, Karami S. The effects of five weeks' resistance training on some vascular growth factors in sedentary men. Sport Physiol 2016; 8(29): 15-30. (Persian)

Original Article

THE EFFECT OF ENDURANCE TRAINING ON GENE EXPRESSION OF NERVE AND FIBROBLAST GROWTH FACTORS IN THE HIPPOCAMPUS OF RATS AFTER BRAIN STROKE

Aghil Asa[1], Abdolhossein Taheri Kalani[2], Mahmoud Nikseresht[3]*

Received: 01 Oct, 2019; Accepted: 26 Dec, 2019

Abstract

***Background & Aims*:** Neurotrophic and growth factors are known to have positive effects on neuronal proliferation. However, findings on the effects of exercise training on these factors following brain stroke are limited. Thus, the aim of the present study was to investigate the effect of endurance training on gene expression of nerve growth factor (NGF) and fibroblast growth factor (FGF) in the hippocampus of rats after brain stroke.

***Materials & Methods*:** Twenty and one adult male Wistar rats (weighing 210-252 gr) were purchased and randomly divided into three groups: control, stroke, and stroke+ training groups. Stroke was induced by the occlusion of both common carotid arteries (CCA) for 45 minutes. The rats in the training group were run on a treadmill at speeds ranging from 18 to 30 meters per minute for 20 to 50 minutes per session, 5 days a week for 8 weeks. Forty eight hours after the last training session, rats were sacrificed and gene expression of NGF and FGF in the hippocampus were measured with the Real Time-PCR technique.

***Results*:** In comparison to the control group, stroke led to a significant decrease in gene expression of NGF ($p=0.0001$) and FGF ($p=0.0001$). Also, after brain stroke, endurance training resulted in a significant increase in gene expression of NGF ($p=0.001$) and FGF ($p=0.023$) in the hippocampus of rats.

***Conclusion*:** Based on the findings of this study, endurance training probably via up-regulation of neurotrophic and angiogenic factors could have therapeutic effects against ischemia-reperfusion induced injuries and decreased impairments induced by cerebral ischemia.

***Keywords*:** Brain stroke, Endurance training, Gene expression, NGF, FGF

Address: Department of Sport Sciences, Faculty of Humanities, Ilam Branch, Islamic Azad University, Ilam, Iran
Tel: +98 8432228075
Email: htaheriedu@gmail.com

SOURCE: STUD MED SCI 2020: 30(11): 923 ISSN: 1027-3727

[1] Master of Exercise Physiology, Department of Sport Sciences, Faculty of Humanities, Ilam Branch, Islamic Azad University, Ilam, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Sport Sciences, Faculty of Humanities, Ilam Branch, Islamic Azad University, Ilam, Iran. (Corresponding Author)
[3] Assistant Professor, Department of Sport Sciences, Faculty of Humanities, Ilam Branch, Islamic Azad University, Ilam, Iran