مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
سال ۶۵، شماره ۴
مهر-آبان ۱۴۰۱، صفحه ۱۶۱۴-۱۶۰۴

www.mums.ac.ir
Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol. 65, No.4, P: 1604-1614
Sep -Nov2022

مقاله اصلی

اثر ۱۲ هفته تمرین استقامتی بر بیان ژن و پروتئین Wnt۱، β-catenin و CyclinD۱ و شاخص‌های اکوکاردیوگرافی در بطن راست موش‌های صحرایی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۲۲- تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۱۵

فرزانه ملکی [۱]
جواد مهربانی [۱ *]
علیرضا ایمانی [۲]

۱ گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
۲ گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

Email: mehrabanij@guilam.ac.ir

خلاصه

مقدمه: ری مدلینگ ناشی از تمرین استقامتی در بطن چپ نسبتاً به خوبی مشخص شده است اما در مورد بطن راست یافته ها اندک و متناقض بوده و تحقیقات بیشتری مورد نیاز است. بنابراین، این مطالعه با هدف ارزیابی اثرات فعالیت ورزشی استقامتی شدید بر بطن راست و بررسی نقش سیگنالینگ Wnt/β-catenin در این زمینه انجام شد.

روش کار: در این مطالعه تجربی، ۱۶ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به طور تصادفی به دو گروه کنترل و تمرین تقسیم شدند. گروه تمرین در معرض تمرینات استقامتی شدید شامل یک برنامه ۱۲ هفته‌ای دویدن روی تردمیل قرار گرفتند. پس از اکوکاردیوگرافی قلب حیوانات استخراج گردید و رسوب کلاژن با رنگ آمیزی ماسون تریکروم، و بیان ژن و پروتئین Wnt1، β-catenin و cyclinD1 در بافت بطن راست از طریق RT-PCR و وسترن بلات بررسی شد. برای مقایسه میانگین شاخص های مورد نظر بین دو گروه کنترل و تمرین، آزمون تی مستقل به کار رفت.

نتایج: بیان ژن Wnt۱، β-Catenin و CyclinD1 در گروه تمرین بطور غیرمعنی‌داری از گروه کنترل بیشتر بود (به ترتیب ۰/۰۴۴ ± ۰/۱۶ در مقابل ۰/۰۲۹ ± ۰/۱۲؛ ۰/۰۰۸ ± ۰/۰۳ در مقابل ۰/۰۰۱ ± ۰/۰۱ و ۰/۰۰۰۵ ± ۰/۰۰۱۷ در مقابل ۰/۰۰۰۲ ± ۰/۰۰۱۳). در رابطه با تغییرات در بیان پروتئین مربوط به تغییرات mRNA، نتایج حاصل از وسترن بلات نشان می‌دهد تغییرات در بیان پروتئین Wnt۱ (گروه تمرین ۰/۰۱۴ ± ۰/۷۵ در مقابل گروه کنترل ۰/۰۰۵ ± ۰/۱۹؛ P <۰/۰۰۰۱)، β-Catenin (گروه تمرین ۰/۰۱۴ ± ۰/۶۸ در مقابل گروه کنترل ۰/۰۱۸ ± ۰/۱۹؛ P <۰/۰۰۰۱) و CyclinD1 (گروه تمرین ۰/۰۱۲ ± ۰/۶۹ در مقابل گروه کنترل ۰/۰۱۳ ± ۰/۲۲؛ P <۰/۰۰۰۱) از نظر آماری معنی‌دار بود. نتایج حاصل از رنگ آمیزی ماسون تریکروم جهت شناسایی رشته های کلاژن نشان می دهد بین گروه تمرین (۰/۷۲ ± ۱۲) و گروه کنترل (۱/۲۲ ± ۱۱/۷۵) به لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. شاخص‌های اکوکاردیوگرافی گروه تمرین نیز تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نداشت.

نتیجه گیری: به نظر می‌رسد تمرینات استقامتی شدید طولانی‌مدت ممکن است منجر به هایپرتروفی بطن راست از طریق فعال کردن سیگنالینگ Wnt/β-catenin شود.

واژه های کلیدی: هایپرتروفی بطن راست، تمرین استقامتی شدید، سیگنالینگ Wnt/β-catenin، اکوکاردیوگرافی.

پی نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع می‌باشد.

مقدمه

تغییرات ساختاری و عملکردی ناشی از تمرین استقامتی در بطن چپ نسبتاً به خوبی مشخص شده است اما در مورد بطن راست یافته‌ها اندک و متناقض است. یافته‌ها در خصوص ری‌مدلینگ بطن راست ناشی از فعالیت استقامتی شدید، از فیبروز و هایپرتروفی استریک و کاهش عملکرد سیستولی و دیاستولی (۱) تا عدم فیبروز و ارتقای عملکرد سیستولی (۲) متفاوت است. تفاوت‌های آناتومیکی و فیزیولوژیکی بطن چپ و راست موجب می‌شود پاسخ‌های متفاوتی به محرک‌ها بدهند (۳). مطالعات نشان می‌دهد که حین انجام فعالیت ورزشی، اضافه بارهای حجمی و فشاری بر بطن راست بیشتر از بطن چپ است، در حالی که ضخامت دیواره بطن راست نسبتاً کمتر از بطن چپ دچار افزایش می‌شود (۴). بنابراین تخمین زده شده است که حین انجام فعالیت ورزشی، تنش دیواره بطن راست بسیار بیشتر از تنش دیواره بطن چپ دچار افزایش می‌شود (۱۷۰ در مقابل ۲۳ درصد) (۵, ۶). از طرف دیگر، اندازه‌گیری‌های مقاومت عروقی با استفاده از روش‌های تهاجمی نشان می‌دهد که حین انجام فعالیت‌های ورزشی، مقاومت عروق سیستمی بیش از ۷۵ درصد کاهش می‌یابد در حالی که مقاومت عروق ریوی تنها به میزان ۳۰ الی ۵۰ درصد دچار کاهش می‌شود (۷). اثر تعدیل کنندگی کامپلیانس عروقی نیز در عروق ریوی بسیار کمتر از میزان قابل انتظار است. در زمان انجام فعالیت ورزشی، عروق به دلیل میزان بالای جریان خون متسع می‌شوند که به این معناست که کامپلیانس کاهش می‌یابد (۸). بنابراین حین فعالیت ورزشی، فشار عروق افزایش می‌یابد که میزان این افزایش در گردش خون ریوی بیشتر از گردش خون سیستمی است. یک مسیر که در مقایسه با اضافه بار فشاری LV، در اضافه بار فشاری RV فعالتر است مسیر سیگنالینگ Wnt می‌باشد (۹).

سیگنالینگ Wnt در فیبروز قلبی و هایپرتروفی میوسیت نقش اساسی دارد (۹, ۱۰). تجمع پلاکوگلوبین در هسته از طریق سد کردن فعالیت Tcf/Lef[1] سیگنالینگ Wnt را به شدت کاهش داده و درنتیجه بیان ژن‌های ادیپوژنیک و فیبروژنیک را افزایش می‌دهد (۱۱). سایر داده‌های تجربی نشان می‌دهد که از دست دادن پروتئین دسموزومی پلاکوگلوبین منجر به فعالسازی Akt و در پی آن مهار گلیکوژن سنتاز کیناز β (GSK3β) می‌شود که پیامد آن پایداری پروتئین β–catenin و انتقال آن به هسته است. در هسته تعامل β–catenin با فاکتور رونویسی Tcf/Lef موجب افزایش بیان c-myc، c-fos و cyclinD1 و هایپرتروفی قلبی می‌شود (۱۲). بر اساس اطلاعات ما، تا کنون تحقیقی در خصوص نقش سیگنالینگ Wnt در ری‌مدلینگ قلبی ناشی از ورزش صورت نگرفته است و مطالعات صورت گرفته محدود به مطالعات بالینی هستند. بنابراین، این مطالعه با هدف ارزیابی ری‌مدلینگ بطن راست ناشی از فعالیت ورزشی استقامتی شدید و بررسی نقش سیگنالینگ Wnt انجام شد.

روش کار

برای مطالعه تجربی حاضر، ۱۶ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۱۰۰ تا ۱۲۵ گرم از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. نمونه‌ها در دمای ۲ ± ۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۱۵ ± ۴۵ درصد با چرخه روشنایی-تاریکی ۱۲:۱۲ ساعته در حیوان‌خانه گروه فیزیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران نگهداری شدند و در طول دوره پژوهش دسترسی آزاد به آب و غذای استاندارد موش داشتند. برای حفظ تعامل اجتماعی، در هر قفس چهار حیوان قرار داده شد. لازم به ذکر است که این مطالعه با رعایت اصول راهنمای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی مصوب کمیته اخلاق تحقیقات حیوانی دانشگاه علوم پزشکی گیلان، مستخرج از دستورالعمل هلسینکی با کد اخلاق IR.GUMS.REC.1397.446 انجام شد.

در ابتدا به منظور آشنایی حیوانات با نحوه فعالیت روی تردمیل، نمونه‌ها به مدت ۱۴ روز با سرعت ۱۰ متر در دقیقه

1transcription factor/lymphoid enhancer-binding factor
1 transcription factor

و مدت ۱۰ دقیقه روی تردمیل قرار گرفتند و با افزایش تدریجی، سرعت و مدت تمرین در پایان هفته دوم به سرعت ۲۰ متر در دقیقه و مدت ۳۰ دقیقه رسید. حیوانات به‌طور تصادفی به دو گروه کنترل و تمرین تقسیم شدند. گروه کنترل در طول مطالعه تحت هیچ مداخله‌ای قرار نگرفت. گروه تمرین در معرض تمرینات استقامتی شدید شامل یک برنامه دویدن ۱۲ هفته‌ای روی تردمیل جوندگان با سرعت ۳۶ متر در دقیقه، ۵ روز در هفته، روزانه به مدت ۱ ساعت قرار گرفتند. مطالعات حیوانی قبلی نشان داده است که این بار حدود ۸۵ درصد حداکثر اکسیژن برداشتی (VO2max) می‌باشد (۱۳). پروتکل با دویدن روی تردمیل با سرعت ۲۰ متر در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه آغاز شد. مدت جلسات تمرین و سرعت تردمیل به تدریج افزایش یافت به‌طوری که پس از گذشت ۳ هفته، حیوانات به مدت ۱ ساعت در روز با سرعت ۳۶ متر در دقیقه می‌دویدند و به مدت ۹ هفته در همین سطح، تحت تمرین قرار گرفتند (جدول ۱) (۱).

جدول ۱. برنامه تمرین استقامتی

هفته های تمرین	آشناسازی		سوم	چهارم	پنجم	ششم	.....	چهاردهم
	اول	دوم						
مدت تمرین (دقیقه در روز)	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰	۵۰	۶۰	.....	۶۰
سرعت تردمیل (متر بر دقیقه)	۱۰	۱۵	۲۰	۲۵	۳۰	۳۶	.....	۳۶

راست (RVD) و ضخامت دیواره (RVWT) در انتهای سیستول و دیاستول قلب استفاده شد. داپلر با امواج پالسی (Pulsed wave Doppler) برای ثبت اوج سرعت پر شدن اولیه (موج E) مورد استفاده گرفت.

۴۸ ساعت پس از پایان برنامه تمرینی، موش‌های صحرایی با استفاده از ترکیب کتامین- زایلازین (K، ۷۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن؛ X، ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن) بیهوش شده و پس از وزن‌کشی، بافت قلب از طریق جراحی استخراج شد. پس از اندازه‌گیری وزن، بطن راست جدا شد و نیمی از نمونه‌ها در نیتروژن مایع در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد منجمد گردیدند و نیمی دیگر در بافر فرمالین خنثی ٪۱۰ برای مطالعات بافت شناسی قرار گرفتند.

RNA کل از بطن راست حیوانات با استفاده از معرف کیازول مطابق پروتکل جداسازی RNA دستورالعمل شرکت سازنده (Qiagen, Germany) استخراج شد. ابتدا به نمونه ها ۳۰۰-۲۰۰ لاندا کیازول اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۸۰- قرار گرفت. پس از آن پلاک موجود در

موش‌ها در طول تمام جلسات تمرینی برای اطمینان از انجام صحیح فعالیت ورزشی تحت نظارت قرار گرفتند. حیواناتی که توانایی و همکاری لازم برای فعالیت ورزشی را نداشتند از مطالعه حذف شدند تا از اثرات مخرب استرس فیزیکی و روانی جلوگیری شود. شوک الکتریکی خفیف (۰/۳ تا ۲ میلی آمپر) نیز برای تشویق موش‌ها به دویدن استفاده شد.

در پایان پروتکل تمرینی (در موش‌های گروه تمرین حداقل ۱۲ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین)، اکوکاردیوگرافی دو بعدی M-mode تحت بیهوشی عمومی با ایزوفلوران ۲٪ برای ارزیابی ری‌مدلینگ عملکردی و ساختاری in vivo بطن راست انجام شد. موش‌های صحرایی توسط متخصص اکوکاردیوگرافی در بخش رادیولوژی کلینیک دامپزشکی دانشگاه تهران با استفاده از دستگاه اکوکاردیوگرافی vivid7 ساخت کشور نروژ (GE Vingmed Ultrasound AS N-3190) با پروب ۱۲ مگاهرتزی تحت بررسی قرار گرفتند. اکوکاردیوگرافی در نمای پاراسترنال long axis برای اندازه‌گیری ابعاد بطن

استفاده از اسپکتروفتومتری (DPI-1, Kiagen) با نسبت A260/A280 بررسی شد.

مراحل سنتز cDNA طبق پروتکل شرکت سازنده Revert AID™ Firs (Fermentas, Canada) انجام گرفت و سپس cDNA سنتز شده جهت انجام واکنش رونویسی معکوس مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا کلیه پرایمرهای طراحی شده مربوط به تمامی ژن‌ها، مورد بررسی قرار گرفت و سپس بررسی بیان ژن‌ها با استفاده از روش کمی q-RT PCR انجام شد.

برای آماده‌سازی پرایمرها حجم مشخص آب مقطر استریل به هر تیوب حاوی پرایمر لیوفیلیزه بر اساس اطلاعات مربوط به هر پرایمر اضافه شد و این محلول به عنوان استوک در ۲۰- درجه سانتی گراد قرار داده شد. به این ترتیب جهت انجام کار برای هر بار تست، یک میکرولیتر cDNA، در ۱۰ میکرولیتر SYBR Green + Master Mix (ABI, USA)، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر فوروارد، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر معکوس و ۸ میکرولیتر DEPC water تکثیر شدند. در جدول ۲ توالی پرایمرهای بیان ژن ها ذکر شده است.

کرایوتیوب در حالت نیمه انجماد توسط سرسمپلر خرد و سپس کمی پیپتاژ شد. پس از آن حدود ۱۰۰ لاندا کلروفرم به نمونه اضافه شد تا سلول ها لیز شود. پس از ۱ دقیقه محلول با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع شفاف قسمت بالایی لوله که حاوی RNA بود به آرامی برداشته و در یک میکروتیوب DEPC شده قرار داده شد. در مرحله بعد ۱ سی سی ایزوپروپانول بر روی RNA شفاف ریخته شد و به مدت ۱ دقیقه با دست به هم زده شد. پس از افزودن ایزوپروپرانول، نمونه‌ها در سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. پس از خارج کردن از سانتریفیوژ مایع رویی تخلیه و روی آن ۱ سی سی الکل ۷۰ درصد اضافه گردید. سپس مخلوط در سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۷۵۰۰ قرار گرفت. سپس مایع رویی با سمپلر تخلیه گردید و سپس پلاک در داخل میکروتیوب خشک شد. به منظور حل کردن RNA به میزان ۲۰ لاندا آب مقطر ۶۰ درجه بر روی پلاک داخل میکروتیوب ریخته شد. سپس کمی با سرسمپلر پیپتاژ و به مدت ۵ دقیقه بر روی صفحه ۶۰ درجه قرار داده شد. RNA استخراج شده تا زمان استفاده در دمای ۸۰- قرار گرفت. درجه خلوص RNA استخراج شده با

جدول ۲. توالی پرایمرهای بیان ژنی بطن راست موش های صحرایی

Genes	Primer Sequence Product
Wnt1	F: 5′CGACTCAGAGATGGTGGTAGA3 R: 5AGGAGACGGTTTCAGGGTTG3
β-catenin	F: 5ATGCTGAGGAAGAAGATGTGGA3 R: 5ATGAAACTGCGTGGATGGGA3
Cyclin D1	F: 5TCAAGTGTGACCCGGACTG3 R: 5CACTACTTGGTGGCTCCC3
GAPDH	F: 5GGATAGTGAGAGCAAGAGAGAGG3 R: 5ATGGTATTGGAGAGAAGGGAGGG3

آستانه ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ CT) انجام شد. تمام واکنش‌های Real-time PCR در سه تکرار انجام شد و نسبت به بیان گلیسرآلدئید ۳- فسفات دهیدروژناز (GAPDH) نرمال شد.

روش وسترن بلات برای اندازه‌گیری بیان پروتئین مورد استفاده قرار گرفت. به این منظور، قطعه کوچکی از بطن راست نمونه‌ها در بافر RIPA (CMG, Iran) لیز شد و در

۴۰ سیکل برای هر چرخه Real-time PCR در نظر گرفته شد و دمای هر سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه، ۶۰-۵۸ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه تنظیم شد. منحنی ذوب (Melting curve) جهت بررسی صحت واکنش‌های PCR انجام شد. تجزیه و تحلیل بیان ژن با استفاده از روش مقایسه‌ای چرخه

را پشت سر گذاشتند. پس از قالب‌گیری، نمونه‌ها توسط میکروتوم چرخشی به ضخامت ۷ میکرومتر برش داده شدند. برش‌های بطن راست پس از پارافین‌زدایی، شفاف‌سازی با گزیلول و آبدهی با الکل، به منظور شناسایی انباشت کلاژن با تریکروم ماسون حاوی محلول‌های هماتوکسیلین ویگرت، محلول اسید فوشین، ببریج اسکارلت، اسید فسفوتنگستیک/اسید فسفومولیدبیک و آنیلین بلو رنگ‌آمیزی شدند و سپس قبل از دهیدراسیون و مونت کردن با انتالان (Merck, Germany)، اسید استیک اضافه شد. درصد ناحیه آبی رنگ که نشان‌دهنده رشته‌های کلاژن است با نرم افزار Image J (v. 1. 52h) محاسبه شد.

از آزمون شاپیروویلک برای تأیید توزیع طبیعی داده‌ها استفاده شد و همه نتایج به صورت میانگین ± خطای معیار بیان شدند. برای مقایسه میانگین شاخص‌های مورد نظر بین دو گروه کنترل و تمرین، آزمون تی مستقل به کار رفت. تمامی تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۵ انجام شد و سطح معنی‌داری آماری P ۰/۰۵ > در نظر گرفته شد.

نتایج

در رابطه با تأثیر سه ماه تمرین استقامتی روی تردمیل بر وزن بدن، وزن قلب و شاخص‌های اکوکاردیوگرافی بطن راست (جدول ۳) با استفاده از آزمون تی مستقل تغییرات حاصل به لحاظ آماری معنی‌دار نبودند.

۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. مقادیر مساوی از پروتئین با ژل SDS-PAGE ۱۲٪ با سیستم الکتروفورز Bio-Rad جدا شد و به غشای پلی وینیلیدین دی فلوراید (PVDF) (Thermo Scientific™, USA)منتقل شد و متعاقباً به مدت ۲ ساعت در محلول بلاتینگ قرار گرفت. سپس بلات‌ها یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در آنتی بادی اولیه (rabbit polyclonal anti-wnt1 dilution 1:5000, Abcam, ab15251, rabbit polyclonal anti-β-catenin dilution 1:5000, Abcam, ab6302, rabbit monoclonal anti-cyclin D1 dilution 1:5000, Abcam, ab16663 and rabbit monoclonal anti-GAPDH dilution 1:5000, Abcam, ab181602) قرار داده شدند. روز بعد، پس از چندین بار شستشو در TBS-T، غشاها با آنتی بادی ثانویه (goat anti-rabbit polyclonal horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody dilution, 10000, Abcam, ab6721) به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از سه بار شستشوی غشا با TBS-T، بلات‌ها با کیت (Western Pierce ECL Thermo Fisher) پوشانده شده و با استفاده از تحلیلگر تصویر لومینسنت LAS-3000 (Fujifilm Corp., Tokyo, Japan) مشخص شدند. تجزیه و تحلیل و کمی‌سازی با استفاده از نرم افزار Image J (v. 1.52h) صورت گرفت.

برای مطالعات بافت‌شناسی به منظور شناسایی رشته‌های کلاژن، نمونه‌های بطن راست تثبیت شده در فرمالین، طبق پروتکل، مراحل هیدراسیون با استفاده از الکل و قالب‌گیری

جدول ۳. وزن بدن، وزن قلب و شاخص‌های عملکردی و ساختاری بطن راست (میانگین ± خطای معیار)

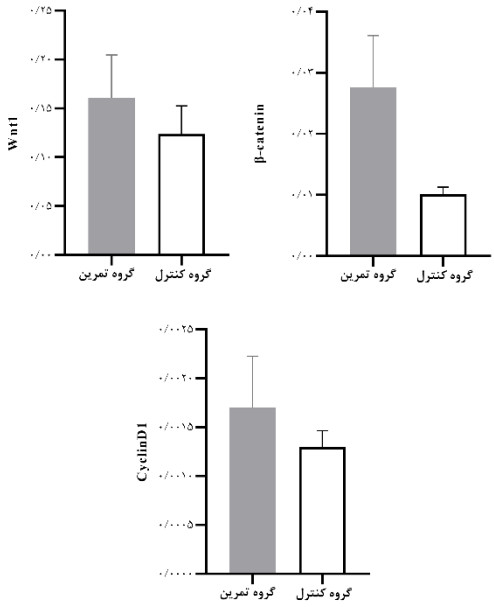
شاخص	تمرین (n = ۴)	کنترل (n = ۴)	P-value
وزن (گرم)	۲۵۵/۵ ± ۶/۵۱	۲۸۳/۵ ± ۱۰/۵۷	۰/۰۶۵
وزن قلب (گرم)	۰/۹۱۰ ± ۰/۰۲۳	۰/۹۸۵ ± ۰/۰۴۵	۰/۱۹۱
وزن قلب/وزن بدن (گرم/کیلوگرم)	۳/۵۶۱ ± ۰/۰۲	۳/۴۷۲ ± ۰/۰۶۷	۰/۲۵۱
قطر پایان دیاستولی بطن راست/وزن بدن (سانتی‌متر/کیلوگرم)	۰/۸۰۱ ± ۰/۱۱۳	۰/۸۱۹ ± ۰/۰۸۴	۰/۹۰۲

قطر پایان سیستولی بطن راست/وزن بدن (سانتی‌متر/کیلوگرم)	۰/۱۱۶ ± ۰/۰۲۵	۰/۱۴۷ ± ۰/۰۴۱	۰/۵۵۸
ضخامت دیواره خلفی بطن راست/وزن بدن (سانتی‌متر/کیلوگرم)	۰/۱۸۰ ± ۰/۰۱۲	۰/۱۴۴ ± ۰/۰۱۳	۰/۰۹۷
نسبت موج E به موج A	۱/۶۹ ± ۰/۰۲۸	۱/۴۵ ± ۰/۱۰	۰/۰۶۱

وزن بدن در گروه تمرین (۶/۵۱ ± ۲۵۵/۵ گرم) نسبت به گروه کنترل (۱۰/۵۷ ± ۲۸۳/۵ گرم) کمتر بود. نسبت وزن قلب به وزن بدن در گروه تمرین (۰/۰۲ ± ۳/۵۶۱ گرم/کیلوگرم) نسبت به گروه کنترل (۰/۰۶۷ ± ۳/۴۷۲ گرم/کیلوگرم) بالاتر بود. نسبت قطر پایان دیاستولی بطن راست به وزن بدن در گروه تمرین (۰/۱۱۲ ± ۰/۸۰۱ سانتی‌متر/کیلوگرم) نسبت به گروه کنترل (۰/۰۸۴ ± ۰/۸۱۹ سانتی‌متر/کیلوگرم) ۲ درصد پایینتر بود. همچنین نسبت قطر پایان سیستولی بطن راست به وزن بدن در گروه تمرین (۰/۰۲۵ ± ۰/۱۱۶ سانتی‌متر/کیلوگرم) نسبت به گروه کنترل (۰/۰۴۱ ± ۰/۱۴۷ سانتی‌متر/کیلوگرم) ۲۶/۷ درصد پایینتر بود. در مقابل ضخامت دیواره خلفی بطن راست نسبت به وزن بدن در گروه تمرین (۰/۰۱۲ ± ۰/۱۸۰ سانتی‌متر/کیلوگرم) نسبت به گروه کنترل (۰/۰۱۴ ± ۰/۱۴۴ سانتی‌متر/کیلوگرم) ۲۰ درصد بیشتر بود. نسبت E/A در گروه تمرین (۰/۰۲۸ ± ۱/۶۹) نسبت به گروه کنترل (۰/۱ ± ۱/۴۵) ۱۴ درصد بالاتر بود.

در رابطه با شاخص‌های مربوط به مسیر سیگنالینگ Wnt، نتایج حاصل از RT-PCR نشان می‌دهد تغییرات در بیان mRNA شاخص‌های Wnt۱ (گروه تمرین ۰/۰۴۴ ± ۰/۱۶ در مقابل گروه کنترل ۰/۰۰۳ ± ۰/۱۲؛ P =۰/۵)، β-Catenin (گروه تمرین ۰/۰۰۸ ± ۰/۰۳ در مقابل گروه کنترل ۰/۰۰۱ ± ۰/۰۱؛ P =۰/۰۸) و CyclinD1 (گروه تمرین ۰/۰۰۰۵ ± ۰/۰۰۱۷ در مقابل گروه کنترل ۰/۰۰۰۲ ± ۰/۰۰۱۳؛ P =۰/۵) بطن راست، از نظر آماری معنی‌دار نبود (شکل ۱).

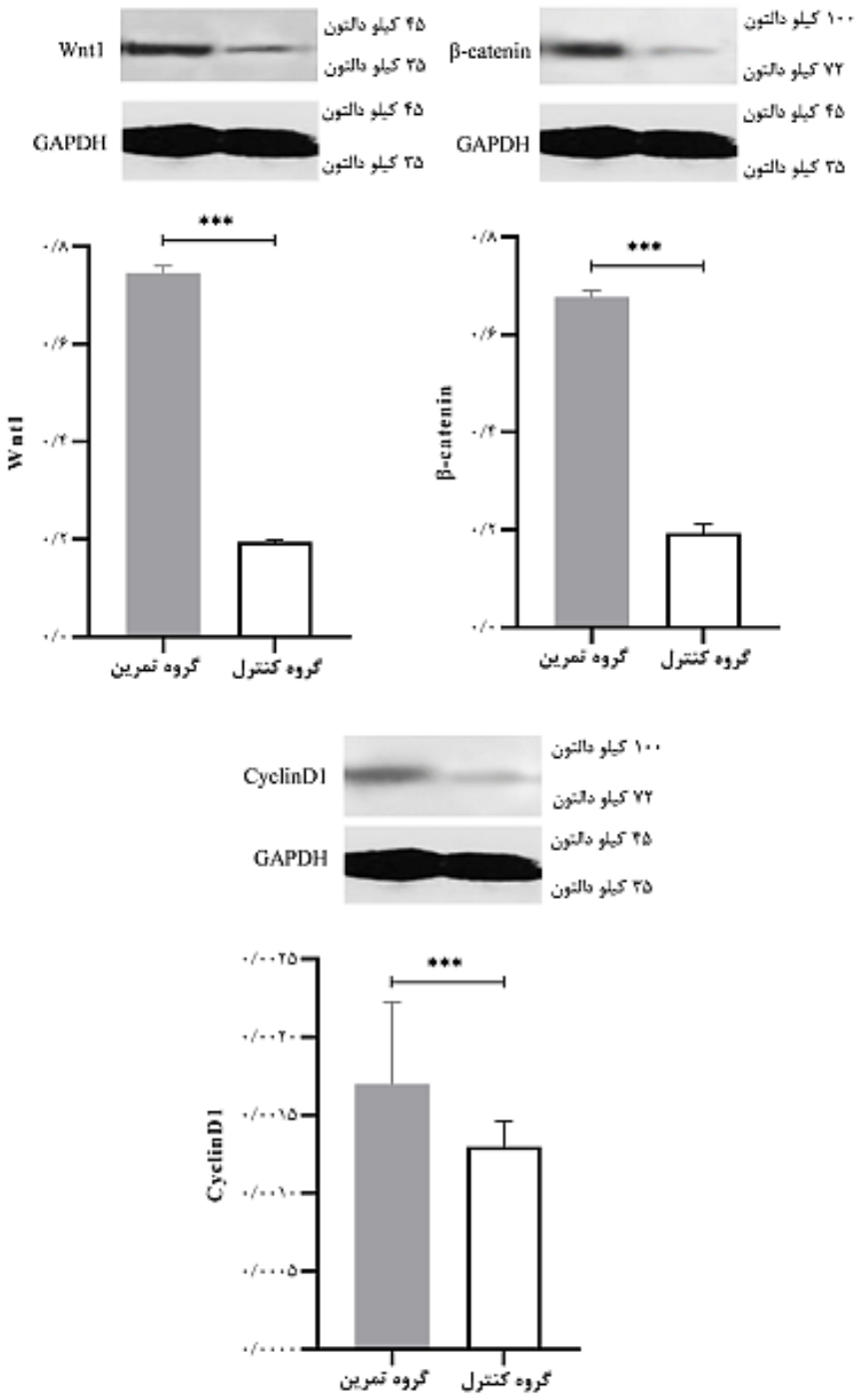
در رابطه با تغییرات در بیان پروتئین مربوط به تغییرات mRNA، نتایج حاصل از وسترن بلات نشان می‌دهد تغییرات در بیان پروتئین Wnt۱ (گروه تمرین ۰/۰۱۴±۰/۷۵ در مقابل



شکل ۱ میانگین ± خطای معیار بیان ژن‌های Wnt1، β-Catenin و cyclinD1 در گروه تمرین (n = ۴) و گروه کنترل (n = ۴).

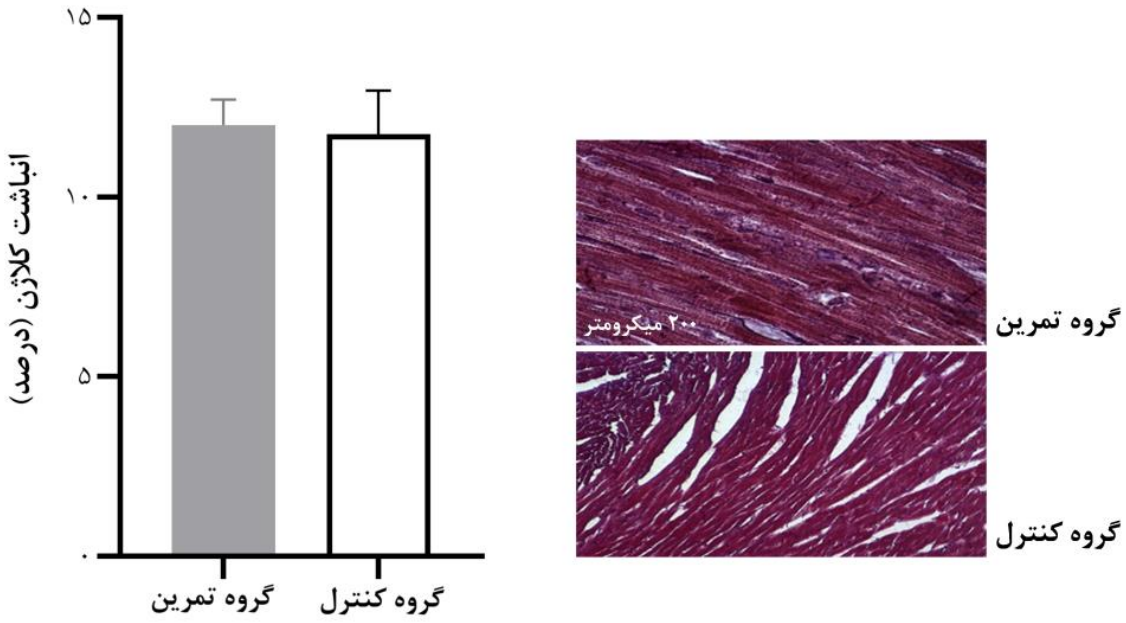
گروه کنترل ۰/۰۰۵ ± ۰/۱۹؛ P <۰/۰۰۰۱)، β-Catenin (گروه تمرین ۰/۰۱۴ ± ۰/۶۸ در مقابل گروه کنترل ۰/۰۱۸ ± ۰/۱۹؛ P <۰/۰۰۰۱) و CyclinD1 (گروه تمرین ۰/۰۱۲ ± ۰/۶۹ در مقابل گروه کنترل ۰/۰۱۳ ± ۰/۲۲؛ P <۰/۰۰۰۱) از نظر آماری معنی‌دار بود (شکل ۲).

نتایج حاصل از رنگ آمیزی ماسون تریکروم جهت شناسایی رشته‌های کلاژن نشان می‌دهد بین گروه تمرین (۰/۷۲ ± ۱۲) و گروه کنترل (۱/۲۲ ± ۱۱/۷۵) به لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (P =۰/۸۶) (شکل ۳).



شکل ۲ میانگین ± خطای معیار بیان پروتئین‌های Wnt1، β-Catenin و cyclinD1 در گروه تمرین (n = ۴) و گروه کنترل (n = ۴).

*P<0.001 در مقایسه با گروه کنترل با آزمون تی مستقل



شکل ۳ تصاویر رنگ آمیزی ماسون تریکروم بطن راست و میانگین ± خطای معیار درصد انباشت کلاژن در گروه تمرین (n = ۴) و گروه کنترل (n = ۴).

بحث

تغییرات ساختاری و عملکردی ناشی از تمرین استقامتی در بطن چپ نسبتاً به خوبی مشخص شده است اما فیزیولوژی سازگاری بطن راست با فعالیت ورزشی تا حدود زیادی ناشناخته است و نیاز به تحقیق و بررسی دارد. از اینرو اثر تمرین استقامتی شدید را بر ری‌مدلینگ بطن راست از نظر ساختاری، عملکردی و سلولی–مولکولی مورد بررسی قرار دادیم.

در این مطالعه متعاقب ۱۲ هفته تمرین استقامتی شدید ضخامت دیواره خلفی بطن راست/وزن بدن به میزان ۲۰ درصد افزایش و قطر پایان سیستولی بطن راست/وزن بدن ۲۶/۷ درصد کاهش یافته بود و نسبت E/A که شاخص عملکرد دیاستولی است نسبت به گروه کنترل ۱۴ درصد بیشتر بود که البته این تغییرات از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. بر اساس یافته‌های حاصل از RT-PCR، بیان ژن‌های مرتبط با سیگنالینگ Wnt/β-catenin افزایش غیرمعنی‌داری داشتند و بیان پروتئین‌های Wnt1، β-catenin و cyclinD1 افزایش معنی‌داری نشان دادند.

Benito و همکاران (۲۰۱۱) (۱) هایپرتروفی استریک، کاهش عملکرد سیستولی و دیاستولی و فیبروز بطن راست را پس از ۱۶ هفته تمرین استقامتی شدید و طولانی‌مدت گزارش کردند که این تغییرات پس از ۸ هفته به حالت طبیعی بازگشتند. Soori و همکاران (۲۰۲۱) (۱۴) نیز رسوب گسترده کلاژن بینابینی در بافت بطن راست موش‌های صحرایی و کاهش عملکرد سیستولی و دیاستولی را متعاقب ۱۶ هفته تمرین استقامتی با شدت و حجم بالا نشان دادند. برخلاف این یافته‌ها مطالعه ما افزایش ضخامت دیواره و بهبود عملکرد دیاستولی بطن راست را نشان داد. البته در مطالعه ما طول دوره تمرین نسبت به پروتکل دو مطالعه ذکر شده کوتاه‌تر بود. مشابه با یافته‌های ما، Henriksen و همکاران (۱۵) ضخامت بیشتر بطن راست را در ورزشکاران استقامتی گزارش کرده‌اند. طبق مطالعات صورت گرفته، بطن راست در مقایسه با بطن چپ به دلیل دیواره نازک‌تر و آناتومی غیر بیضوی آن به تغییرات حاد ایجاد شده در پیش بار و پس بار بطنی حین انجام فعالیت ورزشی حساس‌تر است.

در شرایط استراحت، توده و قدرت انقباضی بطن راست یک سوم تا یک پنجم بطن چپ است که این موضوع به طور مناسبی با میزان پس باری که در مقابل هر یک از بطن‌ها وجود دارد، تطابق پیدا کرده است (۱۶, ۱۷). در حالت استراحت، بطن چپ در برابر گردش سیستمی که مقاومت عروقی و کامپلیانس متوسطی دارد منقبض می‌شود اما بطن راست خون را به گردش خون ریوی که مقاومت عروقی پایین و کامپلیانس بالا دارد پمپ می‌کند. بنابراین در حالت استراحت، بطن راست کار کمتری در مقایسه با بطن چپ انجام می‌دهد (۱۸). از آنجایی که عروق ریوی مقاومت بسیار کمی در حال استراحت دارد، بنابراین ظرفیت محدودی برای کاهش بیشتر مقاومت حین انجام فعالیت ورزشی خواهد داشت ازاینرو حین فعالیت ورزشی، فشار عروق ریوی افزایش می‌یابد (۱۹). در اضافه بار فشاری مزمن، ضخامت دیواره بطن راست به عنوان یک مکانیسم جبرانی برای کاهش تنش دیواره افزایش می‌یابد (۲۰). با این حال، در دراز مدت، به دلیل تغییرات پاتوفیزیولوژیک در کاردیومیوسیت‌ها، نیروی انقباضی کاهش می‌یابد و بطن راست متسع می‌شود (۲۰). سازگاری بطن راست با اضافه بار فشاری بسته به درجه اضافه بار متفاوت است، به‌طوری که اضافه بار فشاری خفیف منجر به هایپرتروفی تطبیقی بطن راست با حفظ عملکرد سیستولی و دیاستولی می‌شود، در حالی که اضافه بار فشاری شدید منجر به فیبروز بینابینی و هایپرتروفی پاتولوژیک با اتساع حفره و اختلال عملکرد سیستولی و دیاستولی می‌گردد (۲۱). اگر بطن راست نتواند فشار اضافه بار را تحمل کند، در نهایت شروع به اتساع می‌کند (۲۲).

هایپرتروفی فیزیولوژیک قلبی بعد از تمرین دویدن در موش‌های صحرایی به وضوح با هایپرتروفی ناشی از هایپرتنشن تفاوت دارد، به این صورت که عملکرد دیاستولی را بدون تغییر در محتوای کلاژن بهبود می‌بخشد (۲۳). افزایش ۱۴ درصدی عملکرد دیاستولی بدون تغییر در رسوب کلاژن بطن راست پس از تمرین استقامتی شدید در مطالعه ما، نشان‌دهنده هایپرتروفی فیزیولوژیک است. طبق قانون لاپلاس هایپرتروفی کانسنتریک می‌تواند نشان‌دهنده اضافه بار فشاری باشد یا شاید این نوع هایپرتروفی، پاسخ تطبیقی به افزایش کار قلب در طول تمرین (به دلیل افزایش ضربان قلب و فشار ریوی) باشد. تمرینات استقامتی به افزایش قابل توجهی در برون ده قلبی نیاز دارد، بنابراین فشار زیادی بر تمام ساختارهای میوکارد، به ویژه بطن راست وارد می‌شود (۶). در اضافه بار فشاری مزمن، به عنوان مکانیسم جبرانی برای کاهش استرس دیواره، ضخامت دیواره بطن راست افزایش می‌یابد (هایپرتروفی کانسنتریک) (۲۰).

پیشنهاد شده است که هایپرتروفی قلبی ناشی از Ang II با فعال شدن سیگنالینگ Wnt/β-catenin در موش‌های صحرایی همراه است و Wnt1 یکی از لیگاندهایی است که در قلب تنظیم افزایشی می‌شود (۲۴). به دنبال فعال شدن سیگنالینگ Wnt/β-catenin، بیان ژن‌های مرتبط با هایپرتروفی مانند Cyclin D1 افزایش می‌یابد (۱۲). در مطالعه حاضر، با توجه به افزایش بیان ژن و پروتئین Wnt1، β-catenin و cyclinD1، می‌توان گفت احتمالاً تمرین استقامتی شدید از طریق فعال‌سازی سیگنالینگ Wnt/β-catenin موجب هایپرتروفی بطن راست می‌شود.

نتیجه‌گیری

در این مدل تجربی تمرین استقامتی شدید منجر به فعالسازی سیگنالینگ Wnt/β-catenin و هایپرتروفی قلبی همراه با افزایش عملکرد دیاستولی شد. به نظر می‌رسد هایپرتروفی کانسنتریک مشاهده شده با فعالیت استقامتی شدید، مکانیسم جبرانی در پاسخ به افزایش مزمن فشار ریوی باشد.

تشکر و قدردانی

از همکاری صمیمانه آقای دکتر بهزاد طاعتی مقدم، خانم دکتر الهام زاهدی و آقای دکتر اشکان سنایی سپاسگزاریم. همچنین از اساتید و کارکنان گروه فیزیولوژی پزشکی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران برای کمک‌های ارزشمندشان تشکر می‌کنیم.

References

۱. Benito B, Gay-Jordi G, Serrano-Mollar A, Guasch E, Shi Y, Tardif J-C, et al. Cardiac arrhythmogenic remodeling in a rat model of long-term intensive exercise training. Circulation. 2011;123(1):13-22.

.۲ Baggish AL, Yared K, Wang F, Weiner RB, Hutter Jr AM, Picard MH, et al. The impact of endurance exercise training on left ventricular systolic mechanics. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2008.

.۳ Friedberg MK, Redington AN. Right versus left ventricular failure: differences, similarities, and interactions. Circulation. 2014;129(9):1033-44.

.٤ La Gerche A, Roberts T, Claessen G. The response of the pulmonary circulation and right ventricle to exercise: exercise-induced right ventricular dysfunction and structural remodeling in endurance athletes (2013 Grover Conference series). Pulmonary circulation. 2014;4(3):407-16.

.٥ Heidbuchel H, Prior DL, La Gerche A. Ventricular arrhythmias associated with long-term endurance sports: what is the evidence? British journal of sports medicine. 2012;46(Suppl 1):i44-i50.

.٦ La Gerche A, Heidbüchel H, Burns AT, Mooney DJ, Taylor AJ, Pfluger HB, et al. Disproportionate exercise load and remodeling of the athlete's right ventricle. Medicine and science in sports and exercise. 2011;43(6):974.۸۱-

.۷ Stickland MK, Welsh RC, Petersen SR, Tyberg JV, Anderson WD, Jones RL, et al. Does fitness level modulate the cardiovascular hemodynamic response to exercise? Journal of applied physiology. 2006;100(6):1895-901.

.۸ McLaughlin VV, Langer A, Tan M ,Clements PJ, Oudiz RJ, Tapson VF, et al. Contemporary trends in the diagnosis and management of pulmonary arterial hypertension: an initiative to close the care gap. Chest. 2013;143(2):324-32.

.۹ Ozhan G, Weidinger G. Wnt/β-catenin signaling in heart regeneration. Cell regeneration. 2015;4(1):4: 3.

.۱۰ Blyszczuk P, Müller-Edenborn B, Valenta T, Osto E, Stellato M, Behnke S, et al. Transforming growth factor-β-dependent Wnt secretion controls myofibroblast formation and myocardial fibrosis progression in experimental autoimmune myocarditis. European heart journal. 2017;38(18):1413-25.

.۱۱ Martherus R, Jain R, Takagi K, Mendsaikhan U, Turdi S, Osinska H, et al. Exercise Training in Cardiovascular Disease: Mechanisms and Outcomes: Accelerated cardiac remodeling in desmoplakin transgenic mice in response to endurance exercise is associated with perturbed Wnt/β-catenin signaling. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2016;310(2):H174–H87.

.۱۲ Lorenzon A, Calore M, Poloni G, De Windt LJ, Braghetta P, Rampazzo A. Wnt/β-catenin pathway in arrhythmogenic cardiomyopathy. Oncotarget. 2017;8(36):60640.

.۱۳ Sanz-de la Garza M, Rubies C, Batlle M, Bijnens BH, Mont L, Sitges M, et al. Severity of structural and functional right ventricular remodeling depends on training load in an experimental model of endurance exercise. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2017;313(3):H459-H68.

.۱٤ Soori R, Norouzi J, Akbarnejad A, Choobineh S. Right Ventricular Remodeling Following Intense and Prolonged Endurance Training. MJMS. 2021;64(4):3673-83.

.۱٥ Henriksen E, Landelius J, Wesslén L, Arnell H, Nyström-Rosander C, Kangro T, et al. Echocardiographic right and left ventricular measurements in male elite endurance athletes. European heart journal. 1996;17(7):1121-8.

.۱٦ Buechel EV, Kaiser T, Jackson C, Schmitz A, Kellenberger CJ. Normal right-and left ventricular volumes and myocardial mass in children measured by steady state free precession cardiovascular magnetic resonance. Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance. 2009;11(1):19.

.۱۷ Faber MJ, Dalinghaus M, Lankhuizen IM, Steendijk P, Hop WC, Schoemaker RG, et al. Right and left ventricular function after chronic pulmonary artery banding in rats assessed with biventricular pressure-volume loops. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2006;291(4):H1580-H6.

.۱۸ La Gerche A, Claessen G, Van de Bruaene A, Pattyn N, Van Cleemput J, Gewillig M, et al. Cardiac Magnetic Resonance Imaging: a new gold standard for ventricular volume quantification during high-intensity exercise. Circulation Cardiovascular Imaging. 2013;6(2):329–38.

.۱۹ Argiento P, Chesler N, Mulè M, D'Alto M, Bossone E, Unger P, et al. Exercise stress echocardiography for the study of the pulmonary circulation. European Respiratory Journal. 2010;35(6):1273-8.

.۲۰ Bogaard HJ, Abe K, Noordegraaf AV, Voelkel NF. The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. Chest. 2009.۸۰٤-۷۹٤:(۳)۱۳٥;

.۲۱ Mendes-Ferreira P, Santos-Ribeiro D, Adão R, Maia-Rocha C, Mendes-Ferreira M, Sousa-Mendes C, et al. Distinct right ventricle remodeling in response to pressure overload in the rat. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2016;311(1):H85-H95.

.۲۲ Chin KM, Kim NH, Rubin LJ. The right ventricle in pulmonary hypertension. Coronary artery disease. 2005;16(1):13-8.

.۲۳ Fenning A, Harrison G, Dwyer D, Rose'Meyer R, Brown L. Cardiac adaptation to endurance exercise in rats. Biochemistry of Hypertrophy and Heart Failure: Springer; 2003. p. 51-9.

.۲٤ Zhao Y, Wang C, Wang C, Hong X, Miao J, Liao Y, et al. An essential role for Wnt/β-catenin signaling in mediating hypertensive heart disease. Scientific reports. 2018;8(1)1-14.

Original Article

The Effect of 12 Weeks of Endurance Training on Wnt1, B-Catenin and Cyclind1 Gene and Protein Expression And Echocardiographic Indices in Right Ventricle of Rats

Received: 11/04/2022 - Accepted: 06/08/2022

Farzaneh Maleki [1]
Javad Mehrabani [1*]
Alireza Imani [2]

1 Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
2 Department of Physiology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Email: mehrabanij@guilam.ac.ir

Abstract

Introduction: Left ventricle remodeling by endurance training is relatively well established, but in the case of the right ventricle, the findings are paucity and controversial, and more research is needed. Therefore, this study was performed to evaluate the effects of intense endurance exercise on the right ventricle and to investigate the role of Wnt/β-catenin signaling in this field.

Materials and Methods: In this experimental study, 16 male Wistar rats were randomly divided into control and training groups. The training group underwent intense endurance training, including a 12-week treadmill program. After echocardiography, the rats' hearts were extracted and collagen deposition was assessed by Masson trichrome staining, and Wnt1, β-catenin and cyclinD1 mRNA and protein levels in right ventricle were evaluated by RT-PCR and Western blotting, respectively. Independent t-test was used to compare the means between the control and exercise groups.

Results: Wnt1, β-Catenin and CyclinD1 mRNA levels in the training group were nonsignificantly higher than the control group (0.16 ± 0.044 vs 0.12 ± 0.029, 0.03 ± 0.008 vs 0.01 ± 0.001 and 0.0017 ± 0.0005 vs 0.0013 ± 0.0002; respectively). Western blot results showed statistically significant changes in Wnt1 (training group 0.75 ± 0.014 vs. control group 0.19 ± 0.005; P <0.0001).), B-Catenin (exercise group 0.68 ± 0.014 vs. control group 0.19 ± 0.018; P <0.0001) and CyclinD1 protein levels (exercise group 0.69 ± 0.012 vs. control group 0.013 ± 0.22; P <0.0001). The results of Masson Trichrome staining to identify collagen deposition show that there is no statistically significant difference between the training group (12 ± 0.72) and the control group (11.75 ± 1.22). The echocardiographic indices of the training group were not significantly different from the control group.

Conclusion: It seems that prolonged intense endurance training may lead to right ventricular hypertrophy by activating Wnt/β-catenin signaling.

Keywords: Right Ventricular Hypertrophy, Intense endurance training, Wnt/β-Catenin Signaling , Echocardiography.

Acknowledgement: There is no conflict of interest