



## تأثیر شش هفته تمرین تداومی و تناوبی شدید بر بیان ژن عامل رشد بتا، ماتریکس متالوپروتیناز-۲ و مهارکننده بافتی متالوپروتیناز-۱ بافت ریه در رت‌های نر ویستار

شادی فهمام: دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزش، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، پردیس البرز، دانشگاه تهران، تهران، ایران

ID رحمان سوری: دانشیار، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران (نویسنده مسئول) soori@ut.ac.ir

فاطمه شب خیز: دانشیار، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

سیروس چوبینه: دانشیار، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

### چکیده

#### کلیدواژه‌ها

تمرین تداومی،  
تمرین تناوبی شدید،  
عامل تغییر رشد بتا،  
ماتریکس متالوپروتیناز-۲،  
مهارکننده بافتی متالوپروتیناز-۱،  
رت‌های صحرائی

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۴/۰۱  
تاریخ چاپ: ۹۹/۰۷/۰۱

**زمینه و هدف:** مطالعات نشان می‌دهد که داروهای ضد التهاب درمان موثری برای فیبروز و التهاب ریوی نبوده است. هدف از این تحقیق بررسی تأثیر شش هفته تمرینات تداومی و تناوبی شدید بر بیان ژن عامل رشد بتا، ماتریکس متالوپروتیناز-۲ و مهارکننده بافتی متالوپروتیناز-۱ بافت ریه در رت‌های نر ویستار بود.

**روش کار:** در این مطالعه تجربی، ۱۸ سر رت نر ویستار (۶ تا ۸ ماهه) انتخاب و به طور تصادفی در سه گروه کنترل (Con)، تمرین تداومی شدت متوسط (MICT) و تمرین تناوبی شدید (HIIT) قرار گرفتند. برنامه تمرین تداومی شامل ۱۵ تا ۳۰ دقیقه دویدن روی ترمیل با شدت ۷۰–۶۵ VO<sub>2</sub>max، پنج روز در هفته به مدت عهفتنه بود. برنامه تمرین تناوبی شدید نیز شامل ۵ تا ۸ تناوب (۲ دقیقه‌ای) با شدت ۸۰ تا ۱۰۰ درصد VO<sub>2</sub>max و ۲ دقیقه ریکاوری با شدت ۵۰ تا ۶۰ درصد VO<sub>2</sub>max بین هر تناوب (به مدت عهفتنه بود). بیان ژن TIMP-1 و MMP-2، TGF-β و ۱ با روش Real Time PCR با میزان معنی‌داری <0.05 P تجزیه و تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** تمرینات تداومی و تناوبی شدید به کاهش معنی‌دار بیان ژن-2 MMP و افزایش معنی‌دار بیان ژن-1 TIMP-1 و TGF-β بافت ریه نسبت به گروه کنترل منجر شدند ( $p=0.000$ ). تفاوت معنی‌داری در بیان نسبی MMP-2 در گروه تمرین تناوبی تمرین تداومی و تمرین تناوبی شدید مشاهده نشد ( $p=0.832$ ), اما بیان ژن TIMP-1 و TGF-β در گروه تمرین تناوبی شدید نسبت به گروه تمرین تداومی به میزان معنی‌داری بالاتر بود ( $p=0.000$ ).

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد، تمرین تناوبی شدید احتمالاً می‌تواند مداخله موثرتری برای کاهش فیبروز و التهاب بافت ریه باشد.

**تعارض منافع:** گزارش نشده است.  
**منبع حمایت کننده:** حامی مالی نداشته است.

### شیوه استناد به این مقاله:

Fahham Sh, Soori R, Shab Khiz F, Choobineh S. Effects of 6-weeks of continuous and HIIT training on gene expression of TGF-B, MMP-2 and TIMP-1 in lung tissues of male wistar rats. Razi J Med Sci. 2020;27(7):1-11.

\* منتشر این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.



Original Article

## Effects of 6-weeks of continuous and HIIT training on gene expression of TGF-B, MMP-2 and TIMP-1 in lung tissues of male wistar rats

Shadi Fahham, PhD Student, Department of Exercise Physiology, Alborz Campus at University of Tehran, Tehran, Iran

✉ Rahman Soori, Associate Professor, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran (\*Corresponding author) soori@ut.ac.ir

Fatemeh Shab Khiz, Associate Professor, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran

Siroos Choobineh, Associate Professor, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran

### Abstract

**Background:** In pathological studies, there is usually a low degree of Pulmonary inflammation, and due to the presence of inflammatory cells in the lung tissue, there are discussions about the role of these cells in the progression of the disease (1). Matrix metalloproteinases (MMPs) are super family of proteolytic enzymes that play an important role in the breakdown of extracellular matrix and fibrosis (2, 3). MMP-2 has the potential to degrade wide range of extracellular matrix proteins, including type IV collagen, basement membrane, fibronectin and gelatin (6). Studies show that MMP-2 activity is increased in pulmonary fibrosis (7). The Tissue Inhibitor of MMPs (TIMPs) gene family are physiological inhibitors of MMPs that inhibit the activity of these proteases. TIMP / MMP imbalance is an important factor in the fibrogenic process (9). Also, in pulmonary fibrosis, the activity of MMPs is regulated by several factors, including growth factor, and inflammatory mediators may play an important role in modulating lung tissue damage and extracellular matrix degradation. Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) is a multifunctional cytokine that plays an important role in causing fibrosis in many tissues, including the lungs (10).

Studies show that exercise can help improve the levels of matrix metalloproteinases and their associated inflammatory factors. However, the results of studies in this field are contradictory, so, decrease in expression and serum levels of MMP-2 in rats following voluntary exercise and High-intensity interval training (HIIT) have been reported (12,13). On the other hand, 12 weeks of resistance training has been shown to increase MMP2 levels in rats (14). Also, significant increase (15) and no change (16) in TGF- $\beta$ 1 tissue values after HIIT was reported in rats.

The effect of different training methods on lung tissue has been considered. Therefore, the aim of this study was to investigate the effects of 6-weeks of continuous and HIIT training on gene expression of TGF-B, MMP-2 and TIMP-1 in lung tissues of male wistar rats.

**Methods:** This is a experimental study. 18 male wistar rats (6 to 8 months) were selected and randomly divided into three groups of control (Con), moderate intensity continuous training (MICT) and High-intensity interval training (HIIT) groups. The aerobic training program consisted of 15 to 30 minutes of treadmill running at 65-70% VO<sub>2max</sub> intensity, 5 days a week for 6 weeks. The HIIT program consisted of 5 to 8 alternations (2 minutes) of 80 to 100 percent VO<sub>2max</sub> and 2 minutes of recovery with 50 to 60 percent of VO<sub>2max</sub> between each period for 6 weeks (17). TGF- $\beta$ , MMP-2 and TIMP-1 gene expression in lung tissue was measured after training using Real Time PCR. Data were analyzed by one-way ANOVA and LSD post hoc test at the P <0.05.

### Keywords

Moderate-intensity  
Interval training,  
High-intensity interval  
training,  
Transforming growth  
Factor beta,  
Matrix  
metalloproteinase-2,  
Tissue inhibitor matrix  
metalloproteinase 1,  
Rats

Received: 21/06/2020

Published: 22/09/2020

**Results:** Table 4 shows the mean and standard deviation of research variables in different groups. The results showed that HIIT and MICT led to significant decrease in MMP-2 gene expression and significant increase in TIMP-1 and TGF- $\beta$  gene expression in lung tissue compared to the control group ( $P=0.001$ ). There was no significant difference in the relative expression of MMP-2 between the two groups of HIIT and MICT ( $P=0.832$ ), but TIMP-1 and TGF- $\beta$  gene expression was significantly higher in the HIIT group compared to the MICT group ( $P=0.001$ ) (Fig. 1-3).

**Conclusion:** The findings of the present study show that HIIT and MICT significantly decrease MMP-2 gene expression and significantly increase TIMP-1 and TGF- $\beta$  gene expression in lung tissues of male wistar rats. The findings of this study were consistent with the results of Previous research (12,13, 23, 27-29). Decreased gene expression of MMP-2 in response to training sessions can be attributed to the expression of endogenous protein inhibitors such as TIMP-1, alpha-2 macroglobulin and protease degradation. Also, the reduction of some inflammatory factors that stimulate MMP-2 due to interval training periods can play a role in this reduction (19). Therefore, according to the mechanisms involved in reducing MMP-2 expression and the findings of the present study, reducing MMP-2 in the HIIT and MICT groups compared to the control group can reduce the expression of TIMP-1 and TGF- $\beta$  genes after exercise. MMPs are highly regulated at the level of gene transcription and translation in the lung, their expression is through a variety of transcription factors (activators and suppressors, including growth factors, hormones, cytokines, cell adhesion molecules, proteins), extracellular matrix and their bioactive components and intracellular signaling agents (GTPases), all of which can directly or indirectly regulate the expression of MMPs (20). Therefore, HIIT and MICT may alter the gene expression levels of the MMP-2 in lung tissue by affecting the above factors. The reason for the increase in TGF- $\beta$ 1 following exercise is not well understood. However, oxidative stress and exercise-induced hypoxia are two possible mechanisms (33). Studies have shown that by increasing the expression of NADPH oxidase and decreasing the expression of antioxidant enzymes, increases the expression of TGF- $\beta$ 1 in tissue (34,35). HIIT is associated with hypoxia at the cell, which leads to increased expression of HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia-induced Factor 1- $\alpha$ ). This factor increases in cells in response to hypoxia and mediates several biological functions. There were some limitations in the present study, such as the lack of measurement of other MMPs. According to the results, it seems that HIIT training may be a more effective intervention to reduce lung fibrosis. Therefore, it is recommended to consider High-intensity interval training programs for the health of the respiratory system.

**Conflicts of interest:** None

**Funding:** None

**Cite this article as:**

Fahham Sh, Soori R, Shab Khiz F, Choobineh S. Effects of 6-weeks of continuous and HIIT training on gene expression of TGF-B, MMP-2 and TIMP-1 in lung tissues of male wistar rats. Razi J Med Sci. 2020;27(7):1-11.

\*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

## مقدمه

سلول‌ها ساخته شده و تمایزات بافت را با تاثیرگذاری بر روی تکثیر سلول، ساختار و مورفولوژی، مرگ برنامه‌ریزی شده سلول و ماتریکس خارج سلولی تنظیم می‌کند (۱۰).

مطالعات بر روی نمونه‌های انسانی نشان داده است که داروهای ضد التهاب مانند کورتیکوستروئیدها و آزیتوپرین درمان موثری برای فیبروز و التهاب ریوی نبوده است (۱۱). مطالعات نشان می‌دهد که تمرینات ورزشی می‌تواند به بهبود سطوح متالوپروتئینازهای ماتریکس و عوامل التهابی مرتبط با آن‌ها کمک کند. با این حال، نتایج مطالعات در این زمینه متناقض می‌باشد به طوری که کاهش بیان و سطح سرمی MMP-2 در رت‌های صحرایی متعاقب تمرین اختیاری و تمرین تناوبی شدید گزارش شده است (۱۲،۱۳). از طرفی، نشان داده شده است که ۱۲ هفته تمرین مقاومتی سطح MMP2 در رتها را افزایش می‌هد (۱۴). همچنین افزایش (۱۵) و عدم تغییر (۱۶) معنی‌دار مقادیر بافتی TGF- $\beta$ 1 متعاقب تمرین تناوبی شدید در رت‌های صحرایی گزارش شده است.

در مطالعات انجام شده، تاثیر روش‌های تمرینی مختلف بر بافت ریه مورد توجه قرار گرفته است. مشخص شده است تمرینات تناوبی شدید (HIIT) می‌توانند به عنوان یک جایگزین موثر تمرینات تداومی باشد متوسط (MICT) عمل کنند، تمرینات تناوبی شدید شامل تناوب‌های فعالیت‌های ورزشی باشد بسیار زیاد و وهله‌های استراحتی فعال باشد خیلی کم می‌باشند و بسیاری از سازگاری‌های فیزیولوژیک را همچون تمرین استقامتی منظم تحریک می‌کنند (۱۷،۱۸). با این وجود اثر این نوع تمرینات بر عوامل اثرگذار بر فیبروز و افزایش التهاب بافت ریه به درستی مشخص نیست. در زمینه اثر فعالیت ورزشی بر بیان ژن عوامل اثرگذار بر فیبروز و التهاب ریوی تحقیقات بسیار اندکی انجام شده و محدود تحقیقات صورت گرفته به نتایج متناقضی دست یافتند با توجه به نقش مهم ورزش و فعالیت بدنی در سلامت و پیشگیری و درمان بیماری‌ها به ویژه اختلالات ریوی به نظر می‌رسد بررسی اثرات فعالیت‌های ورزشی مختلف به ویژه تمرینات HIIT بر نشانگرهای موثر بر فیبروز و التهاب ریوی از اهمیت بالایی برخوردار باشد، لذا هدف تحقیق

در مطالعات پاتولوژی معمولاً درجه پایینی از التهاب ریه وجود دارد و با توجه به وجود سلول‌های التهابی در بافت ریه، مباحثی در رابطه با نقش این سلول‌ها در پیشرفت بیماری وجود دارد (۱). متالوپروتئینازهای ماتریکس (MMPs) خانواده بزرگی از آنزیم‌های پروتولوپتیک هستند که نقش مهمی در تجزیه و تخریب ماتریکس خارج سلولی و ایجاد فیبروز بر عهده دارند (۲،۳). خانواده ماتریکس متالوپروتئینازها بر اساس تشابه ساختاری و ویژگی سوبستراها به پنج زیر‌گروه کلاژنазها، ژلاتینازها، استرومیلیزین‌ها، متالوپروتئینازهای غشایی و انواع دیگر پروتئازها تقسیم می‌شوند. در میان این پنج زیر‌گروه، بیشترین انتشار و فعالیت مربوط به ژلاتیناز A یا ماتریکس متالوپروتئیناز-۲ (MMP-2) می‌باشد (۵).

MMP-2 توانایی زیادی در تجزیه طیف وسیعی از پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی از جمله کلاژن نوع چهار، غشای پایه، فیبرونکتین و ژلاتین دارد (۶). مطالعات نشان می‌دهد که فعالیت این پروتئین در فیبروز ربوی بالا می‌رود (۷) و بوسیله سلول‌های متفاوتی از جمله فیبروبلاست‌ها، سلول‌های اپیتلیال، اندوتیال و بسیاری از سلول‌های التهابی دیگر مانند ماکروفازهای اوزیتوفیل‌ها، نوتروفیل‌ها و ماست سل‌ها در ریه تولید می‌شود (۸). خانواده ژنی مهارکننده‌های بافتی متالوپروتئینازها (TIMPs)، مهارکننده‌های فیزیولوژیک MMPs، مهارکننده‌های فیزیولوژیک MMPs هستند که مانع فعالیت این پروتئازها می‌شوند. عدم تعادل TIMP/MMP یک عامل مهم در فرآیند فیبروژنیک به حساب می‌آید (۹). همچنین در فیبروز ریوی فعالیت MMPs به وسیله عوامل متعددی از جمله عامل رشد تنظیم می‌شود و ممکن است واسطه‌های التهابی نقش مهمی در تعديل صدمات بافت ریه و تخریب ماتریکس خارج سلولی ایفا کنند عامل رشد تغییر شکل دهنده بتا (TGF- $\beta$ ) (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) یک سایتوکاین چند کاره است که به عنوان یک عامل مهم در ایجاد فیبروز در بسیاری از بافت‌ها از جمله ریه نقش دارد (۱۰). این سایتوکاین در ریه‌ها از انواع مختلفی از

عصر)، دما ( $22\pm3$  سانتی‌گراد) و رطوبت حدود ۴۵ درصد نگهداری شد. تعداد ۳ سرعت در قفسهای از جنس پلاستیکی با درب توری و به ابعاد ۲۵ در ۲۷ در ۴۳ به گونه‌ای نگهداری شد که آزادانه به آب و غذای استاندارد دسترسی داشته باشند. پس از یک هفته آشنا سازی و سازگاری حیوانات با محیط جدید، رت‌ها به طور تصادفی در گروه‌های مورد نظر قرار گرفتند.

**پروتکل‌های تمرین:** در ابتدای پژوهش رت‌ها به منظور کاهش استرس و همچنین آشناشی با دویدن روی تردیمیل، در یک برنامه تمرینی به مدت یک هفته با سرعت ۱۰ تا ۱۵ متر در دقیقه و مدت زمان ۵ دقیقه شرکت کردند. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه آشناسازی، رت‌ها یک آزمون ورزشی فراینده تا مرز خستگی انجام دادند تا حداکثر سرعت دویدن روی تردیمیل مشخص گردد، که آزمون فراینده با سرعت ده متر بر دقیقه شروع شد و هر سه دقیقه، یکبار سرعتی معادل با سه متر بر دقیقه به آن افزوده شد. زمان رسیدن به خستگی با عدم توانایی رت در دویدن روی تردیمیل با وجود ایجاد شوک الکتریکی مشخص شد. براساس سرعت حداکثر بدست آمده، تمرین استقامتی و تناوبی شدید به مدت شش هفته و پنج جلسه در هفته برای گروه‌های تمرینی طراحی شد (۱۷). برنامه‌های تمرینی در جدول‌های ۱ و ۲ ارائه شده است.

حاضر بررسی تاثیر شش هفته تمرینات تداومی و تناوبی شدید بر بیان ژن عامل رشد بتا، ماتریکس متالوپروتیناز-۲ و مهارکننده بافتی متالوپروتیناز-۱ بافت ریه در رت‌های نر ویستار می‌باشد.

## روش کار

این پژوهش یک مطالعه تجربی-آزمایشگاهی است که در آن امکان کنترل عوامل تاثیرگذار بر نتایج تحقیق بوده است. برای انجام این تحقیق، تعداد ۱۸ سرعت نر ویستار (۶ تا ۸ ماهه) از انسنتیتو پاستور کرج خریداری و به آزمایشگاه حیوانات دانشکده تربیت بدنی دانشگاه تهران انتقال داده شدند. پروتکل این مطالعه بر مبنای دستورالعمل کمیته تحقیقات و اخلاق در دانشگاه تهران بررسی و با شناسه اخلاق IR.ut.Rec.1395005 مصوب و اجرا شد. نمونه آماری این تحقیق، به روش نمونه‌گیری انتخابی هدفدار با توجه به شرایط وزنی و سنی انجام شد. در ادامه رت‌های مورد مطالعه در پژوهش حاضر به طور تصادفی در سه گروه کنترل (Con)، تمرین تناوبی شدید (HIIT) و تمرین تداومی با شدت متوسط (MICT) (۶ سرعت در هر گروه) قرار گرفتند. رت‌ها در آزمایشگاه حیوانات دانشکده تربیت بدنی دانشگاه تهران در اتاقی به ابعاد ۳ در ۴ متر در شرایط کنترل شده نور (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، شروع روشنایی ۷ صبح و شروع خاموشی ۷

جدول ۱- برنامه تمرینی تناوبی شدید

همه	وقت	فعالیت: استراحت (دقیقه)	شدت فعالیت	شدت ریکاوری	میانگین سرعت در هفته
۱	۵	۲:۲	%۸۰	%۶۰	%۷۰
۲	۶	۲:۲	%۸۰	%۶۰	%۷۰
۳	۷	۲:۲	%۹۰	%۵۰	%۷۰
۴	۸	۲:۲	%۱۰۰	%۵۰	%۷۰
۵	۸	۲:۲	%۱۰۰	%۵۰	%۷۰
۶	۸	۲:۲	%۱۰۰	%۵۰	%۷۰

جدول ۲- برنامه تمرینی تداومی با شدت متوسط

همه	میانگین شدت فعالیت در هر جلسه	مدت هر جلسه
۱	%۶۵	۱۵
۲	%۶۵	۲۰
۳	%۷۰	۲۵
۴	%۷۰	۳۰
۵	%۷۰	۳۰
۶	%۷۰	۳۰

جدول ۳- توالی پرایمرهای مورد استفاده

نام ژن	پرایمرها	توالی	طول amplicon
MMP-2	Forward	TGG GGG AGA TTC TCA CTT TG CCA TCA GCG TTG	156 bp
	Reverse	CCA TAC TT	
TGF-β1	Forward	GCA GTG GCT GAA CCA AGG AGA CG GTC GGT TCA	111 bp
	Reverse	TGT CAT GGA TGG TG	
TIMP-1	Forward	CGTTCACTCTCCTGTTG TTTGCTCATCACTGCCTG	122 bp
	Reverse		
B- actin	Forward	5'-TCCTCCTGAGCGCAAGTAC-3'	88 bp
	Reverse	5'-CCTGCTTGCTGACCACATCT-3'	

### یافته‌ها

در جدول ۴ میانگین و انحراف معیار متغیرهای تحقیق در گروههای مختلف نشان داده شده است. نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد که بین میانگین بیان ژن -2 MMP بافت ریه رت‌های نر ویستار در گروههای مختلف تحقیق، تفاوت وجود دارد ( $p=0.001$ ). همچنین بر پایه یافته‌های آزمون تعییبی LSD، هر دو مداخله تمرین تداومی ( $p=0.001$ ) و تمرین تناوبی شدید ( $p=0.001$ ) به کاهش معنی‌دار بیان ژن -2 MMP بافت ریه نسبت به گروه کنترل منجر شدند. از طرفی، تفاوت معنی‌داری در بیان نسبی MMP-2 بین دو گروه تمرین تداومی و تمرین تناوبی شدید مشاهده نشد ( $p=0.832$ ) (نمودار ۱).

نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد که بین میانگین بیان ژن -1 TIMP بافت ریه رت‌های نر ویستار در گروههای مختلف تحقیق، تفاوت وجود دارد ( $p=0.001$ ). همچنین بر پایه یافته‌های آزمون تعییبی LSD، هر دو مداخله تمرین تداومی ( $p=0.001$ ) و تمرین تناوبی شدید ( $p=0.001$ ) به افزایش معنی‌دار بیان ژن -1 TIMP بافت ریه نسبت به گروه کنترل منجر شدند. از طرفی، تفاوت معنی‌داری در بیان نسبی -1 TIMP بین دو گروه تمرین تداومی و تمرین تناوبی شدید مشاهده شد. به طوری که بیان ژن -1 TIMP بافت ریه در گروه تمرین تناوبی شدید نسبت به گروه تمرین تداومی به میزان معنی‌داری بالاتر بود ( $p=0.001$ ) (نمودار ۲).

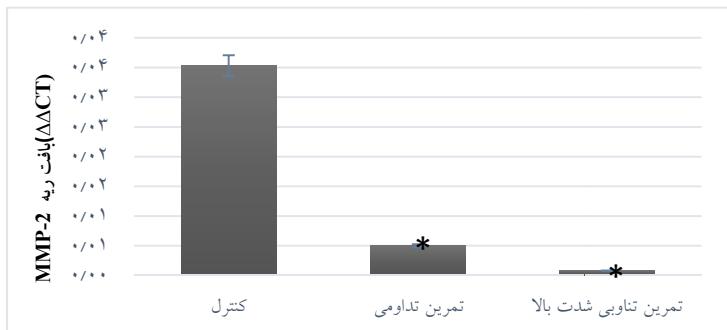
نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد که بین میانگین بیان ژن -1 TGF-β1 بافت ریه رت‌های نر ویستار در گروههای مختلف تحقیق، تفاوت وجود دارد ( $p=0.001$ ). همچنین بر پایه یافته‌های آزمون تعییبی LSD، هر دو مداخله تمرین تداومی ( $p=0.001$ ) و

**نمونه‌گیری بافت و اندازه‌گیری تغییرات بیان ژن متغیرهای در بافت ریه:** ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی رت‌ها با تزریق داخل صفاقی ماده بیهوشی ترکیبی از کتامین (Ketamine) ۵-۰ mg/kg و زایلازین (Xylazine) ۳-۵ mg/kg بلافالصله با استفاده از تیغ جراحی و ایجاد برش در قسمت قدامی سینه بافت ریه استخراج شد و برای آزمایشات سلولی و مولکولی بافت ریه نیمی از هر گروه بلافالصله در نیتروژن مایع منجمد شد و سپس جهت انجام آزمایشات سلولی مولکولی در یخچال ۸۰- نگهداری شد. اندازه‌گیری بیان ژن‌های عوامل مورد نظر از بافت ریه بوسیله تکنیک Real time – PCR سنجش و پس از کمی سازی مقادیر بیان ژن با استفاده از فرمول  $\Delta\Delta Ct$  تجزیه و تحلیل شد. واکنش PCR با استفاده از PCR master mix (Applied Biosystems) و ABI Step One و SYBR Green (Applied Biosystems, Sequence Detection Systems, Foster City, CA) طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. در این مطالعه از ژن بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی استفاده شده است. توالی پرایمرهای مورد استفاده در تحقیق حاضر در جدول ۳ آورده شده است.

برای اطمینان از طبیعی بودن توزیع متغیرها، از آزمون شاپیروویلک و آزمون لوین برای همگنی واریانس‌ها استفاده شد. بعد از اینکه طبیعی بودن توزیع داده‌ها مشخص گردید از آزمون آماری واریانس یک‌طرفه برای تغییرات بین گروهی و آزمون تعییبی LSD برای بررسی تفاوت بین گروه‌ها استفاده شد. سطح معنی‌داری در همه موارد  $p \leq 0.05$  در نظر گرفته شد. کلیه عملیات آماری با نرم افزار SPSS با نسخه ۲۳ به اجرا درآمد.

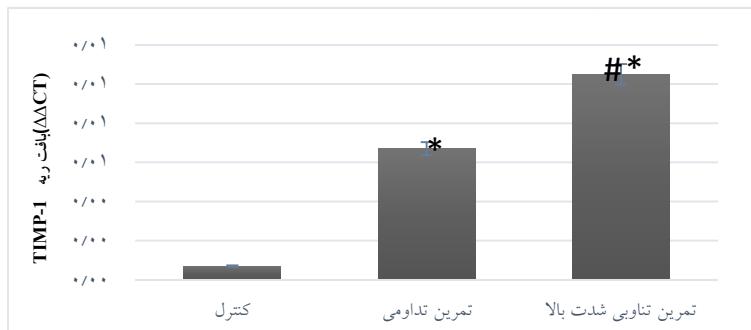
**جدول ۴** - میانگین و انحراف معیار متغیرهای تحقیق در گروههای مختلف

تمرین تناوبی شدید	تمرین تداومی	کنترل	گروه متغیر
۰/۰±۰/۰۰۸/۰۰۷۲	۰/۰±۰/۰۵/۰۰۳۲	۰/۰±۰/۳۵۳/۰۰۳۹۸	(ΔΔCT) بافت ریه MMP-2
۰/۰±۰/۱۰۵/۰۰۶۷	۰/۰±۰/۰۶۷/۰۰۷۱	۰/۰±۰/۰۷/۰۰۱۰	(ΔΔCT) بافت ریه TIMP-1
۰/۰±۰/۱۲۵/۰۰۱۷۸	۰/۰±۰/۰۷۰/۰۰۱۵۵	۰/۰±۰/۱۴/۰۰۰۵	(ΔΔCT) بافت ریه TGF-β1



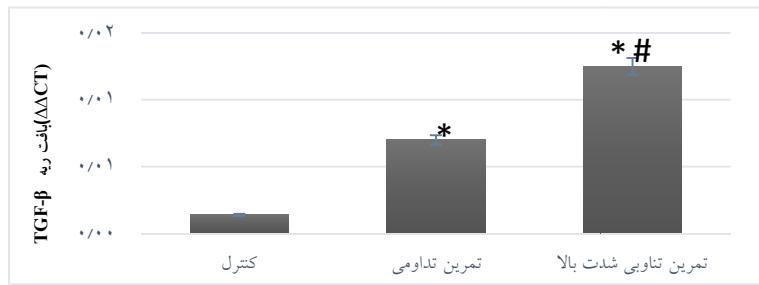
\* تفاوت معنادار نسبت به گروه کنترل

**نمودار ۱** - تغییرات MMP-2 بافت ریه در گروههای مختلف



\* تفاوت معنادار نسبت به گروه کنترل ; # تفاوت معنادار نسبت به گروه تداومی

**نمودار ۲** - تغییرات بیان ژن TIMP-1 بافت ریه در گروههای مختلف



\* تفاوت معنادار نسبت به گروه کنترل ; # تفاوت معنادار نسبت به گروه تداومی

**نمودار ۳** - تغییرات بیان ژن TGF-β1 بافت ریه در گروههای مختلف

مشاهده شد. بطوری‌که بیان ژن TGF-β1 بافت ریه در گروه تمرین تناوبی شدید نسبت به گروه تمرین تداومی به میزان معنی‌داری بالاتر بود ( $p = 0/001$ ) (نمودار ۳).

تمرین تناوبی شدید ( $p = 0/001$ ) به افزایش معنی‌دار بیان ژن TGF-β1 بافت ریه نسبت به گروه کنترل منجر شدند. از طرفی، تفاوت معنی‌داری در بیان نسبی TGF-β1 بین دو گروه تمرین تداومی و تمرین تناوبی شدید

## بحث

به طور مستقیم یا غیرمستقیم بیان MMPs را تنظیم کنند (۲۰). بنابراین احتمالاً تمرینات تداومی و تناوبی با شدید از طریق تاثیر بر عوامل فوق به تغییر سطوح بیان ژن ۲ MMP-2 بافت ریه منجر شده است. با توجه به یافته‌های تحقیق حاضر به نظر می‌رسد، تمرین تداومی با شدت متوسط و تناوبی شدید احتمالاً می‌تواند مداخلات موثری برای کاهش پیشروی فیبروز بافت ریه باشند. با این حال نتایج برخی مطالعات قبلی مخالف با یافته‌های تحقیق حاضر می‌باشد. کارملی و همکاران در پژوهشی تاثیر دو هفته برنامه تمرینی با شدید و کم را در بیان ۲ MMP در عضلات تنفس انقباض رتها بررسی کردند رتها در دو گروه برای فعالیت با شدت پایین (با سرعت ۱۸ متر در دقیقه، ۵۰ درصد  $VO_{2\text{max}}$ ) و برای فعالیت با شدید (با سرعت ۳۲ متر در دقیقه، ۷۵ درصد  $VO_{2\text{max}}$ ) تقسیم شدند. نتایج این مطالعه نشان داد تنها در گروه فعالیت با شدید میزان فعالیت ۲ MMP به طور معنی‌داری افزایش داشت (۲۱). با وجود استفاده از تناوب‌های تمرینی پر شدت در پژوهش حاضر، نتایج پژوهش کارملی و همکاران با پژوهش حاضر متناقض است و به نظر می‌رسد تداوم تکرارها و تناوب بیشتر نیز در این زمینه تاثیرگذار بوده و موجب اختلاف در نتایج شده است. دانزینگ و همکاران نیز نشان دادند که میزان ۲ MMP در پاسخ به ورزش تعییری نمی‌کند (۲۲). علت اختلاف نتایج این تحقیق با مطالعه دانزینگ و همکاران می‌تواند نوع فعالیت باشد. زیرا آن‌ها از پروتکل وامانده ساز فزاینده کوتاه مدت (کمتر از ۲۰ دقیقه) استفاده کرده بودند و عدم تغییر ۲ MMP را گزارش کردند. در حالی که در تحقیق حاضر از تمرین تداومی و تناوبی شدید به مدت شش هفته استفاده شد.

همچنین در خصوص تاثیر تمرین بر TIMP-1، کادوگلو و همکاران در یک مطالعه حیوانی افزایش معنی‌دار TIMP-1 متعاقب شش هفته دویدن روی نوارگردان، پنج جلسه در هفته و هر جلسه ۶۰ دقیقه را گزارش کردند (۲۳). همچنین در آزمودنی‌های انسانی نیز افزایش TIMP-1 به دنبال تمرینات ورزشی گزارش شده است (۲۴، ۲۵). از طرف دیگر نتایج هوئیر و همکاران نشان داد هشت هفته تمرین دوچرخه سواری با شدت ۶۰ درصد حداقل اکسیژن مصرفی تاثیری بر TIMP-1 مردان ندارد (۲۶). متناقض در نتایج مطالعات

نتایج تحقیق حاضر نشان داد تمرینات تداومی و تناوبی شدید به کاهش معنی‌دار بیان ژن ۲ MMP و TGF- $\beta$  بافت ریه در رت‌های نر ویستار منجر شد. یافته‌های تحقیق حاضر با نتایج مطالعات قبلی مبنی بر کاهش بیان ۲ MMP متعاقب تمرینات ورزشی همخوان می‌باشد (۱۲، ۱۳). هادرل اولسن و همکاران کاهش فعالیت ۲ MMP را در رت‌های تمرین کرده بررسی کردند که با یافته‌های پژوهش حاضر همسو بود. پژوهشگران آن مطالعه علت اصلی کاهش فعالیت ۲ MMP را از دست رفتن سریع و عدم تثبیت آن پس از فعالیت بدنه در رت‌ها دانستند. آن‌ها اظهار داشتند که اگر تمرین، فعالیت درون سلولی ۲ MMP را تحريك کند، می‌تواند یک سازوکار کنترل کننده برای جلوگیری از فعالیت بیش از حد این آنزیم در عضله اسکلتی باشد و یا می‌تواند نیاز خارج سلولی به ۲ MMP را افزایش دهد (۱۳). کاهش بیان ژن ۲ MMP در پاسخ به دوره‌های تمرینی را می‌توان مربوط به بیان مهارکننده‌های پروتئینی درون‌زا مانند TIMP-۱، الفا-۲ ماکروگلوبولین و تجزیه پروتئازها دانست. همچنین کاهش برخی عوامل التهابی محرک این کاهش تقش داشته باشند (۱۹). نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد که بیان ژن ۲ MMP بافت ریه در گروه تمرین تداومی و تمرین تناوبی شدید به میزان معنی‌داری کمتر بود. در مقابل، بیان ژن ۱ TIMP و TGF- $\beta$  بافت ریه در گروه تمرین تداومی و تمرین تناوبی شدید به میزان معنی‌داری بالاتر بود. بنابراین با توجه به سازوکارهای درگیر در کاهش بیان ۲ MMP و یافته‌های پژوهش حاضر کاهش ۲ MMP در گروه‌های تداومی و تمرین تناوبی شدید نسبت به گروه کنترل را می‌توان به کاهش بیان ژن ۱ TIMP و TGF- $\beta$  متعاقب تمرینات نسبت داد. MMPs در سطح رونویسی و ترجمه ژن به طور بالایی در ریه تنظیم می‌شوند بیان آن‌ها از طریق عوامل رونویسی متعدد (فعال کننده و سرکوبگر شامل عوامل رشد، هورمون‌ها، سایتوکاین‌ها، مولکول‌های چسبنده سلول، پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی و اجزای فعال زیستی آن‌ها و عوامل سیگنالینگ درون سلولی (GTPases)) که همه می‌توانند

همچنین مدت تمرین مربوط شود. علت تناقض تحقیق حاضر با یافته‌های فوق همچنین احتمالاً بافت مورد مطالعه می‌باشد. همچنین نتایج تحقیق حاضر نشان داد بیان ژن TIMP-1 و  $\beta$ -TGF- $\beta$  بافت ریه در گروه تمرین تناوبی شدید نسبت به گروه تمرین تداومی به میزان معنی‌داری بالاتر بود. تمرین تناوبی شدید می‌تواند به عنوان یک متغیر تاثیرگذار به جای تمرینات تداومی به کار رود زیرا تغییرات مشابه یا حتی بهتری در دامنه فیزیولوژیکی، اجرا و شاخص‌های مرتبط با سلامتی و افراد با بیماری‌های مزمن را نتیجه می‌دهد. از جمله محدودیت‌های تحقیق حاضر می‌توان به عدم اندازه‌گیری دیگر متالوپروتئینازها اشاره کرد. همچنین اندازه‌گیری ماکروگلوبین-۲ $\alpha$  نیز می‌تواند در تبیین و تفسیر بهتر نتایج به ویژه در بافت ریه کمک نماید. این نقطه ضعف پژوهشی پیشنهادی به مطالعات آینده به منظور اندازه‌گیری این ژن‌ها در بافت ریه است.

### نتیجه گیری

در تحقیق حاضر تمرینات تداومی و تناوبی شدید منجر به کاهش معنی‌دار بیان ژن MMP-2 و افزایش معنی‌دار بیان ژن TIMP-1 و  $\beta$ -TGF- $\beta$  بافت ریه در رت‌های نر ویستار شد. بنابراین توصیه می‌شود برنامه‌های تمرین تناوبی شدید به منظور سلامت دستگاه تنفسی مورد استفاده قرار گیرد.

### تقدیر و تشکر

پژوهش حاضر، مستخرج از رساله دکتری گرایش فیزیولوژی ورزشی شناسه اخلاق IR.ut.Rec.1395005 دانشگاه تهران می‌باشد. بدین وسیله از کلیه افرادی که در انجام تحقیق حاضر همکاری داشته‌اند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

### References

1. Selman M, King TE, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. Ann Intern Med. 2001; 134(2): 136-51.
2. Craig VJ, Zhang L, Hagood JS, Owen CA. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol. 2015;53(5):585-600.

به دلیل نوع تمرین، آزمودنی‌ها و همچنین روش نمونه گیری می‌باشد. میزان بیان ژن TGF- $\beta$ 1 نیز به دنبال شش هفته تمرین تداومی و تناوبی شدید افزایش معنی‌داری داشت. این نتایج همراستا با نتایج تحقیقاتی بود که افزایش سطوح  $\beta$ -TGF-1 بعد از فعالیت شدید و طولانی مدت را گزارش کرده‌اند (۲۷-۲۹). مطالعات نشان می‌دهد که  $\beta$ -TGF-1 به طور انتخابی سنتز ماتریس بافت همبند را برای کنترل شکل‌گیری و تخریب بافت‌های همبند تحریک می‌کند (۳۰). این اثرات ممکن است با کاهش سنتز پروتئینازها (MMPs) یا با افزایش بیان مهار کننده‌های بافت پروتئینازها (TIMPs) همراه باشد (۳۱، ۳۲). دلیل افزایش  $\beta$ -TGF-1 متعاقب فعالیت ورزشی به درستی مشخص نیست. با این حال، استرس اکسیداتیو و هیپوکسی ناشی از تمرین دو مکانیسم احتمالی هستند (۳۳). مطالعات نشان داده‌اند با افزایش بیان NADPH اکسیداز و کاهش بیان آنزیم‌های آنتی اکسیدانی، بیان  $\beta$ -TGF-1 بافت افزایش می‌یابد (۳۴، ۳۵). به دلیل اینکه متعاقب تمرین استقامتی و تناوبی شدید وضعیت اکسیدان/آنتی اکسیدان تغییر می‌کند، احتمالاً یکی از دلایل افزایش  $\beta$ -TGF-1 متعاقب تمرین حمایت از وضعیت آنتی اکسیدانی می‌باشد. دلیل مهمتر دیگر، وقوع هیپوکسی سلولی ناشی از انجام تمرین HITT است. انجام این تمرینات با هیپوکسی شدید در سطح سلول همراه است که منجر به افزایش بیان HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia-induced Factor 1- $\alpha$ ) می‌شود. این عامل در سلول‌ها در پاسخ به هیپوکسی افزایش می‌یابد و اعمال بیولوژیک متعددی را واسطه گری می‌کند. تحقیقات پیشین افزایش بیان  $\beta$ -TGF-1 تحت تأثیر افزایش بیان HIF-1 $\alpha$  گزارش کرده‌اند (۳۶، ۳۷) که می‌تواند HIF-1 $\alpha$  را به عنوان عاملی مؤثر بر تنظیم Mثبت بیان  $\beta$ -TGF-1 بعد از تمرینات شدید مطرح نماید. برخی تحقیقات نیز کاهش سطوح  $\beta$ -TGF-1 بر اثر تمرین را گزارش کرده‌اند؛ نشان داده شده است که هفته تمرین شنا منجر به تغییری در سطوح  $\beta$ -TGF-1 در رت‌های سالم نشد (۳۸). به نظر می‌رسد که برنامه تمرینی فوق سبب القا سازگاری‌های کافی و در نتیجه تغییر در شاخص‌های فوق در بافت قلبی رت‌های سالم نشد که این موضوع احتمالاً به کافی نبودن شدت و

- Biomotor Sci. 2014-2015;6(2)..
17. Viana RB, Naves JPA, Coswig VS, de Lira CAB, Steele J, Fisher JP, et al. Is interval training the magic bullet for fat loss? A systematic review and meta-analysis comparing moderate-intensity continuous training with high-intensity interval training (HIIT). Br J Sports Med. 2019;53(10):655-664.
  18. Ross LM, Porter RR, Durstine L. High-intensity interval training (HIIT) for patients with chronic diseases. J Sport Health Sci. 2016; 5(2): 139-144
  19. da Cunha Nascimento D, Durigan RdCM, Tibana RA, Durigan JLQ, Navalta JW, Prestes J. The Response of Matrix Metalloproteinase-9 and-2 to Exercise. Sports Med. 2014; 6:1-10.
  20. Kheradmand F, Werner E, Tremble P, Symons M, Werb Z. Role of Rac1 and oxygen radicals in collagenase-1 expression induced by cell shape change. Science. 1998; 280:898-902.
  21. Carmeli E, Haimovitch TG. The expression of MMP-2 following immobilization and highintensity running in plantaris muscle fiber in rats. Sci World J. 2006; 6:542-50.
  22. Danzig V, Blanka M, Petr K, Levels of circulating biomarkers at Rest and after exercise in coronary artery disease patients. Physiol rRes. 2010; 102:1374-1379.
  23. Kadoglou NP, Moustardas P, Kapelouzou A, Katsimpoulas M, Giagini A, Dede E, et al. The anti-inflammatory effects of exercise training promote atherosclerotic plaque stabilization in apolipoprotein E knockout mice with diabetic atherosclerosis. Eur J Histochem. 2013; 57(1): e3.
  24. Seidanloo F, Farzanegi P. Changes in Matrix Metallo-proteinases 2, 9 and Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase 1 to Synchronized Exercise Training and Celery, as an Herbal Supplement, in Overweight Women. Modares J Med Sci: Pathobiol. 2016; 18:107-118.
  25. Koskinen SO, Heinemeier KM, Olesen JL, Langberg H, Kjaer M. Physical exercise can influence local levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tendon-related connective tissue. J Appl Physiol. 2004; 96(3): 861-4.
  26. Hoier B, Nordsborg N, Andersen S, Jensen L, Nybo L, Bangsbo J, et al. Pro- and antiangiogenic factors in human skeletal muscle in response to acute exercise and training. J Physiol. 2012; 590(3): 595-606.
  27. Czarkow Paczek B, Bartłomiejczyk I, Przybylski J. The serum levels of growth factors:POGF,TGF-BETA and VEGF are increased after strenuous physical exercise. J Physiol Pharmacol. 2006;57(2):189-197.
  28. Hering S, Jost C, Schulz H, Hellmich B, Schatz H, Pfeiffer AFH. Circulating transforming growthfactor f1 (TGFB1) is elevatedin extensive exercise. J Appl Physiol. 2002; 86: 406-41.
  3. Giannandrea M, Parks WC. Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis. Dis Model Mech. 2014; 7(2): 193–203.
  4. Ra HJ, Parks WC. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. Matrix Biol. 2007 Oct; 26(8):587-96.
  5. Opdenakker G, Van den Steen PE, Van Damme J. Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions. Trends Immunol. 2001; 22(10): 571-9
  6. Pittayapruet P, Meephansan J, Prapapan O, Komine M, Ohtsuki M. Role of Matrix Metalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis. Int J Mol Sci. 2016 2;17(6): 868-79.
  7. Keshavarz G, Rezaie M, Fathi F, Nikkhoo B, Roshani D. Investigating the Expression of Matrix Metalloproteinase-2 Protein in Lung Fibrosis Induced by Bleomycin in Mice. Med J Ilam. 2013; 21(7): 102-12.
  8. Opdenakker G, Van den Steen PE, Van Damme J. Gelatinase B: a tuner and amplifier of immune functions. Trends Immunol. 2001; 22(10): 571-9.
  9. Lagente V, Manoury B, Nénan S, Le Quément C, Martin-Chouly C, Boichot E. Role of matrix metalloproteinases in the development of airway inflammation and remodeling. Braz J Med Biol Res. 2005;38(10):1521-30
  10. Willis BC, Borok Z. TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2007;293(3): 525-34
  11. Strieter RM. Pathogenesis and natural history of usual interstitial pneumonia: The whole story or the last chapter of a long novel. Chest. 2005; 128: 526-32.
  12. Anikó P, Szabó R, Kupai K, Baráth Z, Szalai Z, Csonka A, et al. Cardioprotective Effects of Voluntary Exercise in a Rat Model: Role of Matrix Metalloproteinase-2. Oxid Med Cell Longev 2015; 2015:876805.
  13. Hadler-Olsen E, Solli AI, Hafstad A, Winberg JO, Uhlin-Hansen L. Intracellular MMP $\square$ 2 Activity in Skeletal Muscle is Associated with Type II Fibers. J Cell Physiol.2014; 5:63-77.
  14. Leite RD, Durigan Rde C, de Souza Lino AD, de Souza Campos MV, Souza Md, Selistre-de Araújo HS, et al. Resistance training may concomitantly benefit body composition, blood pressure and muscle MMP-2 activity on the left ventricle of high-fat fed diet rats. Metabolism. 2013; 62(10): 1477-84.
  15. Reiss M, Barcellos-Hoff MH. Transforming growth factor-beta in breast cancer: a working hypothesis. Breast Cancer Res Treat. 1997; 45(1): 81-95
  16. Sajadian S, Nikooie R. TGF- $\beta$ 1 protein Expression in the Skeletal Muscle Following High Interval Training and its Relationship with Intramuscular Triglycerides Oxidation. J Sport

29. Czarkowska B, Zendzian M, Bartlomiejczyk I, Przybylski J, Gorski J. The effect of acute and prolonged endurance exercise on transforming growth factor-beta1 generation in rat skeletal and heart muscle. *J Physiol Pharmacol.* 2007; 60(4):157-62.
30. Kingsley DM. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev.* 1994, 8:133–146.
31. Kerr LD, Miller DB, Matrisian LM. TGF-beta 1 inhibition of transin/ stromelysin gene expression is mediated through a Fos binding sequence. *Cell.* 1990;61:267–278.
32. Overall CM, Wrana JL, Sodek J. Transforming growth factor-beta regulation of collagenase, 72 kDa-progelatinase, TIMP and PAI-1 expression in rat bone cell populations and human fibroblasts. *Connect Tissue Res.* 1989;20:289–294.
33. Yamada H, IwakiY, Kitaoka R, Fujitani M, Shibakusa T, Fujikawa T. Blood Lactate Functions as a Signal for Enhancing Fatty Acid Metabolism during Exercise via TGF- $\beta$  in the Brain. *J Nutr Sci Vitaminol.* 2012; 58: 88-95.
34. Sajadian S, Nikooie R. TGF- $\beta$ 1 protein Expression in the Skeletal Muscle Following High Interval Training and its Relationship with Intramuscular Triglycerides Oxidation. *J Sport Biomotor Sci.* 2014-2015; 6(2): 63-75.
35. Zhao W, Zhao T, Chen Y, Ahokas RA, Sun Y. Oxidativestress mediates cardiac fibrosis by enhancing transforming growth factor-beta1 in hypertensive rats. *Mol Cell Biochem.* 2008; 317: 43-50.
36. Zhao W, Zhao T, Chen Y, Ahokas RA, Sun Y. Kidney fibrosisin hypertensive rats: role of oxidative stress. *Am J Nephrol.* 2008; 28: 548-554
37. Milkiewicz M, Doyle JL, Fudalewski T, Ispanovic E, Aghasi M, Haas TL. HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  play a central role instrech-induced but not shear-stress-induced angiogenesis inrat skeletal muscle. *J Physiol.* 2007; 583: 753-766.
38. Habibian M, Khosravi M. the effect of 8 weeks regular swimming exercise on the cardiac levels of Matrix mettaloproteinase-2(MMP-2) and transforming growth factor-beta1 in diabetic rats. *ijdld.* 2016; 15 (2) :67-74.