مقاله پژوهشی

اثر تمرین شدید و متوسط هوازی اینتروال و مصرف کورکومین بر بیان ژن c-Kit در سلول‌های بنیادی قلب موش‌های پیر

شریف رضائی[۱]، حسن متین همایی[۱*]، محمد علی آذربایجانی[۱]، پروین فرزانگی[۲]

۱- گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲- گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۵/۲۶ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۰۹/۱۴

چکیده

زمینه و هدف: سلول‌های c-Kit$^+$ مهم‌ترین سلول‌های بنیادی قلب بوده و دارای ویژگی مایوژنیک و واسکولوژنیک هستند. تمرین ورزشی موجب تحریک این سلول‌ها می‌شود. این مطالعه باهدف بررسی اثر دو عامل تمرین شدید و متوسط هوازی اینتروال و مصرف کورکومین بر بیان ژن c-Kit در سلول‌های بنیادی قلب موش‌های پیر طراحی شده است.

مواد و روش‌ها: ۳۵ سر موش صحرایی ماده مسن نژاد ویستار حدود دو سال به‌طور تصادفی به ۵ گروه کنترل، سالین، کورکومین، تمرین متوسط+کورکومین و تمرین شدید+کورکومین تقسیم شدند. کورکومین به مقدار ۳۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در گروه‌های تجربی ۳ روز در هفته به‌صورت گاواژ داده شد. گروه سالین نیز، به همان میزان سالین دریافت کرد. هر دو گروه تمرین، ۸ هفته و هر هفته ۳ جلسه با دو شدت متوسط و شدید روی تردمیل تمرین کردند. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و گاواژ، بیان ژن c-Kit در سلول‌های بنیادی بافت قلب اندازه‌گیری شد.

نتایج: نتایج نشان داد که در گروه کورکومین، میزان بیان ژن c-Kit نسبت به گروه کنترل (P=۰/۰۰۳) افزایش معناداری داشت. میانگین گروه تمرین متوسط+کورکومین به‌طور معناداری بالاتر از گروه‌های کورکومین، سالین و کنترل بود (P<۰/۰۰۱). بالاترین افزایش میزان بیان ژن c-Kit در گروه تمرین شدید+کورکومین اتفاق افتاد (P<۰/۰۰۱).

نتیجه‌گیری: مصرف منظم کورکومین به‌تنهایی و همراه با انجام تمرین منظم هوازی اینتروال به‌طور معناداری میزان سلول‌های بنیادی قلبی را افزایش می‌دهد و می‌تواند در ترمیم و بازسازی قلب مؤثر باشد. اثر تمرین منظم بر میزان سلول‌های بنیادی قلبی وابسته به‌شدت تمرین است.

کلمات کلیدی: تمرین متوسط و شدید، کورکومین، سلول‌های بنیادی قلبی، موش پیر

مقدمه

بیماری‌های قلبی مشکل اصلی سلامتی و از علل مرگ‌ومیر در سراسر جهان هستند. سکته قلبی و کاردیومایوپاتی عامل از دست دادن بافت قلب و عروق بوده که برای حفظ عملکرد و تمامیت قلب ضروری هستند (۱). تا چندی پیش تصور بر این بود که قلب یک اندام کاملاً تمایزیافته است و قابلیت تجدید درونی بسیار اندکی دارد. پیدا شدن سلول‌های مولد کاردیومیوسیت در قلب، این باور را ایجاد کرد که احتمالاً قلب نیز تجدیدپذیر است (۲). با شناسایی سلول‌های پیش‌ساز و بنیادی قلب (Cardiac Stem Cells: CSCs) دریچه‌های جدیدی جهت بازسازی و ترمیم مستقیم بافت قلب گشوده شد. هموستاز بافت قلب با حضور سلول‌های بنیادی قلب (CSCs) که در نیچه قلب سازمان‌دهی شده‌اند، حفظ می‌شود (۳). این سلول‌های بنیادی شامل c-kit+، Sca-1+ و سلول‌های بنیادی مزانشیمال قلب (Cardiac Mesenchymal Stem Cells) هستند. c-kit+ و Sca-1+ می‌توانند از طریق مارکرهای فنوتیپ و کلونوژنیک و ظرفیت خود نوزایی و همچنین قابلیت تمایز، به سلول‌های قلبی بزرگ، مایوسیت‌ها، سلول‌های اندوتلیال و سلول‌های عضله صاف متمایز شوند (۴).

یک مطالعه اخیر نشان داد که سلول‌های پروژنیتور c-kit+ قلب انسان از طریق پروتکل کشت تک‌سلولی با هضم آنزیمی به‌آسانی گسترش و غنی می‌شود (۵). مدل‌های حیوانی نیز نشان دادند که پیوند سلول‌های بنیادی در قلب توانسته بیان c-kit+ را

* **نویسنده مسئول: حسن متین همایی**، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
Email:hasanmatinhomaee@gmail.com

افزایش دهد و ساخت عضله قلبی و عروق خونی جدید را تحریک نماید (۲ و ۶). سلول‌های c-Kit+ که به‌طور عمده در شیار دهلیزی بطنی ساکن است (۲) در بازسازی قلب آسیب‌دیده دوباره بیان می‌شود (۷). گزارش‌های قبلی نشان می‌دهد بین بیماری‌های تنگی آئورت، ایسکمی حاد و مزمن و کاردیومیوپاتی و افزایش تعداد c-kit+ ارتباط وجود دارد (۸-۹). گزارش‌شده است که کاردیومایوسیت‌ها به میزان ۱ و ۰/۴۵ درصد در سال از سن ۲۵ تا ۷۵ سالگی نوسازی می‌شوند و به‌عبارت‌دیگر نیمی از تارهای عضلانی قلب در طول عمر طبیعی انسان جایگزین می‌شوند (۱۰). کورکومین موجود در زردچوبه به‌عنوان یک مکمل دارویی با اثرات ضداکسایشی در غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد شناخته‌شده است (۱۱). زردچوبه حاوی یک گروه از ترکیبات پلی فنولیک شامل سه فعال زیستی و دارویی کورکومین (کورکومین I)، دمتوکسی کورکومین (کورکومین II) و بیس دمتوکسی کورکومین (کورکومین III) است (۱۲).

آزمایش‌ها نشان داده است که کورکومین دارای اثرات ضد استرس اکسیداتیو، ضدالتهاب و ضد سرطان است. این ماده در فرایندهایی مانند تکثیر سلولی، تمایز و مهاجرت سلولی نیز نقش ایفا می‌کند. این طیف گسترده عملکردی کورکومین به‌واسطه برهم‌کنش آن با مسیرهای پیام‌دهی درون‌سلولی است (۱۳). همچنین توانایی بالای کورکومین در جذب و جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد و مهار التهاب آن را به‌عنوان ماده شیمیایی مهارکننده سرطان و مهار رشد تومور مطرح می‌سازد (۱۴). کورکومین در غلظت‌های بالا رادیکال‌های آزاد را جمع‌آوری می‌کند و در غلظت‌های پایین موجب فعال‌سازی یا مهار یک یا چند مسیر انتقال پیام در سلول می‌شود. در سلول‌های سرطانی، کورکومین می‌تواند مسیرهای پیام‌رسانی مرتبط با فاکتورهای رشد نظیر کینازهای خارج سلولی و پروتئین کیناز C را مهار کند (۱۴). این ماده در درمان انواع مختلفی از بیماری‌های التهابی مانند سرطان، دیابت، بیماری‌های قلبی عروقی، آرتریت و بیماری آلزایمر ظرفیت بالقوه‌ای دارد (۱۱). اخیراً مشاهده‌شده است که کورکومین اثرات دوگانه بر کشت سلول‌های بنیادی عصبی دارد: غلظت‌های پایین آن تکثیر و تمایز سلول‌های پیش‌ساز عصبی را تحریک می‌کند درحالی‌که غلظت‌های بالای کورکومین سمی است (۱۵). مطالعات نشان داده‌اند که تمرین ورزشی موجب افزایش میزان بیان ژن c-Kit بافت قلب شده (۱۶-۱۸) و این افزایش ناشی از تمرین در بطن چپ زودتر از بطن راست اتفاق می‌افتد (۱۶). گزارش‌شده است که کورکومین عملکرد ورزشی را بهبود می‌دهد و خستگی ناشی از تمرین را به تأخیر می‌اندازد (۱۹). مطالعات اثر ترکیبی تمرین و کورکومین روی عملکرد قلب و عروق نشان می‌دهد که تمرین منظم و مصرف کورکومین موجب افزایش عملکرد بطن چپ (۲۰) و همچنین عملکرد اندوتلیال عروق می‌شود (۲۱). ولی تاکنون اثر ترکیبی تمرین و کورکومین روی سلول‌های بنیادی قلب بررسی نشده است.

آسیب اکسیداتیو سلول‌های انسان با سن اتفاق می‌افتد و از عوامل اصلی بیماری‌های دژنراتیو مرتبط با پیری مانند سرطان، آلزایمر، بیماری‌های قلبی و عروقی و اختلال در عملکرد سیستم عصبی است (۲۲). سالمندی از پدیده‌های مطرح در عرصه بهداشت و سلامت جهانی است. با رشد سریع جمعیت سالمندی تخمین زده می‌شود که تا ۴۰ سال آینده، جمعیت بالای ۶۵ سال جهان ۲ برابر می‌شود (۲۳). در ایران نیز بر اساس سرشماری سال ۱۳۹۰، سالمندان، ۸/۲۴ درصد جمعیت کشور را شامل می‌شوند. برآورده شده است تا سال ۱۴۰۰، ۱۰ درصد جمعیت کشور را سالمندان تشکیل دهند (۲۳) با در نظر گرفتن روند رو به رشد جمعیت سالمندی و کاهش توانایی‌های جسمی، روانی و فراوانی بیشتر بیماری‌های مزمن در سالمندان توجه به توانمندسازی آن‌ها یک ضرورت محسوب می‌شود زیرا فراوانی بیماری‌های مزمن در سالمندان باعث شده است که بیشتر بودجه بهداشتی و درمانی صرف درمان و مراقبت آن‌ها شود.

مطالعات نشان می‌دهد که تمرین سبب حفظ و ارتقاء سلامت قلبی- عروقی شده و مانع ایجاد آترواسکلروزیس می‌شود (۲۶-۲۴). ولی اثر شدت تمرین و مصرف کورکومین بر سلامت قلب و عروق کمتر موردبررسی قرارگرفته و نیاز به مطالعات بیشتر در این زمینه احساس می‌شود. همچنین تاکنون اثر کورکومین به‌ویژه همراه با فعالیت بدنی بر سلول‌های c-kit انجام‌نشده است. در این پژوهش ما سعی کردیم که برای اولین بار نقش هم‌زمان دو عامل تمرین و مصرف کورکومین را بر سلول‌های بنیادی قلب موش‌های پیر آزمایش نموده و با ترویج نتایج آن گام کوچکی در پیشگیری از مشکلات قلبی و کاهش هزینه‌های بهداشتی و سلامتی سالمندان برداریم.

مواد و روش‌ها

جامعه آماری این پژوهش موش‌های صحرایی ماده مسن نژاد

ویستار دوساله با میانگین وزن اولیه ۳۰۰-۲۵۰ گرم مرکز پژوهش و تکثیر حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد واحد ساری هستند. حیوانات مورد آزمایش در این پژوهش در طی مراحل پژوهش در قفس‌های پلی کربنات شفاف به ابعاد ۱۵ × ۱۵ × ۳۰ سانتی‌متر ساخت شرکت رازی راد، چرخه روشنایی به تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت، با دمای محیطی ۲±۲۲ درجه سلسیوس و رطوبت هوای ۵±۵۰ درصد همچنین با تهویه‌ی مناسب نگهداری شدند. میانگین و انحراف معیار وزن موش‌ها در گروه‌های تحقیق در جدول ۱ آورده شده است.

غذای آزمودنی‌های این پژوهش، بر اساس وزن‌کشی سه روز

جدول ۱- میانگین و انحراف معیار وزن موش‌ها در گروه‌های تحقیق برحسب گرم

گروه	انحراف معیار±میانگین
کنترل	۲۵۵/۵۲±۱/۴
سالین	۲۶۸/۴۴±۵۶/۱۷
کورکومین	۲۴۳/۶۷±۲۷/۶۳
تمرین متوسط +کورکومین	۲۶۶/۴۵±۲۶/۶۶
تمرین شدید +کورکومین	۲۶۴/۳۹±۳۳/۶۶

یک‌بار با ترازوی استاندارد ویژه و با توجه به جیره‌ی طبیعی ۱۰ گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن در روز در هر قفس قرار گرفت. در تمام مراحل پژوهش، آب موردنیاز حیوان به‌صورت آزاد در دسترس آن‌ها بود. از بین آنان ۳۵ سر موش انتخاب و پس از ورود به محیط پژوهش و آشنایی یک‌هفته‌ای با محیط جدید، به روش تصادفی به ۵ گروه (هر گروه ۷ سر موش) کنترل، سالین، تمرین هوازی با شدت متوسط+کورکومین و تمرین هوازی با شدت بالا+کورکومین تقسیم شدند. رت‌های گروه‌های تمرینی قبل از شروع پروتکل اصلی به‌منظور آشنایی با تریدمیل، به مدت پنج روز و هر روز پنج دقیقه، تمرین داده شدند. پس‌ازآن یک جلسه تمرین جهت اندازه‌گیری حداکثر شدت واماندگی انجام شد که میانگین آن ۲۸ متر در دقیقه بود. برنامه تمرینی اینتروال متوسط، شامل ۸ هفته ۳ جلسه در هفته و هر جلسه ۱۰ ست فعالیت ۱ دقیقه‌ای با شدت ۵۰ درصد شدت واماندگی و ۲ دقیقه استراحت بین ست‌ها بود که در هفته اول با ۱۴ متر در دقیقه شروع‌شده و هر هفته ۲ متر در دقیقه به‌سرعت افزوده شد تا در هفته هشتم به‌شدت ۲۸ متر در دقیقه رسید. برنامه تمرینی اینتروال شدید نیز مشابه تمرین متوسط ولی با شدت ۷۰ درصد شدت واماندگی انجام شد که در هفته اول با ۲۰ متر در دقیقه شروع و هر هفته ۲ متر در دقیقه به‌سرعت افزوده شد تا در هفته هشتم به‌شدت ۳۴ متر در دقیقه رسید. هم‌چنین پنج دقیقه زمان قبل و بعد از تمرین برای گرم و سرد کردن حیوانات در نظر گرفته شد. به‌این‌ترتیب مدت هر جلسه تمرین ۴۰ دقیقه در طول تحقیق ثابت بود. پروتکل تمرین توسط تریدمیل تمام‌خودکار انجام شد. کورکومین خالص از شرکت سیگما آلمان خریداری شد. مقدار ۳۰ میلی‌گرم کورکومین به ازای هر کیلوگرم وزن بدن ۳ روز در هفته به‌صورت گاواژ به گروه‌های مکمل و تمرین-مکمل داده شد. گروه دریافت‌کننده سالین هم به همان میزان مکمل به‌صورت گاواژ دریافت کرد. جدول ۲ شدت تمرین در هر هفته را در گروه‌های تجربی نشان می‌دهد.

جدول ۲- شدت تمرین در هر جلسه در گروه‌های تمرین متوسط و شدید

نوع تمرین شدت تمرین	تمرین متوسط (متر در دقیقه)	تمرین شدید (متر در دقیقه)
هفته اول	۱۴	۲۰
هفته دوم	۱۶	۲۲
هفته سوم	۱۸	۲۴
هفته چهارم	۲۰	۲۶
هفته پنجم	۲۲	۲۸
هفته ششم	۲۴	۳۰
هفته هفتم	۲۶	۳۲
هفته هشتم	۲۸	۳۴

هشت هفته پس از اجرای تحقیق تمام حیوانات با شرایط کاملاً مشابه و به دنبال ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتایی و ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و گاواژ، با تزریق داخل صفاقی کتامین (۶۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن موش‌ها) و زایلوزین (۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن موش‌ها) بی‌هوش

شده و پس از اطمینان از بی‌هوشی کامل با تست رفلکس قرنیه، سینه حیوان شکافته و بافت قلب جدا شد.

آنالیز کمی بیان ژن

استخراج RNA از بافت قلب با استفاده از Qiazol (کیت Qiagen، آلمان) با توجه به توصیه سازنده استخراج شد. به‌منظور از بین بردن احتمالی آلودگی RNA با DNA از آنزیم DNase عاری از RNase استفاده شد. مقادیر لازم بر حسب غلظت RNA استخراج‌شده تعیین گردید. بدین ترتیب به ازای یک میکروگرم RNAاستخراج‌شده یک میکرولیتر (DNase Fermentase) و یک میکرولیتر بافر 10x اضافه شد و حجم محلول با آب تیمار شده با DEPC به ۱۰ میکرولیتر رسانده شد. محلول حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد، سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۶۵ درجه سلسیوس قرار داده شد تا آنزیم غیرفعال شود. غلظت RNA به روش اسپکتروفتومتری (UV Eppendorff، آلمان) تعیین شد. جهت ساخت cDNA به ۰/۲- ۱ میکروگرم RNA استخراج‌شده ۱ میکرولیتر Oligo dt اضافه شد. حجم نهایی این مرحله باید ۱۲ میکرلیتر باشد. بدین ترتیب اگر RNA غلیظ‌تر بود مقدار کمتری از آن برداشته شد با آب تیمار شده با DEPC به حجم نهایی ۱۲ میکرولیتر رسانده شد. واکنش به مدت ۵ دقیقه در ۷۰- درجه سلسیوس قرار داده و سپس بلافاصله به یخ منتقل شد. به میکروفیوژ، ۴ میکرولیتر بافر 5X، ۲ میکرولیتر dNTP و ۱ میکرولیتر RNasin اضافه شد تا حجم نهایی به ۱۹ میکرولیتر برسد. محلول واکنش به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. یک میکرولیتر آنزیم RTبه واکنش اضافه و به مدت ۱ ساعت در ۴۲ درجه سلسیوس انکوبه گردید. برای متوقف کردن واکنش، میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. cDNA حاصل روی یخ قرار داده و تا زمان انجام واکنش PCR در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. برای طراحی پرایمرها ابتدا توالی mRNA مربوط به ژن c-Kit با استفاده از سایت NCBI استخراج شد. پرایمرها توسط نرم‌افزار کامپیوتری Allel ID ساخته و سپس هر پرایمر توسط نرم‌افزار BLAST جهت اطمینان از یکتا بودن محل جفت شدن پرایمرها مورد ارزیابی قرار گرفت. پرایمرها توسط شرکت سیناژن ساخته شد. در این تحقیق از ژن GAPDH به‌عنوان کنترل داخلی استفاده گردید. هر واکنش PCR با استفاده از (PCR master mix Applied Biosystems) و SYBR Green در دستگاه ABI Step One Detection Applied Biosystems, Sequence Systems.Foster City, CA طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. ۴۰ سیکل برای هر چرخه Real-time PCR در نظر گرفته شد و دماهای هر سیکل شامل ۹۴ درجه سلسیوس برای ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه تنظیم شدند. برای تمامی ژن‌های موردمطالعه نیز ژن رفرنس یعنی GAPDH جهت به دست آوردن دمای مناسب Anneling گرادیان دمایی انجام گردید. همچنین جهت بررسی efficiency پرایمرها، منحنی استاندارد اختصاصی هر ژن (سری‌های رقیق‌شده DNA) رسم گردید. نمودار Melting نیز جهت بررسی صحت واکنش‌های PCR انجام‌شده به‌صورت اختصاصی برای هر ژن و در هر بار از واکنش به همراه نمودار کنترل منفی جهت بررسی وجود آلودگی در هر واکنش مورد ارزیابی قرار گرفت. ژن‌های مرجع تقریباً برابر بود. با استفاده از قرار دادن داده‌ها در فرمول‌های ΔΔCt و ۲−ΔΔCt میزان بیان ژن هدف با ژن‌های مرجع نرمال‌سازی شد و در هر مرحله از کار، بیان ژن بلاستوسیست‌های گروه کنترل به‌عنوان کالیبراتور در نظر گرفته شد.

روش تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

کلیه عملیات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد. توصیف کمی داده‌ها با استفاده از شاخص‌های پراکندگی مرکزی از قبیل میانگین و انحراف استاندارد انجام و جهت تعیین نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیروویلک و جهت بررسی تجانس واریانس‌ها از آزمون لوین استفاده شد. هم‌چنین برای بررسی تغییرات معنی‌داری هریک از متغیرهای تحقیق، بین گروه‌های مختلف، از روش آنالیز واریانس یک‌راهه و در صورت مشاهده تفاوت معنی‌دار آماری از آزمون تعقیبی شفه جهت تعیین محل اختلاف بین گروهی استفاده شد. سطح معناداری c-Kit برای تمام محاسبات P<۰/۰۱ در نظر گرفته شد.

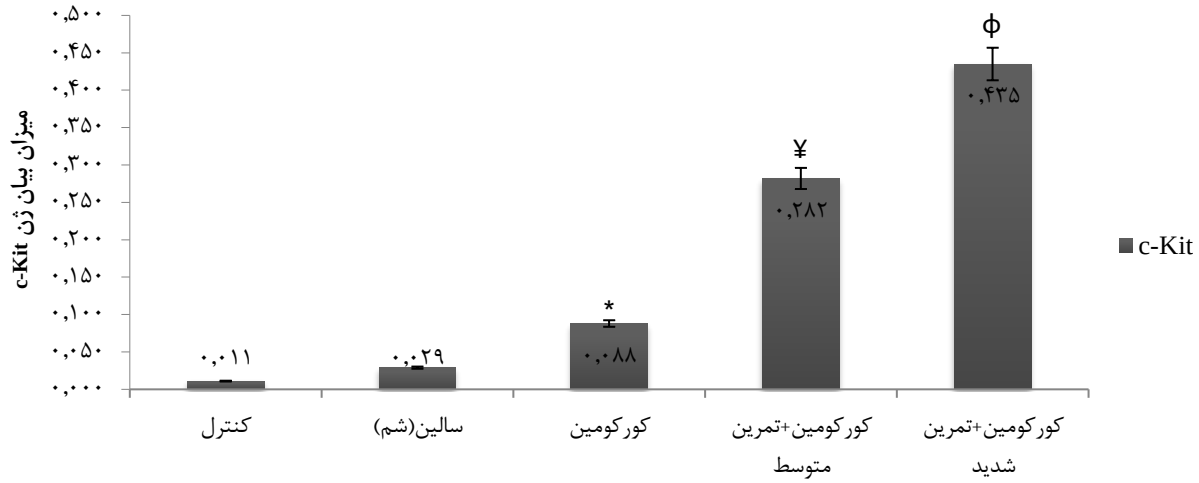
نتایج

تمامی موش‌های صحرایی مراحل تمرین و مصرف کورکومین را انجام دادند؛ و نتایج بیان ژن c-Kit به‌وسیله آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان داد که بین میانگین گروه‌ها اختلاف معناداری وجود دارد (P =۰/۰۰, F=۲۵۰/۴۴). نتایج آزمون تعقیبی شفه نشان داد که بین دو گروه کنترل و سالین تفاوتی وجود نداشت (P=۰/۸۹). در گروه کورکومین، میزان بیان ژن c-Kit افزایش معناداری نسبت به گروه کنترل (P=۰/۰۰۳) نشان

داد که نسبت به گروه سالین در P<۰/۰۱ معنادار نبود ولی در P<۰/۰۵ معنادار بود (P=۰/۰۲). بین میانگین‌های دو گروه تمرین متوسط+کورکومین و کورکومین اختلاف معنادار بود (P=۰/۰۰) و میزان بیان ژن متغیر c-Kit در گروه تمرین متوسط+کورکومین بالاتر بود. بالاترین افزایش میزان بیان ژن c-Kit در گروه تمرین شدید+کورکومین اتفاق افتاد؛ که حتی نسبت به گروه تمرین متوسط+کورکومین به‌طور معناداری بالاتر بود (P=۰/۰۰)؛ بنابراین هر دو عامل کورکومین و فعالیت بدنی باعث افزایش معنادار میزان بیان ژن c-Kit می‌شوند.

همان‌گونه که نمودار ۱ نشان می‌دهد بالاترین میانگین مربوط به گروه کورکومین+تمرین شدید است. ولی اختلاف هر دو گروه تمرین شدید و متوسط+ کورکومین اختلاف بسیار زیادی با گروه‌های کورکومین، سالین و کنترل دارد.

در بافت قلب می‌شود. با توجه به اینکه مقدار مصرف کورکومین در همه گروه‌های تحقیق یکسان بود، می‌توان نتیجه گرفت که اثر تمرینات هوازی اینتروال بر سلول‌های c-Kit وابسته به‌شدت تمرین است؛ و با افزایش شدت تمرین مقدار بیان ژن این سلول‌ها افزایش می‌یابد. بررسی دقیق‌تر یافته‌ها نشان می‌دهد که ترکیب تمرین اینتروال متوسط و کورکومین نسبت به کورکومین به‌تنهایی ۳ برابر بیان ژن سلول‌های بنیادی را بهبود می‌دهد و این نسبت در مورد تمرین شدید تا ۵ برابر مؤثرتر است. این در حالی است که میانگین c-Kit در گروه تمرین متوسط+کورکومین حدود ۱۰ برابر و در گروه تمرین شدید+کورکومین ۱۵ برابر میانگین گروه سالین بود. پیش‌ازاین



نمودار ۱– مقایسه میانگین بیان ژن c-Kit در گروه‌های کنترل، سالین، کورکومین، کورکومین+تمرین متوسط و کورکومین+تمرین شدید
* معنی‌داری نسبت به گروه کنترل ¥ معنی‌داری نسبت به گروه کورکومین، سالین و کنترلΦ معنی‌داری نسبت به همه گروه‌ها

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که سلول‌های بنیادی قلبی تحت تأثیر تمرینات اینتروال و مصرف کورکومین که یک ماده ضد اکسایشی است بیان می‌شود. به‌طوری‌که نه‌تنها مصرف هرکدام به‌تنهایی موجب افزایش بیان ژن این سلول‌ها شده بلکه مصرف هم‌زمان هردو عامل موجب افزایش مضاعف بیان ژن این سلول‌ها

الیسون و همکاران افزایش ۵ برابری سلول‌های بنیادی قلب را در گروه تمرین (بدون مکمل کورکومین) گزارش کرده بودند (۲۷). مخزن سلول‌های c-Kit اولین بار در قلب موش شناسایی شد (۲۸)؛ و این سلول‌ها دارای ویژگی‌های کلیدی مانند چند توانی (Multipotency)، شروع یک کلونی از سلول‌ها (Clonogenicity) و خود نوسازی (Self Renewing) هستند (۲۹). نشان داده‌شده است که c-Kit دارای پتانسیل قابل‌توجهی در ترمیم علت اصلی انواع بیماری‌های قلبی ازجمله سکته قلبی، اختلال مزمن قلب، کاردیومایوپاتی ناشی از دیابت، آسیب ایسکمی ریپرفیوژن و حتی

نقص مادرزادی قلب است (۳۰). c-Kit و Sca-1 می‌توانند از طریق مارکرهای فنوتیپ وکلونوژنیک و ظرفیت خود نوزایی و همچنین قابلیت تمایز، به سلول‌های قلبی بزرگ، مایوسیت‌ها، سلول‌های اندوتلیال و سلول‌های عضله صاف تبدیل شوند (۴). الیسون وهمکاران نیز نشان دادند که تمرین شنا منجر به افزایش نسبت قلب به وزن بدن شد و حجم مایوسیت‌ها افزایش یافت؛ و تعداد سلول‌های بنیادی قلب گروه تمرین در دیواره بطنی ۵ برابر افزایش یافت و فاکتور پیوند قلبی (GATA-4) در c-Kit قلب بیان شد (۲۷). همچنین نشان داده‌شده است که تمرین ورزشی در هفته اول، دوم و سوم میزان c-Kit را در بطن چپ موش بیان می‌کند ولی در بطن راست در هفته سوم افزایش مشاهده شد. این مطالعه نشان داد که هایپرتروفی قلبی ناشی از ورزش شنا آغازگر فعالیت سلول‌های c-Kit قلبی است (۱۶). وارینگ و همکاران، ۲۰۱۵، نشان دادند که تحریک سلول‌های بنیادی قلب با ۴ هفته تمرین کنترل‌شده شدید افزایش می‌یابد و ۴ هفته بی تمرینی باعث از بین رفتن این اثر می‌شود (۱۷). همچنین تمرین با شدت‌های کنترل‌شده از طریق افزایش بیان فاکتورهای رشد مایوسیت‌ها بازسازی قلب را آغاز کرده و متعاقب آن تمایز c-Kit را فعال می‌کند؛ که این موجب تولید سلول‌های جدید قلب می‌شود. این یافته نشان می‌دهد که سازگاری فیزیولوژیک قلبی بزرگ‌سالان ترکیبی از هایپرتروفی و هایپرپلازی بافت قلب است؛ و این سازگاری‌ها وابسته به‌شدت و مدت تمرین است (۱۸).

چند مسیر سیگنالینگ، ازجمله IGF-1-PI3K-AKT، نیتریک اکساید، Eya2، C / (EBP) و b-Cited4 برای شرکت در رشد قلبی ناشی از ورزش شناسایی‌شده‌اند (۳۱-۳۲)، همچنین به‌تازگی، گزارش‌شده است که miR-222 برای رشد قلبی ناشی از ورزش موردنیاز است (۳۳)؛ و مسیر SDF-1 / CXCR7 / AKT و SDF-1 / CXCR4 / ERK نقش مهمی در مهاجرت CSCs ایفا می‌کند. فسفوریلاسیون AKT فعالیت RAF-1 را مهار کرده که به‌نوبه خود ERK را دفسفریله می‌کند و موجب تنظیم منفی مهاجرت CSCs می‌شود (۳۴). محققان نشان دادند که کورکومین به‌طور قابل‌توجهی بر عملکرد قلب مؤثر است وانگ و همکاران،۲۰۱۲، نشان دادند که کورکومین به‌طور معناداری حجم پایان دیاستولی بطن چپ، حجم ضربه‌ای، کسر جهشی و ضخامت دیوار سپتوم قلب سکته کرده را بهبود می‌دهد؛ بنابراین کورکومین درترمیم قلب ناسالم و حفظ عملکرد قلبی بعد از ایسکمی و ریپرفیوژن مؤثر است؛ و برای بیمارانی که دچار حمله قلبی شده‌اند، دارای پتانسیل درمانی است (۳۵). این ماده با مهار تولید استرس اکسیداتیو، انتقال سیگنال NF-κB را متوقف کرده و بیان SCF/c-kit را در موش‌های دیابتی افزایش می‌دهد (۳۶). کریمرز و همکاران نشان داده‌اند که کورکومین از طریق یک مکانیسم وابسته به HO-1 (Heme Oxygenase-1) و به‌احتمال‌زیاد از طریق تولید مونوکسید کربن از مرگ ناشی از H_2O_2 سلول‌های بنیادی مزانشیمال محافظت می‌کند. پیش القاء یا مدیریت HO-1 از مولکول‌های رها کننده مونوکسید کربن یک استراتژی جالب به‌منظور بهبود سلول‌های بنیادی ایجاد می‌کند (۳۷). در برخی مطالعات نشان داده‌شده است که ترکیب تمرین ورزشی و مصرف کورکومین نسبت به مداخله این دو به‌تنهایی اثر بیشتری در کاهش پس بار بطن چپ (۲۰)، افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سرم و بهبود سمیت ناشی از سرب قلب (۳۸)، بهبود عملکرد اندوتلیال عروق زنان سالمند (۲۱) و کاهش التهاب (۳۹) دارد. همچنین هوانگ و همکاران، ۲۰۱۵، با اندازه‌گیری فاکتورهای درگیر در خستگی، عملکرد عضلانی و ذخیره گلیکوژن عضله نشان دادند که مصرف خوراکی کورکومین در طیف وسیعی عملکرد ورزشی و ذخیره گلیکوژن عضله را افزایش داده و از خستگی پیشگیری می‌کند (۱۹). ولی در مورد اثر کورکومین به همراه تمرین بر سلول‌های بنیادی قلبی تاکنون مطالعه‌ای صورت نگرفته است. نتایج تحقیق حاضر با سایر مطالعات قبلی که افزایش میزان سلول‌های بنیادی قلبی پس از تمرین هوازی را گزارش کرده بودند (۱۶-۱۸ و ۲۷) همسو بود. همچنین ازنظر وابسته بودن میزان c-Kit به‌شدت تمرین با تحقیق وارینگ و همکاران، ۲۰۱۵، (۱۷) همسو بود. لذا به نظر می‌رسد ورزش از طریق تحریک سلول‌های بنیادی تعداد مایوسیت‌ها را افزایش داده و بافت فرسوده قلب را ترمیم می‌کند (۱۸ و ۲۷)؛ بنابراین برای حفظ کارایی قلب به‌ویژه در سن سالمندی مؤثر است. همچنین با توجه به افزایش چند برابری بیان ژن c-Kit در گروه‌های تمرین و یکسان بودن مقدار مصرف کورکومین در هر سه گروه تجربی، می‌توان گفت که تمرین هوازی اینتروال هم‌زمان با مصرف کورکومین نسبت به کورکومین به‌تنهایی در بازسازی و ترمیم بیشتر بافت قلب مؤثرتر است. بااین‌حال پیشنهاد می‌شود، تحقیقات دیگری به‌منظور بررسی تأثیر نوع و شدت تمرین و همچنین مکمل‌های دیگر در سنین مختلف بر سلول‌های بنیادی قلب طراحی و اجرا گردد.

نتیجه‌گیری

یافته‌های ما نشان داد که مصرف ۸ هفته کورکومین به‌طور معناداری میزان سلول‌های بنیادی قلبی را افزایش می‌دهد؛ و چنانچه مصرف آن با انجام فعالیت بدنی منظم همراه شود تاثیرآن چندین برابر شده و می‌تواند موجب بهبودی بیشتر بافت قلب شود. همچنین ما نشان دادیم که اثر فعالیت بدنی بر میزان سلول‌های بنیادی قلبی وابسته به‌شدت تمرین است؛ و تمرین هوازی اینتروال شدید نسبت به تمرین هوازی اینتروال متوسط به‌طور معناداری بر افزایش میزان بیان ژن سلول‌های بنیادی قلب مؤثرتر است. یافته‌های این تحقیق ظرفیت احیاکنندگی درون‌زاد قلب بزرگ‌سالان به‌وسیله سلول‌های بنیادی را برجسته‌تر می‌کند؛ و می‌تواند در پیشگیری و حفظ سلامت قلب سالمندان و همچنین بازتوانی بیماران قلبی مورداستفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق از رساله دکتری شریف رضایی و با هزینه شخصی انجام‌شده است. از دانشگاه آزاد اسلامی تهران مرکزی تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Yoon YS, Wecker A, Heyd L,Park JS, Tkebuchava T, Kusano K, et al. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow re-generate myocardium after myocardial infarction. J. Clin. Invest. 2005;115(2):326–338.
2. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. Cell 2003; 114(6): 763-76.
3. Barile L, Messina E, Giacomello A, Marban E. Endogenous cardiac stem cells. Prog Cardiovasc Dis. 2007;50(1):31– 48.
4. Wang H, Chen H, Feng B, Wang X, He X, Hu R, et al. Isolation and characterization of a Sca-1 +/CD31- progenitor cell lineage derived from mouse heart tissue. BMC Biotechnol. 2014;14(1); 75.
5. Choi SH, Jung SY, Suh W, Baek SH, Kwon SM. Establishment of isolation and expansion protocols for human cardiac C-kit-positive progenitor cells for stem cell therapy. Transplant Proc. 2013; 45(1): 420-426.
6. Tang XL, Rokosh G, Sanganalmath SK, Yuan F, Sato H, Mu J, et al. Intracoronary administration of cardiac progenitor cells alleviates left ventricular dysfunction in rats with a 30-day-old infarction. Circulation. 2010;121(2):293–305.
7. Kubin T, Poling J, Kostin S, Gajawada P, Hein S, Rees W, et al. Oncostatin M is a major me-diator of cardiomyocyte dedifferentiation and remodeling. Cell Stem Cell. 2011;9(5):420–432.
8. Kubo H, Jaleel N, Kumarapeli A, Berretta RM, Bratinov G, Shan X, et al. Increased cardiac myocyte progenitors in failing human hearts. Circulation.2008;118(6):649–657.
9. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, et al. Evidence that human cardiac Myocytes divide after myocardial infarction. N Engl J Med.2001;344(23):1750–1757.
10. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabe-Heider F, Walsh S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. Science. 2009; 324(5923): 98-102.
11. Daniel S, Limson JL, Dairam A, Watkins GM, Daya S. Throughmetal binding, curcumin protects against lead- and cadmium-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates and againstlead-induced tissue damage in rat brain. J Inorg Biochem.2004;98(2):266-75.
12. Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. Biochem Pharmacol. 2008;75(4):787-809.
13. Subramanian M, Sreejayan, Rao MN ,Devasagayam TP, et al. Diminution of singletoxygen-induced DNA damage by curcumin andrelated antioxidants. Mutat Res.1994; 311(2):249–255.
14. Dhandapani KM, Mahesh VB, Brann DW. Curcumin suppresses growth and chemoresistance of human glioblastoma cells via AP-1 and NFkappaB transcription factors. JNeurochem. 2007;102(2): 522–538.
15. Rajabi M, Parivar K, Nabiouni M, Yaghmaii P. Effect of Curcumin on Rat Embryonic Neuroprogenitor Cells Under in Vitro Conditions. Journal of Cell & Tissue. 2014;4(4): 435- 443.[in Persian]

16. Xiao J, Tianzhao XU, Jin LI, Dongcao LV, Ping C, Qiulian Z, et al, Exercise-induced physiological hypertrophy initiates activation of cardiac progenitor cells. Int J Clin Exp Pathol. 2014;7(2):663-669.
17. Waring CD, Henning BJ, Smith AJ, Nadal -Ginard B, Torella D, Ellison GM. Cardiac adaptations from 4 weeks of intensity- controlled vigorous exercise are lost after a similar period of detraining. Physiol Rep. 2015;3(2):e12302.
18. Waring CD, Vicinanza C, Papalamprou A, Smith AJ, Purushothaman S, Goldspink DF. The adult heart responds to increased workload with physiologic hypertrophy, cardiac stem cell activation, and new myocyte formation. European Heart Journal. 2014;35(39): 2722–2731.
19. Huang WC, Chiu WC, Chuang HL, Tang DW, Lee ZM, Wei L, et al. Effect of Curcumin S upplementation on Physiological Fatigue and Physical P erformance in Mice. Nutrients. 2015; 7(2): 905- 921..
20. Sugawara J, Akazawa N, Miyaki A, Choi Y, Tanabe Y, Imai T, et al. Effect of Endurance Exercise Training and Curcumin Intake on Central Arterial Hemodynamics in Postmenopausal Women: Pilot Study. American Journal Of Hypertension. 2012; 25 (6): 651- 656.
21. Akazawa N, Choi Y, Miyaki A , Tanabe Y , Sugawara J, Ajisaka R, et al. Effects of curcumin intake and aerobic exercise training on arterial compliance in postmenopausal women. Jurnal of Artery. 2013; 7(1): 67–72.
22. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen T,. Oxidants, antioxidants and degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci.1993;90(17):7915–7922.
23. WHO. Kobe center.Global health expectancy research among older people. Aging and Health Technical Report Series. 2002; 10.Iran Statistics Center, results of Iranian people Census 1390. [in Persian].
24. Sofi F, Capalbo A, Cesari F, Abbate R, Gensini GF. Physical activity during leisure time and primary prevention of coronary heart disease: an updated meta-analysis of cohort studies. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil. 2008;15(3): 247–257.
25. Thijssen DH, Maiorana AJ, O'Driscoll G, Cable NT, Hopman MT, Green DJ. Impact of inactivity and exercise on the vasculature in humans. Eur J Appl Physiol. 2010;108(5): 845–875.
26. Lenk K, Uhlemann M, Schuler G, Adams V. Role of endothelial progenitor cells in the beneficial effects of physical activity on atherosclerosis and coronary artery disease. J Appl Physiol.2011; 111(1):321-328
27. Ellison GM, Vicinanza C, Mendicino I, Sacco W, Purushothaman S, Indolfi C, et al, Exercise-induced cardiac stem cell activation and ensuing myocyte hyperplasia contribute to left ventricular remodeling, Proc Physiol Soc. 2008;11(1): C17.
28. Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. Physiol Rev. 2005;85(4):1373–416. 29. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. Cell. 2003;114(6):763–76.
30. Akhtar S. c-kit positive cardiac stem cells as a potential candidate for heart repair, developments, challenges and future implications. OA Stem Cells. 2013; 1(1):4.
31. Lerchenmuller C, Rosenzweig A. Mecha-nisms of exercise-induced cardiac growth. Drug Discov Today2014; 19(7): 1003 –9.
32. Tao L, Bei Y, Zhang H, Xiao J, Li X. Exercise for the heart: signaling pathways. Oncotarget. 2015; 6(25): 20773 –84.
33. Liu X, Xiao J, Zhu H, Wei X, Platt C, Damilano F, et al. miR-222 is necessary for exercise-induced cardiacgrowth and protects against pathological cardiac remodeling. Cell Metab.2015; 21(4):584–95.
34.Dong C, Yanli X, Ke Z, Ying W, Shiying Z, Dong K, et al. Crosstalk between SDF-1/CXCR4 and SDF-1/CXCR7 in cardiac stem cell migration. Scirep. 2015;5(1):16813.
35. Wang NP, Wang ZF, Tootle S, Philip T, Zhao ZQ. Curcumin promotes cardiac repair and ameliorates cardiac dysfunction following myocardial infarction. British Journal of Pharmacology. 2012;167(7): 1550–1562.
36. Jin QH, Shen HX, Wang H, Shou QY, Liu Q. Curcum in improves expression of SCF/c-kit through attenuating oxidative stress and NF- κB activation ingastric tissues of diabetic gastroparesis rats. Diabetology and Metabolic Syndrome. 2013;5(1):12.
37. Cremers NAJ, Lundvig DMS, Van Dalen SCM, Schelbergen RF, Van Lent PLE,Szarek WA, et al. Curcumin-Induced Heme Oxygenase-1 Expression Prevents H_2O_2-Induced Cell Death in Wild Type and Heme Oxygenase-2 Knockout Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. Int J Mol Sci. 2014;15(10):17974-17999.
38. Dabidi Roshan V, Rahimi M, Shirinbayan V, Mahjoub S, Hosseinzadeh M. Protective effect of the combination of exercise and curcumin supplementation on cardiac system in rats exposed to lead. International Journal of Nutrition and Metabolism. 2012;4(8):114-120.
39. Nazarali P, Shadkam T, Shemshaki A. Effect of Exercise Training with Curcuma Longa Supplementation on Liver Enzymes (AST-ALT) and CRP Inflammatory Marker in Inactive Women. International Journal of Sport Studies. 2015;5(6), 726-732.

Original Article

The Effect of Intense and Moderate Interval Aerobic Exercise and Curcumin Consumption on the Gene Expression of c-Kit in Stem Cells of Old Rats Heart

Rezaei Sh[1], Matinhomaee H[1]*, Azarbayjani MA[1], Farzanegi P[2]

1. Department of Sport Physiology, Tehran Central Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Sport Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran

Received: 16 Aug 2016 Accepted: 04 Dec 2016

Abstract

Background & Objectives: C-kit+ cells are the most important cardiac stem cells and have Myogenic and Vasculogenic properties. Exercise training tends to stimulate these cells. This study aims to investigate the effect of intense and moderate interval aerobic training and curcumin consumption on the gene expression of c-Kit stem cells of heart in old rats.

Materials &Methods: 35 Wistar old female rats of about two years were randomly divided into 5 groups: control, saline, curcumin, moderate training + curcumin and intense training + curcumin. 30 mg Curcumin for each kg of their body weight was given by gavage to the rats in experimental groups 3 days a week. The saline group was given the same amount of saline. Both groups underwent interval aerobic training on treadmill 3 sessions per week for 8 weeks, with high and medium intensity. 48 hours after the last training and gavage, c-Kit gene expression for cardiac stem cells was measured.

Results: The results indicated that in each Curcumin group, c-Kit level increased significantly compared to that of the control group (P=0.003). The mean of moderate exercise + curcumin group was significantly higher than the mean of curcumin, saline and control groups (P<0.001). The highest increase in the level of c-Kit gene expression occurred in the intense training + curcumin group which showed a significant difference with other groups (P<0.001).

Conclusion: Regular consumption of curcumin alone or combined with regular aerobic interval exercise training can significantly increase the cardiac stem cells and can be effective in restoring old rats heart. The effect of exercise on the cardiac stem cells, however, appears to be dependent on the intensity of training.

Keywords: Moderate and Intense Training, Curcumin, Cardiac Stem Cells, Old Rat

***Corresponding author: Hasan Matinhomaee,** Department of Sport Physiology,Tehran Central Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
Email: hasanmatinhomaee@gmail.com

Journal of Fasa University of Medical Sciences 7 (2017): 68-76