

The effect of Aerobic-Resistance Training on the Expression of miR-222 and cTnT, Cx43, Ki67 Genes, and Cardiomyocyte Proliferation in Pre-Pubertal, Young, and Old Male Rats

Bahman Mirzaei¹,
Azam Shahsavary²,
Mohammad Reza Fadaei Chafy³,
Sarah Rajabi⁴

¹ Professor of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Science, University of Guilan, Rasht, Iran

² PhD Student of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Science, University of Guilan, Rasht, Iran

³ Assistant Professor, Department of Physical Education and Sport Science, Faculty of Humanities, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

⁴ Associate Professor, Department of Cell Engineering, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran

(Received August 29, 2023; Accepted December 28, 2024)

Abstract

Background and purpose: The evidence indicates that exercise training can affect the heart's structure at the cellular-molecular levels. Therefore, this study aimed to investigate the effect of exercise training on miR-222 and the expression of cTnT, Cx43 genes, and cardiomyocyte proliferation in pre-pubertal, young adult, and old male rats.

Materials and methods: The number of 30 male Wistar rats in three age groups; 2 weeks as the pre-pubertal group, 8 weeks as the young group, and 96 weeks as the old group were randomly divided into two training groups (n=5), and control (n=5). Resistance training programs (resistance ladder, 3 days per week) and aerobic (treadmill running, 3 days per week) were performed for 6 weeks. The expression of miR-222 and Cx43, cTnT, and Ki67 genes were investigated by the Real Time-PCR method. One-way analysis of variance and Tukey's post hoc test were used ($P \leq 0.05$).

Results: The amount of BrdU protein by immunohistochemical method and Ki67 gene expression was significantly higher in the training groups than in the control groups in all three age groups: pre-pubertal, young adult, and old male rats ($P \leq 0.05$). miR-222 was significantly higher in the group of trained pre-pubertal than in the control group ($P=0.023$). The increase in cTnT gene expression in the pre-pubertal groups ($P=0.018$) and old rats ($P=0.015$) and the increase in Cx43 gene expression in the old rats group ($P=0.009$) was observed.

Conclusion: Aerobic-resistance training can be an effective stimulus to increase cardiomyocyte proliferation in all three age groups pre-pubertal, young, and old.

Keywords: immunohistochemistry, BRdU, Ki67, cardiomyogenesis, aerobic-resistance

J Mazandaran Univ Med Sci 2024; 33 (229): 1-13 (Persian).

Corresponding Author: Azam Shahsavary - Faculty of Physical Education and Sport Science, University of Guilan, Rasht, Iran. (E-mail: it.shahsavary@yahoo.com)

اثر تمرین هوازی-مقاومتی بر بیان miR-222 و ژن‌های Ki67، Cx43، cTnT و تکثیر کاردیومیوسیت‌های موش‌های صحرائی نر قبل از بلوغ، جوان و سالمند

بهمن میرزایی^۱اعظم شهنسوازی^۲محمدرضا فدائی چافی^۳سارا رجبی^۴

چکیده

سابقه و هدف: قلب توانایی محدودی در بازسازی و احیای خود از طریق تقسیم سلولی، تمایز سلول‌های بنیادی و فعال‌سازی سلول‌های پیش‌ساز قلبی دارد و کاهش کاردیومیوسیت‌ها حتی به میزان اندک می‌تواند عملکرد قلب را تحت تاثیر قرار دهد، بنابراین وجود تعادل بین کاهش و تشکیل کاردیومیوسیت‌های جدید در تمام دوران زندگی برای حفظ عملکرد قلبی بسیار ضروری است. شواهد حاکی از آن است که فعالیت ورزشی می‌تواند ساختار قلبی را در سطح سلولی-مولکولی تحت تاثیر قرار دهد، لذا هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر تمرین هوازی-مقاومتی بر بیان miR-222 و ژن‌های cTnT، Cx43، Ki67 و تکثیر کاردیومیوسیت‌های موش‌های صحرائی نر قبل از بلوغ، جوان و سالمند بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، تعداد ۳۰ سر موش صحرائی نر نژاد ویستار در سه رده سنی ۲ هفته‌گی به‌عنوان گروه قبل از بلوغ، ۸ هفته‌گی به‌عنوان گروه جوان و ۹۶ هفته‌گی به‌عنوان گروه سالمند، به‌طور تصادفی به دو گروه تمرین (n=۵) و کنترل (n=۵) تقسیم شدند. برنامه‌های تمرین مقاومتی (نردبان مقاومتی، ۳ روز در هفته) و هوازی (دویدن روی نوارگردان، ۳ روز در هفته) به مدت ۶ هفته اجرا شد. بیان miR-222 و ژن‌های cTnT، Cx43 و Ki67 به روش Real Time-PCR مورد بررسی قرار گرفت. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها، آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی ($P \leq 0.05$) استفاده شد.

یافته‌ها: مقادیر پروتئین BrdU با روش ایمونوهیستوشیمی و بیان ژن Ki67 در هر سه رده سنی قبل از بلوغ، جوان و سالمند موش‌های تمرین کرده به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از گروه‌های کنترل بود ($P \leq 0.05$). miR-222 گروه تمرین کرده قبل بلوغ، نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری بیش‌تر بود ($P = 0.023$). افزایش بیان ژن cTnT در گروه‌های تمرین کرده قبل بلوغ ($P = 0.018$) و سالمند ($P = 0.015$) و افزایش بیان ژن Cx43 در گروه تمرین کرده سالمند ($P = 0.009$) مشاهده شد.

استنتاج: انجام تمرینات هوازی-مقاومتی می‌تواند محرک موثری برای افزایش تکثیر کاردیومیوسیت‌ها در هر سه رده سنی قبل از بلوغ، جوان و سالمند در موش‌های صحرائی باشد.

واژه‌های کلیدی: ایمونوهیستوشیمی، برمودی اکسی‌یوریدین، کاردیومیوژنز، Ki67، هوازی-مقاومتی

E-mail: it.shahsavary@yahoo.com

مؤلف مسئول: اعظم شهنسوازی - گیلان: رشت، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه گیلان

۱. استاد، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۲. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۳. استادیار، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

۴. دانشیار، گروه زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده فناوری نانو زیست مواد، تهران، ایران

© تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۶/۷ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۲/۹/۹ تاریخ تصویب: ۱۴۰۲/۱۰/۱۳

مقدمه

قلب توانایی محدودی در بازسازی و احیای خود از طریق تقسیم سلولی، تمایز سلول‌های بنیادی (Stem Cells) و فعال‌سازی سلول‌های پیش‌ساز قلبی (Cardiac Progenitor Cells; CPCs) دارد (۱) و کاهش کاردیومیوسیت‌ها (Cardiomyocytes) حتی به میزان اندک ۲۳ در ۱۰ هزار سلول می‌تواند عملکرد قلب را تحت تاثیر قرار دهد (۲)، بنابراین وجود تعادل بین کاهش و تشکیل کاردیومیوسیت‌های جدید در تمام دوران زندگی برای حفظ عملکرد قلبی بسیار ضروری است (۳). پس از طی روند تکاملی، رشد و گذر از مرحله قبل از بلوغ به جوانی و با وارد شدن به مرحله سالمندی، سلول‌های قلبی در معرض کوتاه شدن تلومر (Telomere) و آپوپتوز قرار می‌گیرند (۴). در کنار این تغییرات فیزیولوژیکی مرتبط با افزایش سن، بیماری‌هایی مانند ایسکمی میوکارد، هایپرتروفی پاتولوژیک قلب و اختلالات متابولیک همراه با عوامل ژنتیکی و محیطی نیز به‌طور چشمگیری بر تعداد کاردیومیوسیت‌ها و تمایز سلول‌های بنیادی قلبی تاثیر می‌گذارد (۵). تصور بر این است که احتمالاً کاردیومیوسیت‌های موجود، سلول‌های بنیادی قلب (Cardiac Stem Cells; CSCs) یا سلول‌های پیش‌ساز قلبی در صورت وجود محرک یا مهیا شدن شرایط، فعال شده و تمایز می‌یابند و در نهایت جایگزین می‌شوند و هموستاز عملکرد حفظ می‌شود و احتمالاً با افزایش تکثیر کاردیومیوسیت‌ها از تغییر شکل بافت قلبی و در صورت وقوع آسیب، از گسترش آسیب قلبی جلوگیری به عمل می‌آید (۶). بنابراین افزایش ظرفیت تکثیری کاردیومیوسیت‌ها در حد مطلوب، ممکن است به‌عنوان یک راهکار جدید در کنار دیگر عوامل موثر در سلامت قلب، برای بهبود ساختار و ظرفیت عملکردی قلب موثر باشد. در همین راستا شواهد رو به رشدی نشان می‌دهد فعالیت ورزشی، با توجه به نوع، شدت و مدت می‌تواند ظرفیت تکثیری بسیار محدود قلب که در حالت طبیعی در حدود ۱ تا ۳ درصد در سال است و با

افزایش سن نیز کاهش می‌یابد را تحت تاثیر قرار داده و احتمالاً با تشکیل کاردیومیوسیت‌های جدید، سبب رشد فیزیولوژیک قلب شود (۸،۷). با فرض درستی آن، این نتایج به فرضیه‌ای ختم می‌شود که اگر مداخله‌ای در طی تمام مراحل زندگی تکثیر کاردیومیوسیت‌ها را در حد مطلوب افزایش دهد، موجب رشد فیزیولوژیک قلبی و بهبود ساختار عضله قلبی می‌شود.

بررسی نتایج تعدادی از مطالعات نشان داده‌اند، انجام تمرینات ورزشی از طریق فعال‌سازی برخی مسیرهای پیام‌رسانی مانند: محور IGF-PI3K-Akt، C/EBPb-Cited4، نروگولین-۱ و افزایش برخی MicroRNAها به‌خصوص miR-23a، miR-222 و miR-17-3p می‌تواند سبب افزایش تکثیر کاردیومیوسیت‌ها شود (۹،۱۰).

در همین راستا Yuan و همکاران (۲۰۲۳) نشان دادند ۱۲ هفته تمرین هوازی با افزایش بیان ژن‌های کاردیومیوژنزی ErBβ4، Gata4، (GATA Binding Protein 4)، NRG1 (Neuregulin-1) می‌تواند سبب افزایش تکثیر کاردیومیوسیت‌ها، بهبود ساختار و عملکرد قلبی موش‌های جوان شود (۱۱). Lerchenmüller و همکاران (۲۰۲۲) نشان دادند ۸ هفته تمرین هوازی دوییدن اختیاری روی تردمیل می‌تواند سبب افزایش تکثیر کاردیومیوسیت‌ها و هایپرتروفی در قلب موش‌های سالمند شود (۱۲). براساس مطالعه Vujic و همکاران (۲۰۱۸) تمرینات استقامتی علاوه بر بهبود عملکرد و ساختار قلبی، سبب افزایش تشکیل کاردیومیوسیت‌های جدید در موش‌های جوان سالم و مبتلا به سکنه قلبی گردید، به‌طوری که میزان کاردیومیوژنز در موش‌های صحرایی فعال سالم ۴/۵ برابر بیش‌تر از موش‌های صحرایی بی تحرک بود (۲). Waring و همکارانش (۲۰۱۴) گزارش کردند تکثیر کاردیومیوسیت‌ها در قلب موش‌های صحرایی که به‌مدت ۴ هفته با دو شدت پایین (۵۵ تا ۶۰ درصد VO2max) و بالا (۸۵ تا ۹۰ درصد VO2max) به

تمرین پرداخته بودند، به طور معنی داری افزایش یافت، این تغییرات در گروه شدت بالا بارزتر بود (۱۳).
 کاردیومیوسیت های بالغ را می توان با مشاهده بیان پروتئین های تنظیمی و ساختاری قلب مانند ایزوفرم های تروپونین قلبی T (cardiac troponin T; cTnT) شناسایی کرد. تروپونین T به کمپلکس تروپومیوزین متصل می شود و در تنظیم انقباض عضله قلبی نقش دارد (۱۴).
 نتایج مطالعه Tian و همکاران در سال ۲۰۱۸ نشان داد ۴ هفته تمرین مقاومتی باعث افزایش معنی دار ژن های مرتبط با چرخه سلولی (Cyclin-dependent kinase 4) مرتبط با چرخه سلولی CyclinD1، CDK4 و cTnT در بافت قلب موش های مبتلا به سکته قلبی می شود (۱۵).

همچنین از مهم ترین ساختارهای کاردیومیوسیت ها اتصالات شکاف دار (gap-Junction) هستند که برای حفظ یکپارچگی انقباضات در عضله قلبی و انتقال تحریک الکتریکی بسیار ضروری می باشند. این اتصالات بین سلولی، مجاری بین کاردیومیوسیت های مجاور را تشکیل می دهند و از زیر واحدهایی به نام پروتئین کانکسین (Connexin) تشکیل شده اند که امکان ارتباط بین کاردیومیوسیت ها را به خوبی فراهم می کند. در قلب ۳ ایزوفرم از پروتئین کانکسین Cx40، Cx43 و Cx45 وجود دارد که Cx43 فراوان ترین نوع ایزوفرم در بطن است. در خصوص ارتباط بین فعالیت ورزشی و Cx43 قلب اطلاعات محدودی در دسترس است (۱۶، ۱۷).
 Coscarella و همکاران (۲۰۲۲) نشان دادند، در پاسخ به تمرینات ورزشی مقادیر Cx43 افزایش می یابد و بهبود در هدایت الکتریکی کاردیومیوسیت ها رخ می دهد (۱۸). در مقابل Ferreira و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند یک سال تمرین هوازی تغییر معنی داری در بیان ژن Cx43 در بطن راست و چپ موش های Sprague-Dawley ایجاد نمی کند (۱۹).

MicroRNA ها (miRNAs and miRs) قطعات کوچک RNA های غیر کدکننده ای به طول ۱۸ تا ۲۲ نوکلئوتید هستند. آن ها نقش مهمی در تکثیر سلولی، آپوپتوز، متابولیسم سلولی و... از طریق تنظیم فعالیت

ژن ها بر عهده دارند. microRNAs های متعددی عملکرد قلبی را در شرایط مختلف تحت تاثیر قرار می دهند (۲۰).
 نتایج برخی مطالعات نشان داده اند، miR-222 می تواند نقش مهمی در فرایندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی قلب در پاسخ به تمرینات ورزشی ایفا نماید. در همین راستا نتایج تحقیق Liu و همکاران (۲۰۱۵) نشان داد، میزان بیان miR-222 قلبی موش های صحرایی در هر دو مدل ورزش استقامتی شنا و دوی داوطلبانه به طور معنی داری افزایش یافته بود (۲۱). Horak و همکاران (۲۰۱۸) در پژوهشی، تاثیر سه نوع مدل تمرینی را به مدت ۸ هفته بر سطوح پلاسمایی miR-16، miR-21، miR-93 و miR-222 مردان جوان، مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که سطح پلاسمایی miRNAs در هر سه مدل تمرینی نسبت به قبل شروع پروتکل تمرین افزایش معنی داری داشتند (۲۲). اگرچه چندین مطالعه microRNAs را که از طریق ورزش تنظیم می شوند را مورد بررسی قرار داده اند؛ اما اطلاعات کمی در مورد نقش های عملکردی آن ها در پاسخ به تمرینات ورزشی به دست آمده است.

همچنین نشان داده شده است نوع، شدت و مدت تمرینات ورزشی برای توسعه اثرات آن ها بسیار ضروری هستند (۷). با توجه به مطالعات بررسی شده، تمرکز اکثر مطالعات تمرینات استقامتی بوده و تاثیر تمرینات هوازی-مقاومتی که در اکثر رشته های ورزشی استفاده از این نوع تمرین رایج است، بر تکثیر سلول های قلبی کم تر مورد مطالعه قرار گرفته است، هم چنین تمرکز محققین در ارتباط تاثیر تمرینات ورزشی بر یک گروه سنی یا دو گروه سنی، عمدتاً جوان و یا سالمند بوده است. با توجه اهمیت دوران رشد و دوران کودکی، به نظر می رسد در این زمینه با توجه به گستردگی این حوزه اطلاعات محدودی در دسترس است و شناخت عوامل موثر بر فعال سازی، تکثیر و تشکیل کاردیومیوسیت ها در سنین مختلف هنوز نیازمند تحقیق و بررسی های بیش تر است. بنابراین هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر تمرین هوازی-مقاومتی بر بیان miR-222 و ژن های cTnT،

Ki67، Cx43 و تکثیر کاردیومیوسیت‌های موش‌های صحرایی نر قبل از بلوغ، جوان و سالمند بود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش تعداد ۳۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در سه رده سنی، با سن ۲ هفتگی با میانگین وزنی $(29/90 \pm 1/96)$ گرم به‌عنوان گروه قبل از بلوغ ($n=10$)، با سن ۸ هفتگی با میانگین وزنی $(153/70 \pm 5/63)$ گرم به‌عنوان گروه جوان ($n=10$) و با سن ۹۶ هفتگی با میانگین وزنی $(324/90 \pm 19/88)$ گرم به‌عنوان گروه سالمند ($n=10$) از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. این حیوانات در شرایط مطلوب و یکسان از نظر دمای کنترل شده محیطی با دمای 23 ± 2 درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۴۵ تا ۵۵ درصد و چرخه تاریکی-روشنایی ۱۲:۱۲ ساعت با دسترسی آزاد به آب و غذای ویژه موش‌ها، به صورت گروه‌های ۵ تایی در قفس‌های پلی‌کربنات شفاف نگهداری شدند.

پس از یک هفته آشنایی با محیط آزمایشگاه، موش‌های صحرایی در هر رده سنی، به‌طور تصادفی به دو گروه کنترل و تمرین تقسیم شدند و در ۶ گروه ($n=5$) شامل گروه کنترل قبل از بلوغ (2W)، گروه تمرین کرده قبل از بلوغ (2W+EXE)، گروه کنترل جوان (8W)، گروه تمرین کرده جوان (8W+EXE)، گروه کنترل سالمند (96W)، گروه تمرین کرده سالمند (96W+EXE) مورد مطالعه قرار گرفتند. طول مدت تمرین هوازی-مقاومتی در این پژوهش، برای جلوگیری از تداخل سنی گروه‌های سنی قبل بلوغ و گروه جوان، ۶ هفته در نظر گرفته شد.

گروه‌های تمرین در هر سه رده سنی موش‌های صحرایی، برنامه‌های تمرینی هوازی و مقاومتی را به مدت ۶ هفته به صورت زیر اجرا کردند: برنامه تمرینی مقاومتی در پژوهش حاضر، شامل بالا رفتن از یک نردبان ۲۶ پله‌ای با طول ۱۱۰ cm با زاویه ۸۵ درجه نسبت به سطح افق بود که سه روز در هفته (در روزهای مجزا از تمرین هوازی) با بستن وزنه به قاعده دم موش‌ها انجام

شد. قبل از شروع برنامه تمرین مقاومتی، موش‌های صحرایی با نحوه بالا رفتن از نردبان بدون اعمال مقاومتی آشنا شدند. در هفته اول، صعود از نردبان با وزنه‌ای معادل ۳۰ درصد وزن بدن آغاز شد و به تدریج در هفته دوم به ۷۰ درصد وزن بدن، در هفته سوم به ۱۰۰ درصد وزن بدن، در هفته چهارم به ۱۲۰ درصد وزن بدن و در هفته پنجم به ۱۴۰ درصد وزن بدن موش‌ها افزایش یافت و تا پایان هفته ششم تمرین با این شدت ثابت ماند. هر جلسه تمرین مقاومتی شامل ۳ ست ۴ تکرار، با فاصله استراحتی ۲ دقیقه بین ست‌ها و ۳۰ ثانیه استراحت بین تکرارها بود. هر هفته و قبل از انجام تمرین مقاومتی در هر جلسه تمرینی، وزن موش‌ها با ترازو دیجیتالی دقیق، اندازه‌گیری شد و با توجه به شدت تمرین در هفته مورد نظر، وزنه مناسب که درصدی از وزن بدن موش‌ها بود، جهت اعمال مقاومت به کار برده شد. برای انجام مراحل گرم کردن و سرد کردن، دو بار بالا رفتن از نردبان بدون اعمال وزنه قبل و بعد از هر جلسه تمرین مقاومتی انجام می‌شد، هم‌چنین برای تحریک به منظور انجام تمرین‌ها، از لمس کردن و مالیدن دم موش‌ها استفاده شد (۲۳).

برنامه تمرین هوازی در پژوهش حاضر، سه روز در هفته (در روزهای مجزا از تمرینات مقاومتی) بود که به مدت ۶ هفته اجرا شد. به منظور اجرای برنامه تمرین هوازی، موش‌های صحرایی بعد از سه روز آشنایی با نحوه فعالیت بر روی نوارگردان، هر جلسه به مدت ۳۰ دقیقه، بر روی نوارگردان مخصوص جوندگان (تجهیز گستر ایرانیان ۲۰۱۶) با شیب صفر درجه می‌دویدند. شدت تمرین هوازی در هفته اول پروتکل تمرین معادل ۲۵ درصد حداکثر سرعت موش‌های صحرایی بود که این شدت به تدریج در هفته ششم به ۵۰ درصد حداکثر سرعت رسید. خارج از زمان اصلی فعالیت تمرینی، ۵ دقیقه برای گرم کردن و ۵ دقیقه زمان برای سرد کردن موش‌های صحرایی در نظر گرفته شد (۲۴).

۲۴ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرین، به منظور نشان‌دار کردن سلول‌های در حال تکثیر، برومو دی‌اکسی یوریدین (BrdU) در دوزی معادل ۱۰۰

کیت‌های مخصوص (سیناکلون، شماره کاتالوگ: ۷۹۳۰۶، K1۶۲۲، ۴۳۰۹۱۵۵)، طبق دستورالعمل شرکت سازنده، با استفاده از روش کمی qReal-Time PCR، با دستگاه Real-time PCR در طی مراحل استخراج RNA، سنتز cDNA، طراحی پرایمر (جدول شماره ۱) و واکنش‌های PCR اندازه‌گیری شد.

جدول شماره ۱: پرایمرهای مورد استفاده در روش Real-Time PCR

ژن ها	توالی
r-Cx43 R	CCA CAC AGA GAG AGA GGG CT
r-Cx43 F	CCC GAG GCT GAC CAA GAA
r-cTnT F	GCG GAA GAG TGG GAA GAG ACA
r-cTnT R	CCA CAG CTC CTT GGC CTT CT
r-ki67 F	AGGAAAGTAGATAGGAAGGAAG
r-ki67 R	AGGGAGTGGTGATAGAAAGAG
stem-loop mir-222-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTA TTCGCACTGGATACGACACCCAG
Forward miR-222-3p	CGGCGGAGCTACATCTGGCTA
Universal Reverse Primer of miRNAs	CCAGTGCAGGGTCCGAGGTA
r-U6 F	TGCTTCGGCAGCACATATAC
r-U6 R	AGGGGCCATGCTAATCTTCT
rGap R	CAT ACT CAG CAC CAG CAT CAC C
rGap F	AAG TTC AAC GGC ACA GTC AAG G

به منظور استخراج RNA، ابتدا ۵۰ میلی گرم از نمونه با استفاده از دستگاه هموژنایزر کاملاً لیز شدند و به میکروتیوپ‌های ۲ میلی لیتری که روی یخ قرار داشتند، انتقال داده شد. به هر نمونه ۳۰۰ میکرولیتر محلول ترایزول جهت از بین بردن آنزیم‌ها و لیپیدهای موجود در غشا اضافه شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم جهت تکمیل فرایند لیز شدن سلول‌ها و آزادسازی فاز آبی محصور شده به آن اضافه شد. در این مرحله مایع شفاف قسمت بالایی لوله، با دقت به وسیله سمپلر برداشته، به اندازه‌ی برابر با آن، ایزوپروپانول اضافه شد و تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد قرار گرفت.

قبل از ورود به مرحله سنتز cDNA، خلوص و غلظت RNA استخراج شده مورد بررسی قرار گرفت. طراحی پرایمرها براساس اطلاعات ژن‌های فوق، در بانک ژنی NCBI انجام شد. از GAPDH به عنوان ژن کنترل استفاده گردید. برای آماده‌سازی پرایمرها، بر

میلی گرم در هر کیلوگرم از وزن بدن به صورت درون صفاقی (ip)، در دو نوبت، با فاصله زمانی ۴ ساعت به تمام موش‌های صحرایی تزریق شد (۲۵).

۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، (۱۷ ساعت بعد از دومین تزریق BrdU) موش‌های صحرایی بعد از وزن‌کشی، با تزریق کتامین (۷۰ میلی گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی گرم/کیلوگرم) بیهوش شدند. پس از بیهوشی و اطمینان از عدم هوشیاری، خون‌گیری به صورت مستقیم از بطن چپ انجام شد و در محیطی کاملاً استریل با استفاده از تیغ جراحی و ایجاد برش در قسمت قدامی سینه، قلب موش‌های صحرایی استخراج شد. بلافاصله بخشی از بافت قلب برای آزمایش‌های سلولی و مولکولی در نیتروژن مایع، منجمد و در فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. بخش دیگری از بافت قلب نیز برای انجام روش ایمونوهیستوشیمی داخل فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفت.

در این پژوهش ارزیابی تکثیر سلولی با نشان‌دار کردن کاردیومیوسیت‌ها با نشان‌گر آنتی BrdU به روش ایمونوهیستوشیمی انجام شد. در این روش قسمتی از بافت بطن چپ بعد از طی مراحل تثبیت، آبگیری و شفاف‌سازی با پارافین آغشته گردید و با قالب‌گیری بلوک‌های پارافینی از بافت بطن چپ تهیه و پس از انجماد، برش‌هایی به ضخامت ۵ تا ۱۰ میکرون توسط دستگاه میکروتوم داده شد. پس از پارافین زدایی، شفاف‌سازی و آب‌دهی، برای رنگ‌آمیزی، برش‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در داخل رنگ همتاکسیلین قرار گرفتند، سپس با آب جاری شستشو و بعد در آئوزین به مدت ۱۰ ثانیه قرار گرفتند. با این روش، هسته سلول رنگ بنفش و سیتوپلاسم رنگ صورتی به خود گرفت. در مرحله آخر نمونه‌ها توسط میکروسکوپ فلوروسنت و با لنز ۴۰۰ مورد بررسی و مشاهده قرار گرفتند. به منظور شمارش سلول‌های در حال تکثیر در یک میلی‌متر بافت بطن چپ، از نرم‌افزار Image J (Maryland, USA) استفاده شد.

بیان ژن‌های cTnT, Cx43, Ki67 با استفاده از

یافته‌ها

نتایج مربوط به ویژگی‌های توصیفی متغیرها در جدول شماره ۲ قابل مشاهده است.

در این پژوهش برای ارزیابی تکثیر کاردیومیوسیت‌ها از نشان‌گر برون‌زاد BrdU استفاده شد. سلول‌های در حال تکثیر با نشان‌گر BRDU در بافت بطن چپ موش‌های صحرایی به دلیل واکنش آنتی ژن با آنتی بادی مربوطه، با رنگ قرمز در تصاویر نمودار شماره ۱ قابل مشاهده است. بررسی نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده گروه‌های کنترل و تمرین نشان داد، میزان پروتئین BrdU در بافت بطن چپ هر سه گروه تمرین کرده قبل بلوغ، جوان و سالمند نسبت به گروه‌های کنترل همتای خود افزایش یافته بود و ۶ هفته تمرین هوازی-مقاومتی سبب افزایش حضور این پروتئین در هسته سلول‌های کاردیومیوسیت‌های در حال تکثیر در هر سه دوره سنی قبل بلوغ، جوان و سالمند شده بود.

پروتئین BrdU در هسته سلول‌های در حال تکثیر توسط نرم‌افزار Image J ارزیابی شد و به صورت نمودار درآمد که در بخش D نمودار شماره ۱ نشان داده شده است. میزان پروتئین BrdU به دنبال ۶ هفته تمرین هوازی-مقاومتی در گروه‌های تمرین نسبت به گروه‌های کنترل در هر سه رده سنی قبل بلوغ، بلوغ و سالمندی افزایش معنی‌داری داشت ($P \leq 0/05$). این افزایش در گروه‌های، قبل بلوغ ($2W+EXE$) ($P=0/001$) و جوان ($8W+EXE$) ($P=0/001$) بیش‌تر از گروه سالمند ($96W+EXE$) ($P=0/001$) نسبت به گروه‌های کنترل همتای خود بود.

اساس اطلاعات مربوط به هر پرایمر، حجم مشخص آب مقطر استریل، محلول مستر میکس و سایر گرین به تیوب‌های حاوی پرایمر اضافه شد. هر واکنش PCR، طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. ۴۰ سیکل برای هر چرخه Real-Time PCR در نظر گرفته شد. در نهایت نمودار منحنی ذوب جهت بررسی صحت واکنش‌های PCR انجام شده و به صورت اختصاصی برای هر ژن مورد ارزیابی قرار گرفت. برای اندازه‌گیری miR-222 نیز از روش Real-Time PCR استفاده شد و از پرایمر ژن U6 به عنوان ژن کنترل استفاده شد.

از شاخص‌های آمار توصیفی (میانگین و انحراف استاندارد) برای توصیف ویژگی‌های متغیرها استفاده شد. در بخش آمار استنباطی، برای ارزیابی طبیعی بودن داده‌ها، از آزمون شاپیرو-ویلک استفاده شد. پس از تایید وضعیت طبیعی بودن داده‌ها، برای بررسی معنی‌داری تفاوت میانگین متغیرهای گروه‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزارهای آماری SPSS26 و Prism5 انجام گرفت. سطح معنی‌داری آزمون‌های آماری $P \leq 0/05$ در نظر گرفته شد.

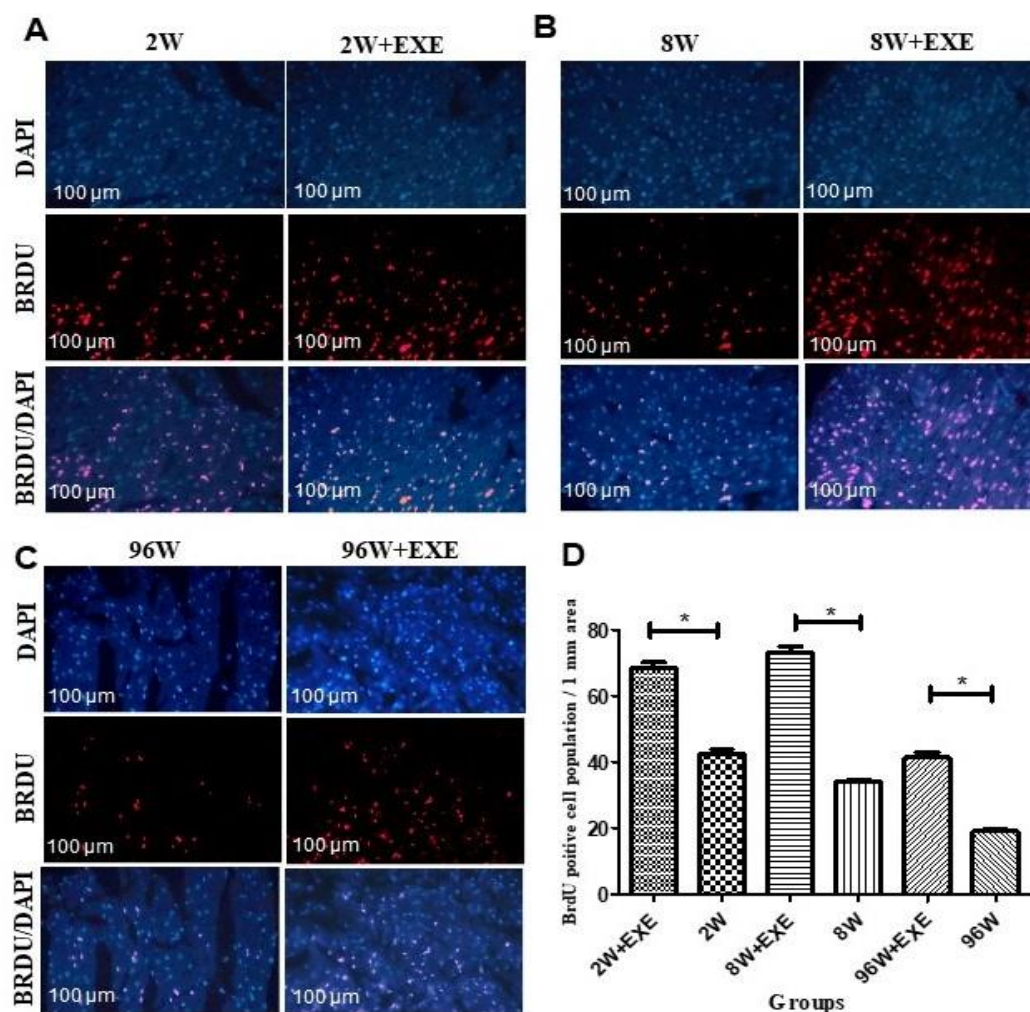
تمامی مراحل اجرایی پژوهش، مطابق با توصیه‌های مندرج در دستورالعمل انجمن ملی حمایت از حیوانات آزمایشگاهی انجام گرفت و پروتکل آزمایشگاهی این پژوهش توسط کارگروه اخلاق در پژوهش پژوهشگاه علوم ورزشی ثبت و توسط وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی مورد تایید قرار گرفت (کد کمیته اخلاق: IR.SSRC.REC.1400.077).

جدول شماره ۲: ویژگی توصیفی متغیرهای تحقیق

گروه (n=5)	2W+EXE	2W	8W+EXE	8W	96W+EXE	96W
BrdU	۶۸/۳۶ ± ۱/۸۹*	۴۲/۲۸ ± ۱/۵۹	۷۳/۰۲ ± ۱/۹۸*	۳۴/۰۴ ± ۰/۷۴	۴۱/۴۴ ± ۱/۵۰*	۱۹/۱۲ ± ۰/۷۱
Ki67	۱/۷۵ ± ۰/۱۶*	۰/۸۳ ± ۰/۰۷	۱/۶۲ ± ۰/۰۷*	۱/۰۰ ± ۰/۰۵	۱/۴۲ ± ۰/۲۰*	۰/۷۳ ± ۰/۰۹
cTnT	۲/۲۹ ± ۰/۲۸*	۱/۰۰ ± ۰/۱۳	۱/۵۶ ± ۰/۲۶	۱/۰۰ ± ۰/۱۹	۲/۳۳ ± ۰/۲۵*	۱/۰۰ ± ۰/۲۱
Cx43	۱/۳۸ ± ۰/۱۸	۱/۰۰ ± ۰/۱۹	۱/۵۱ ± ۰/۳۱	۱/۰۰ ± ۰/۳۰	۲/۸۲ ± ۰/۴۴*	۱/۰۰ ± ۰/۲۲
Mir-222	۲/۶۳ ± ۰/۲۷*	۱/۰۰ ± ۰/۲۲	۱/۶۴ ± ۰/۴۶	۱/۰۰ ± ۰/۱۹	۲/۰۴ ± ۰/۳۷	۱/۰۰ ± ۰/۱۴

نتایج به شکل Mean±SD نشان داده شده‌اند.

*: تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل



نمودار شماره ۱: ارزیابی تکثیر کاردیومیوسیت‌ها توسط نشان‌گر برون‌زاد BrdU. در این رنگ‌آمیزی پروتئین BrdU به رنگ قرمز و هسته سلول‌ها به رنگ آبی قابل مشاهده است. برای آنالیز نتایج از رنگ‌آمیزی DAPI استفاده شده است. A: نمای میکروسکوپی نمونه‌های نشان‌دار شده با BrdU گروه کنترل و تمرین قبل بلوغ B: نمای میکروسکوپی نمونه‌های نشان‌دار شده با BrdU گروه کنترل و تمرین جوان C: نمای میکروسکوپی نمونه‌های نشان‌دار شده با BrdU گروه کنترل و تمرین سالمند D: نمودار تعداد کاردیومیوسیت‌های با نشان‌گر BrdU به تفکیک گروه‌های پژوهش داده‌ها به صورت میانگین و انحراف استاندارد نشان داده شده‌اند. سطح معنی‌داری ($P \leq 0.05$) در نظر گرفته شده است.

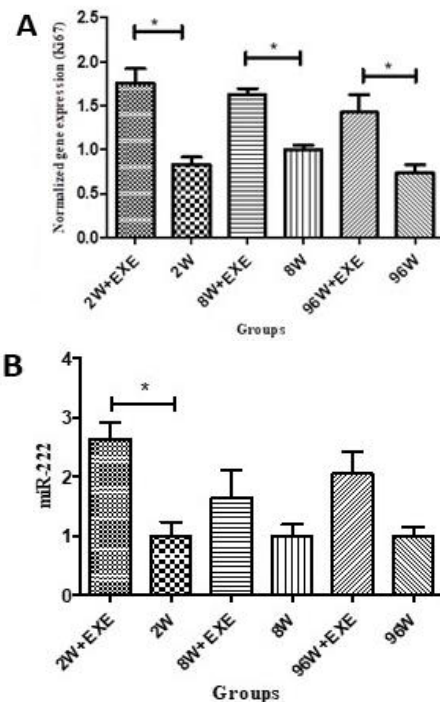
W: هفته، EXE: تمرین ورزشی *: تفاوت معنی‌دار

گروه‌های تمرین کرده افزایش یافته بود، بیشترین افزایش بیان ژن Ki67 در گروه موش‌های صحرایی تمرین کرده قبل بلوغ (2W+EXE) مشاهده شد ($P=0.002$).

اثر تمرین ورزشی هوازی-مقاومتی بر تغییرات miR-222 بافت بطن چپ موش‌های صحرایی به تفکیک گروه‌های تمرین و کنترل در نمودار شماره ۲ قسمت B نشان داده شده است. نتایج آزمون واریانس یک طرفه نشان داد به دنبال ۶ هفته تمرین هوازی-مقاومتی

برای ارزیابی تکثیر کاردیومیوسیت‌ها، نشان‌گر درون‌زاد Ki67 در بافت بطن چپ موش‌های صحرایی مورد بررسی قرار گرفت. میزان تغییرات بیان ژن Ki67 به تفکیک گروه‌های تمرین و کنترل در نمودار شماره ۲ قسمت A نشان داده شده است. بیان ژن Ki67 در هر سه گروه قبل بلوغ، جوان و سالمند به دنبال ۶ هفته تمرین هوازی-مقاومتی افزایش معنی‌داری داشت ($P \leq 0.05$). با توجه به این که بیان ژن Ki67 در هر سه رده سنی در

miR-222 در گروه موش‌های صحرایی تمرین کرده قبل بلوغ (2W+EXE) نسبت به گروه کنترل (2W) افزایش معنی‌داری یافته بود ($P=0/023$). در گروه‌های موش‌های صحرایی جوان (8W+EXE) و سالمند (96W+EXE) با این که بیان miR-222 افزایش یافته بود، اما این افزایش معنی‌دار نبود ($P>0/05$).

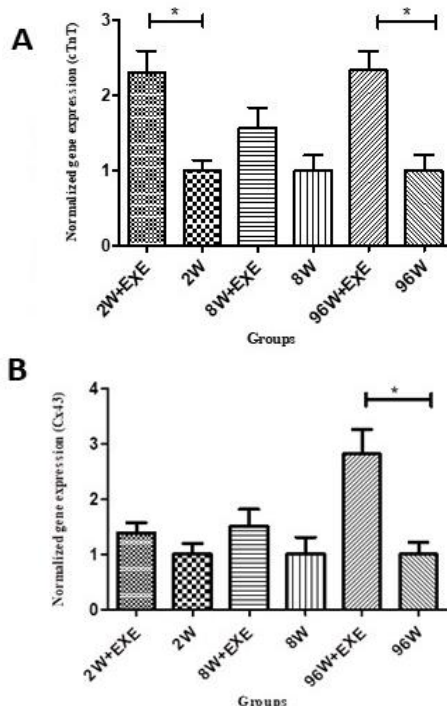


نمودار شماره ۲: A: تغییرات بیان ژن Ki67 و B: تغییرات بیان miR-222 در بافت بطن چپ موش‌های صحرایی به تفکیک گروه‌های تمرین و کنترل پس از ۶ هفته تمرین هوازی-مقاومتی. داده‌ها به صورت میانگین و انحراف استاندارد نشان داده شده‌اند. سطح معنی‌داری ($P\leq 0/05$) در نظر گرفته شده است. W: هفته، EXE: تمرین ورزشی؛ * تفاوت معنی‌دار

میزان تغییرات بیان ژن‌های cTnT و Cx43 بافت بطن چپ موش‌های صحرایی به تفکیک گروه‌های تمرین و کنترل در نمودار شماره ۳ نشان داده شده است. نتایج آزمون آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد، ۶ هفته تمرین هوازی-مقاومتی سبب افزایش بیان ژن cTnT در بافت بطن چپ موش‌های صحرایی تمرین کرده شده بود؛ اما این افزایش فقط در گروه‌های موش‌های

صحرایی قبل بلوغ (2W+EXE) ($P=0/018$) و سالمند (96W+EXE) ($P=0/015$) معنی‌دار بود.

تغییرات بیان ژن Cx43 بافت بطن چپ موش‌های صحرایی در قسمت B نمودار شماره ۳ قابل مشاهده است. مقادیر بیان ژن Cx43 در گروه‌های تمرین قبل بلوغ (2W+EXE) و جوان (8W+EXE) نسبت به گروه‌های کنترل هم‌تای خود افزایش داشتند؛ اما افزایش بیان ژن Cx43 در گروه تمرین کرده سالمند (96W+EXE) معنی‌دار بود و ۶ هفته تمرین هوازی-مقاومتی سبب افزایش مقادیر بیان ژن Cx43 در گروه تمرین سالمند شده بود. در طی دوران رشد از دوران قبل بلوغ تا سالمندی، تفاوتی بین میانگین‌های بیان ژن Cx43 در هر سه گروه قبل بلوغ، جوان و سالمند مشاهده نشد ($P>0/05$).



نمودار شماره ۳: A: تغییرات بیان ژن cTnT و B: تغییرات بیان Cx43 در بافت بطن چپ موش‌های صحرایی به تفکیک گروه‌های تمرین و کنترل پس از ۶ هفته تمرین هوازی-مقاومتی. داده‌ها به صورت میانگین و انحراف استاندارد نشان داده شده‌اند. سطح معنی‌داری ($P\leq 0/05$) در نظر گرفته شده است. W: هفته، EXE: تمرین ورزشی؛ * تفاوت معنی‌دار

بحث

قلب اولین ارگانی است که در مسیر تکامل شکل می گیرد. رشد قلب نیاز به مهاجرت دقیق، تکثیر سلولی و تمایز هزاران سلول مختلفی دارد که از منشاء جنینی مشتق شده اند. کاردیومیوسیت ها در دوران جنینی قابلیت تکثیر دارند. برای مدت طولانی تصور می شد، قلب پستانداران بالغ هیچ پتانسیلی برای بازسازی ندارد و کاردیومیوسیت ها بلافاصله بعد از تولد از چرخه سلولی خارج می شوند (۷، ۱)؛ اما نتایج مطالعات اخیر به خوبی نشان داده اند، فعالیت چرخه سلولی کاردیومیوسیت ها پس از تولد از بین نمی رود، بلکه کاهش قابل توجهی می یابد (۲۶). بر همین اساس هدف از مطالعه حاضر نیز، بررسی اثر تمرین ورزشی هوازی-مقاومتی بر بیان miR-222 و ژن های cTnT، Cx43، Ki67 و تکثیر کاردیومیوسیت های موش های صحرایی در دوران قبل بلوغ، جوانی و سالمندی بود.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد پس از گذشت ۶ هفته تکثیر کاردیومیوسیت های بافت بطن چپ موش های صحرایی نر در هر سه رده سنی قبل بلوغ، جوان و سالمند در مقایسه با گروه های کنترل همتای خود افزایش دارد و در اثر تمرینات هوازی-مقاومتی در روزهای متناوب، افزایش تکثیر کاردیومیوسیت ها مشاهده شد. یافته های این پژوهش با نتایج مطالعه Lerchenmüller و همکاران (۱۲)، Vujic و همکاران (۲)، Tian و همکاران (۱۵)، Asif و همکاران (۲۷) و Waring و همکاران (۱۳) همخوانی دارد.

هم راستا با نتایج مطالعه حاضر Lerchenmüller و همکارانش در سال ۲۰۲۳ نشان دادند ۸ هفته تمرین هوازی دویدن اختیاری روی تردمیل می تواند سبب افزایش تکثیر کاردیومیوسیت ها و هایپرتروفی در قلب موش های سالمند شود (۱۲). در مطالعه حاضر برای بررسی تکثیر کاردیومیوسیت ها از تکنیک سنجش تکثیر سلولی توسط نشان گر برونزاد BrdU و نشان گر تکثیری درونزاد Ki67 استفاده شد. BrdU در فاز S چرخه

سلولی وارد ساختار DNA می شود و با تیمیدین رقابت کرده و جایگزین آن می شود. تعداد کاردیومیوسیت های با نشان گر BrdU به عنوان سلول های در حال تکثیر در نظر گرفته شد. پروتئین Ki67 نیز در هسته سلول هایی که در فاز G1، S، G2 و میتوز قرار دارند، بیان می شود. میزان بیان ژن Ki67 نیز در این تحقیق به عنوان نشان گر تکثیری درونزاد در نظر گرفته شد. با این که در مطالعه Lerchenmüller و همکاران برای سنجش تکثیر سلولی قلب موش های C57 از نشان گر تکثیر سلولی 15N-thymidine استفاده شده بود، با وجود تفاوت در سن، نژاد، مدت تمرین و نوع پروتکل تمرینی و تکنیک های ارزیابی در هر دو تحقیق تکثیر کاردیومیوسیت ها در قلب موش های سالمند و در مطالعه حاضر علاوه بر موش های سالمند تکثیر کاردیومیوسیت ها در موش های نابالغ و جوان نیز مشاهده شد.

بر اساس نتایج پژوهش Vujic و همکاران در سال ۲۰۱۸ تمرینات استقامتی ۸ هفته ای علاوه بر بهبود عملکرد و ساختار قلبی، سبب افزایش تشکیل کاردیومیوسیت های جدید در موش های صحرایی جوان سالم و مبتلا به سکتة قلبی شد (۲)، که احتمالاً نشان از نقش بارز تمرینات استقامتی بر تشکیل کاردیومیوسیت های جدید دارد، به طوری که میزان کاردیومیوژنز در موش های صحرایی فعال سالم ۴/۵ برابر بیش تر از موش های صحرایی بی تحرک بود. برای سنجش تکثیر سلولی از نشان گر 15N-thymidine استفاده شده بود. هم چنین در این مطالعه با مهار miR-222- میکرو RNA که در پاسخ به تمرینات ورزشی سبب ایجاد پاسخ های کاردیومیوژنزی می گردد، کاردیومیوژنز نیز متوقف گردید. به نظر محققین این پژوهش، مهار miR-222، سبب افزایش برخی عوامل ضد تکثیری در کاردیومیوسیت ها مانند HIPK (Homeodomain Interacting Protein Kinase) می شود. بنابراین به نظر می رسد بیان miR-222 در کنار سایر عوامل، برای تشکیل کاردیومیوسیت های جدید ضروری باشد (۱۵). در مطالعه حاضر در گروه های

تمرین کرده جوان و سالمند با این که miR-222 نسبت به گروه‌های کنترل همتای خود افزایش داشت، اما این افزایش معنی‌دار نبود. احتمالاً از دلایل این ناهم‌سویی تفاوت در نوع پروتکل تمرینی، مدت و نژاد موش‌ها بوده است. از طرفی نشان داده شده است ظرفیت تکثیر و تشکیل کاردیومیوسیت‌های جدید در اوایل زندگی بالاتر از دوران دیگر زندگی است. در مطالعه حاضر پس از ۶ هفته تمرین هوازی-مقاومتی miR-222 در گروه موش‌های تمرین کرده قبل بلوغ افزایش معنی‌دار داشت. در همین راستا Liu و همکاران ۲۰۱۵ نشان دادند افزایش miR-222 سبب تکثیر کاردیومیوسیت‌ها از طریق مهار p27- مهار کننده چرخه سلولی- می‌شود و با بیان miR-222 نشان‌گرهای تکثیر کاردیومیوسیت و تعداد سلول‌ها نیز افزایش می‌یابد (۲۱). در مطالعه حاضر نیز هم‌راستا با افزایش miR-222، میزان بیان نشان‌گر تکثیری Ki67 در گروه موش‌های صحرایی تمرین کرده بالاتر بود.

با توجه به نوع، شدت و مدت تمرین در میان افراد با سن، جنس، وضعیت سلامتی و سابقه ورزشی مختلف، تاثیر تمرینات ورزشی بر میزان بیان ژن و پروتئین cTnT نیز متفاوت است (۱۴). در مطالعه حاضر به دنبال ۶ هفته تمرین هوازی-مقاومتی بیان ژن cTnT در گروه موش‌های صحرایی نابالغ و سالمند تمرین کرده افزایش یافته بود و گروه تمرین کرده جوان با این که بیان ژن cTnT افزایش یافته بود، اما این افزایش معنی‌دار نبود. هم‌راستا با این نتایج Tian و همکاران در سال ۲۰۱۸ نشان دادند ۴ هفته تمرین مقاومتی با فعال‌سازی مسیر پیام‌رسانی FSTL1-Akt-mTOR را در موش‌های جوان مبتلا به سکته قلبی به افزایش می‌دهد (۱۵). به نظر می‌رسد تمرین مقاومتی با فعال‌سازی محور FSTL1-Akt-mTOR و افزایش بیان ژن‌های مرتبط با چرخه سلولی CDK4 و CyclinD1 سبب افزایش تکثیر کاردیومیوسیت‌ها و cTnT در بافت قلب موش‌های مبتلا به سکته قلبی شده است.

کاردیومیوسیت‌ها از طریق کانکسین‌های اتصالات شکاف دار با هم در ارتباط هستند. کانکسین‌ها با تسهیل

انتقال پتانسیل عمل بین کاردیومیوسیت‌های مجاور نقش اساسی در حفظ یکپارچگی انقباض قلبی بر عهده دارند (۱۶، ۱۷). در مطالعه حاضر به دنبال ۶ هفته تمرین هوازی-مقاومتی بیان ژن Cx43 در بافت بطن چپ موش‌های صحرایی تمرین کرده سالمند افزایش یافت. در پژوهش Chondro و همکاران در سال ۲۰۱۳ به دنبال تمرینات هوازی دویدن روی تردمیل در دوره‌های زمانی ۴ هفته و ۱۲ هفته توسط موش‌های جوان بیان ژن Cx43 افزایش یافت و در دوره‌های بی‌تمرینی میزان بیان ژن Cx43 کاهش یافت (۲۸). در تحقیق حاضر به دنبال ۶ هفته تمرین هوازی-مقاومتی مقادیر بیان ژن Cx43 در گروه‌های تمرین قبل بلوغ و جوان نسبت به گروه‌های کنترل همتای خود افزایش داشتند؛ اما افزایش بیان ژن Cx43 در گروه تمرین کرده سالمند معنی‌دار بود. ناهم‌سو با یافته‌های این پژوهش، Ferreira و همکاران ۲۰۱۹ نشان دادند، ۵۴ هفته تمرین هوازی تغییر معنی‌داری در بیان ژن Cx43 در بطن راست و چپ موش‌ها ایجاد نمی‌کند. هم‌چنین در پژوهش آن‌ها تغییر معنی‌داری نیز در بیان سلول‌های بنیادی قلبی C-Kit مشاهده نشد (۱۹). از آنجایی که شدت تمرینات عامل مهمی در فراخوانی سلول‌های بنیادی و تکثیر کاردیومیوسیت‌ها و به تبع آن افزایش بیان ژن و پروتئین‌های مرتبط با بافت قلبی است، احتمالاً این نتایج به دلیل شدت پایین تمرین هوازی و یکسان بودن شدت در طول ۵۴ هفته تمرین بوده است. البته به نظر می‌رسد در خصوص تاثیر تمرینات ورزشی و Cx43 قلب اطلاعات محدودی در دسترس است و نیازمند تحقیق بیش‌تر است.

به‌طور کلی یافته‌های این پژوهش نشان داد احتمالاً تمرین هوازی-مقاومتی می‌تواند تاثیر مثبتی بر تکثیر کاردیومیوسیت‌ها در هر سه رده سنی قبل بلوغ، جوان و سالمند داشته باشد. با این که در طی مراحل رشد از تولد تا جوانی و از جوانی به سالمندی همراه با افزایش سن، از ظرفیت تکثیری کاردیومیوسیت‌ها هم در هر دو گروه کنترل و تمرین کاسته شد؛ اما در مقایسه با گروه‌های

کاردیومیوسیت‌ها پیشنهاد می‌گردد از تمرین ترکیبی هوازی-مقاومتی در سنین قبل بلوغ، جوانی و سالمندی برای افزایش تکثیر کاردیومیوسیت‌ها استفاده شود.

سپاسگزاری

این پژوهش مستخرج از رساله دکتری فیزیولوژی ورزشی دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه گیلان می‌باشد. از کلیه عزیزانی که ما را در انجام این پروژه یاری نمودند تقدیر و تشکر به عمل می‌آوریم.

کنترل، گروه‌های تمرین در هر سه رده سنی قبل بلوغ، جوان و سالمند از ظرفیت تکثیری بالاتری برخوردار بودند. همچنین متغیرهای miR-222 و بیان ژن‌های cTnT و Cx43 در گروه‌های تمرین در هر سه رده سنی افزایش یافتند، اگرچه در همه گروه‌ها این افزایش معنی‌دار نبود؛ اما هم راستا با افزایش تکثیر کاردیومیوسیت‌ها، سطوح این متغیرها نیز در بافت بطن چپ افزایش یافته بود. با در نظر گرفتن نتایج پژوهش حاضر در خصوص تاثیر تمرین ترکیبی هوازی-مقاومتی بر افزایش تکثیر

References

1. Cianflone E, Torella M, Chimenti C, De Angelis A, Beltrami AP, Urbanek K, et al. Adult cardiac stem cell aging: a reversible stochastic phenomenon? *Oxidative medicine and cellular longevity* 2019; 2019.
2. Vujic A, Lerchenmüller C, Wu TD, Guillermier C, Rabolli CP, Gonzalez E, et al. Exercise induces new cardiomyocyte generation in the adult mammalian heart. *Nature Communications* 2018; 9(1): 1659.
3. Fukuda K, Yuasa S. Stem cells as a source of regenerative cardiomyocytes. *Circulation Research* 2006; 98(8): 1002-1013.
4. Nakou E, Parthenakis F, Kallergis E, Marketou M, Nakos K, Vardas P. Healthy aging and myocardium: A complicated process with various effects in cardiac structure and physiology. *International Journal of Cardiology* 2016; 209: 167-175.
5. Rodgers JL, Jones J, Bolleddu SI, Vanthenapalli S, Rodgers LE, Shah K, et al. Cardiovascular risks associated with gender and aging. *J Cardiovasc Dev Dis* 2019; 6(2): 19.
6. Anversa P, Leri A. Innate regeneration in the aging heart: healing from within. *Mayo Clinic Proceedings*; 2013: Elsevier.
7. Shen L, Wang H, Bei Y, Cretoiu D, Cretoiu SM, Xiao J. Formation of new cardiomyocytes in exercise. *Adv Exp Med Biol* 2017; 999: 91-102.
8. Schüttler D, Clauss S, Weckbach LT, Brunner S. Molecular mechanisms of cardiac remodeling and regeneration in physical exercise. *Cells* 2019; 8(10): 1128.
9. Jiang J, Ni L, Zhang X, Chatterjee E, Lehmann HI, Li G, et al. Keeping the heart healthy: the role of exercise in cardiac repair and regeneration. *Antioxid Redox Signal* 2023; 39(16-18): 1088-1107.
10. Liu C, Wu X, Vulugundam G, Gokulnath P, Li G, Xiao J. Exercise Promotes Tissue Regeneration: Mechanisms Involved and Therapeutic Scope. *Sports Medicine-Open* 2023; 9(1): 27.
11. Yuan J, Xu B, Ma J, Pang X, Fu Y, Liang M, et al. MOTs-c and aerobic exercise induce cardiac physiological adaptation via NRG1/ ErbB4/CEBP β modification in rats. *Life Sci* 2023; 315: 121330.
12. Lerchenmüller C, Vujic A, Mittag S, Wang A, Rabolli CP, Heß C, et al. Restoration of cardiomyogenesis in aged mouse hearts by voluntary exercise. *Circulation* 2022; 146(5): 412-426.
13. Waring CD, Vicinanza C, Papalamprou A, Smith

- AJ, Purushothaman S, Goldspink DF, et al. The adult heart responds to increased workload with physiologic hypertrophy, cardiac stem cell activation, and new myocyte formation. *Eur Heart J* 2014; 35(39): 2722-2731.
14. Aengevaeren VL, Baggish AL, Chung EH, George K, Kleiven Ø, Mingels AM, et al. Exercise-induced cardiac troponin elevations: from underlying mechanisms to clinical relevance. *Circulation* 2021; 144(24): 1955-1972.
 15. Tian Z, Hao M, Xi Y. Resistance training activates the signaling pathway of FSTL1-Akt-mTOR and induces cardiomyocyte proliferation in rats with myocardial infarction. *China Sport Science* 2018; 38(3): 40-47.
 16. Jansen JA, van Veen TA, de Bakker JM, van Rijen HV. Cardiac connexins and impulse propagation. *J Mol Cell Cardiol* 2010; 48(1): 76-82.
 17. Lampe PD, Lau AF. The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(7): 1171-1186.
 18. Coscarella IL, Landim-Vieira M, Pinto JR, Chelko SP. Arrhythmogenic cardiomyopathy: exercise pitfalls, role of connexin-43, and moving beyond antiarrhythmics. *Int J Mol Sci* 2022; 23(15): 8753.
 19. Nogueira-Ferreira R, Ferreira R, Padrao AI, Oliveira P, Santos M, Kavazis AN, et al. One year of exercise training promotes distinct adaptations in right and left ventricle of female Sprague-Dawley rats. *J Physiol Biochem* 2019; 75(4): 561-572.
 20. Pang JKS, Phua QH, Soh BS. Applications of miRNAs in cardiac development, disease progression and regeneration. *Stem cell research & therapy* 2019; 10: 1-11.
 21. Liu X, Xiao J, Zhu H, Wei X, Platt C, Damilano F, et al. miR-222 is necessary for exercise-induced cardiac growth and protects against pathological cardiac remodeling. *Cell Metab* 2015; 21(4): 584-595.
 22. Horak M, Zlamal F, Iliev R, Kucera J, Cacek J, Svobodova L, et al. Exercise-induced circulating microRNA changes in athletes in various training scenarios. *PLoS One* 2018; 13(1): e0191060.
 23. Banaeifar A, Gorzi A, Hedayati M, Nabiollahi Z, Rahmani-Moghaddam N, Khantan M. Effect of an 8-week resistance training program on acetylcholinesterase activity in rat muscle. *Feyz Journal of Kashan University of Medical Sciences* 2012; 16(1): (Persian).
 24. Fadaei Chafy MR, Bagherpour Tabalvandani MM, Elmieh A, Arabzadeh E. Determining the range of aerobic exercise on a treadmill for male Wistar rats at different ages: A pilot study. *Journal of Exercise & Organ Cross Talk* 2022; 2(3): 96-100 (Persian).
 25. Lonek L, Puhova A, Griecsova-Kindernay L, Patel SP, Zohdi V, Jezova D, et al. Voluntary Exercise May Activate Components of Pro-Survival RISK Pathway in the Rat Heart and Potentially Modify Cell Proliferation in the Myocardium. *Physiol Res* 2019; 68(4): 581-588.
 26. Velayutham N, Alfieri CM, Agnew EJ, Riggs KW, Baker RS, Ponny SR, et al. Cardiomyocyte cell cycling, maturation, and growth by multinucleation in postnatal swine. *J Mol Cell Cardiol* 2020; 146: 95-108.
 27. Asif Y, Wlodek M, Black MJ, Russell A, Soeding P, Wadley G. Sustained cardiac programming by short-term juvenile exercise training in male rats. *J Physiol* 2018; 596(2): 163-180.
 28. Chondro F, Siagian M, Santoso, D. Aerobic exercise increases connexin43 expression in rat cardiac muscle. *The Journal of Universa Medicina* 2013; 32(3): 155-164.