Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services
Vol. 35, No. 4, Oct. – Nov. 2013, Pages: 66-73

Role of Cooling Recruitment on Skeletal Muscle Hspb1 Gene Expression during Recovery from Eccentric Contractions

Abbasali Gaeini[1], Rana Fayazmilani[2*], Neda Khaledi[3]

[1]Department of Exercise Physiology, School of Physical Education and Exercise Science, University of Tehran, Tehran, Iran
[2]Department of Exercise Physiology, School of Physical Education and Exercise Science, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
[3]Department of Exercise Physiology, School of Physical Education and Exercise Science, Kharazmi University, Tehran, Iran

Received: 14 Dec, 2012 Accepted: 12 Feb, 2013

Abstract

Background and Objectives: In recent years, the use of cold water immersion (CWI) following heavy training sessions has become a common habit among athletes aiming to reduce soreness, but there aren't strong scientific rational behind this belief. Hspb1 gene, which expressing heat shock protein 25 has an important role in recovery and adaptation to exercise. The aim of this study is to investigate the Hspb1 gene expression following post eccentric exercise cooling, during primary and late recovery.

Materials and Methods: Fourthy male Wistar rats (n=40; W= 300±10gr) were divided into two groups of exercise (Ex group) and exercise with cold water immersed group (Ex+CWI). Each group furture subdivided in to three subgroups based on three time-courses (0, 3, and 48 h after exercise). Exercise consists of 90 min interval downhill running (18*5 min, 2 min rest between intervals, 20m/min, and 17˚ decline). Post exercise cooling consists of 10 min of cold water immersion in 10˚C water. Hspb1mRNA level was measured in soleus muscle using Real-Time PCR. The results were studied by statistical methods.

Results: Gene expression of Hspb1 increased 3 hour's after exercise in both groups, but the difference between two groups was not significant in this time course. However Hspb1mRNAexpression in Ex+CWI group 48 hr after-exercise was significantly less than Ex group (P=0.016).

Conclusion: This study indicates that cooling after eccentric contraction. Exercise may suppress Hspb1 gene expression during late recovery period and interfere with protective role of this gene during the recovery of skeletal muscle after exercise.

Keywords: Hspb1 gene, Cold Water Immersion (CWI), Downhill Running

*Corresponding author:
E-mail: r_milani@sbu.ac.ir

مقاله پژوهشی

نقش به کارگیری سرما در تغییرات بیان ژن Hspb1 عضله اسکلتی در دوره های بازیافت پس از انقباض های برونگرا

عباسعلی گائینی: گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
رعنا فیاض میلانی: گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران، نویسنده رابط:
E-mail: r_milani@sbu.ac.ir
ندا خالدی: گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

دریافت: ۹۱/۹/۲۴ پذیرش: ۹۱/۱۱/۲۴

چکیده

زمینه و اهداف: امروزه علیرغم عدم وجود پشتوانه علمی کافی، به کارگیری سرما پس از جلسات تمرینی و مسابقات ورزشی- با هدف بازیافت بهتر و جلوگیری از کوفتگی عضلانی- در میان ورزشکاران رواج زیادی یافته است با این حال منطق علمی در بکارگیری این روش بازیافت موجود نیست. ژن Hspb1 -که با بیان پروتئین شوک گرمایی ۲۵ (Hsp25) نقش مهمی در بازیافت و سازگاری حاصل از فعالیت ورزشی ایفا می کند- در این مطالعه مورد بررسی قرارگرفته است. هدف این پژوهش، بررسی بیان ژن Hspb1 پس از به کارگیری سرما بعد از انقباض های برون گرا، در دوره های بازیافت اولیه و تاخیری می باشد.

مواد و روش ها: موش های صحرایی نر ویستار (n=۴۰، W=۳۰۰±۱۰) در دوگروه اصلی فعالیت ورزشی (Ex) و غوطه وری در آب سرد پس از فعالیت ورزشی (Ex+CWI) قرار داده شدند. هر گروه به سه زیر گروه قبل از فعالیت ورزشی، سه ساعت پس از فعالیت ورزشی (بازیافت اولیه) و ۴۸ ساعت پس از فعالیت ورزشی (بازیافت تاخیری) تقسیم شد. پروتکل فعالیت ورزشی شامل ۹۰ دقیقه دویدن در سراشیبی بر روی نوارگردان (۱۸ تناوب پنج دقیقه ای با دو دقیقه استراحت بین تناوبها، سرعت ۲۰ متر بر دقیقه، شیب منفی ۱۶ درجه) و پروتکل غوطه وری در آب سرد شامل ۱۰ دقیقه غوطه وری در آب ۱۰ درجه سانتی گراد بود. میزان بیان ژن Hspb1 عضله اسکلتی نعلی با روش Real-time PCR، در زمان های مورد نظر به صورت کمی اندازه گیری و با استفاده از نرم افزار rest از نظر آماری بررسی شد (سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ درنظرگرفته شد).

یافته ها: داده های حاصل از این پژوهش نشان دادند سه ساعت پس از فعالیت ورزشی بیان ژن Hspb1 در دو گروه Ex و Ex+CWI به طور معنی داری افزایش یافته و در این وهله از بازیافت تفاوت معنی داری بین دو گروه وجود نداشته است. درحالی که، ۴۸ ساعت پس از فعالیت ورزشی بیان ژن در گروه Ex+CWI درحد معنی داری پایین تر از گروه Ex گزارش شده است(p=۰/۰۱۶).

نتیجه گیری: یافته های پژوهش نشان می دهند به کارگیری سرما پس از انقباض های برون گرا می تواند بیان ژن Hspb1 را در دوره تاخیری بازیافت سرکوب کند. با توجه به نقش احتمالی Hspb1در محافظت و بازشکل گیری پروتئینهای عضله اسکلتی، کاهش بیان این ژن می تواند در بازیافت عضله اسکلتی پس از فعالیت ورزشی تداخل ایجادکند.

کلید واژه ها: ژن Hspb1، غوطه وری در آب سرد، دویدن در سراشیبی

مقدمه

استفاده از روش های مختلف پس از فعالیت ورزشی برای سرعت بخشیدن به بازیافت، در میان ورزشکاران شایع است. به تازگی، غوطه وری در آب سرد (Cold Water Immersion, CWI) به عنوان یکی از مداخله‌های بازیافت به میدان آمده است. علیرغم محبوبیت این روش، شواهد حاصل از کارهای بالینی و بررسی های علمی در این زمینه محدود و مبهم است (۶-۱). مطالعات اندکی به بررسی رویدادهای سلولی ناشی از استفاده از CWI پس از فعالیت ورزشی پرداخته اند. روشن است که CWI درجه‌ای از شوک را در بدن ایجاد می‌کند و به برخی پاسخ های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی منجرمی شود، اما تاثیر بعدی آن بر

بازیافت معلوم نیست. احتمالاً، مهم ترین مطلب آن است که CWI به انقباض عروقی منجرمی شود، بازگشت سیاهرگی را تحریک می‌کند و به برداشت و دفع متابولیتها پس از فعالیت ورزشی کمک می‌کند، و احتمالاً تورم و کوفتگی عضلانی را کاهش می‌دهد. پژوهشهای دیگر، پاسخ های بدن به دماهای بسیار سرد را از جنبه-های بیوشیمیایی، ایمونولوژی، تنفس، و پاسخ های قلبی-عروقی مطالعه کرده اند (۸و۷)، اما این پاسخ ها هنوز به یک مدل ورزشی بازیافت تعمیم داده نشده است. فعالیت ورزشی به عنوان یک استرس، فرایندهای سلولی و مولکولی در عضله اسکلتی ایجاد می کند که این فرایندها گاهی به ظاهر نامطلوبند اما درنهایت به سازگاری های مطلوب منجرمی شوند. یکی از بارزترین پاسخ های سلولی به استرس، تغییر سریع بیان ژن خانواده‌ای از پروتئین های بسیار حفاظت شده است که تحت عنوان *پروتئین های شوک گرمایی* (Conserved, HSPs) شناخته شده‌اند (۱۱-۹). این پروتئین ها با توجه به وزن مولکولی به شش خانواده تقسیم می شوند: ۱۰۰، ۹۰، ۷۰، ۶۰، ۴۰، و ۱۸ تا ۳۰ کیلو دالتون (kDa). پروتئین های شوک گرمایی کوچک (خانواده ۱۸ تا ۳۰ کیلو دالتونی) خانواده ای از نه پروتئین هستند که هر یک از آنها یک ناحیه حفاظت شده به نام ناحیه آلفا کریستالین دارند که در خصوصیت چپرونی HSPهای کوچک مهم است. HSP۲۵ (و مشابه انسانی HSP27) و آلفابتا کریستالین، بیشترین HSPهای کوچکی هستند که تاکنون مطالعه شده اند. این پروتئین توسط ژن Hspb1 بیان می-شود. این ژن در موش های صحرایی بر روی کروموزم ۱۲ قرار دارد. مشابه انسانی این پروتئین، با نام HSP27 نیز توسط همین ژن بیان می‌شود. بیان HSPها در سطح نسخه برداری و ترجمه – هردو – کنترل می‌شود. ژن این پروتئین ها در ناحیه پروموتور (پیش برنده)، بخشی به نام HSE دارد که با اتصال به عامل نسخه برداری شوک گرمایی (HSF1) بیان این ژن را کنترل می‌کند. تنظیم ناشی از استرس HSP، اغلب با اتصال HSF-۱ به HSE صورت می-گیرد. HSF-۱ در سیتوپلاسم سلول های بدون استرس به عنوان یک مونومر کمپلکس شده با HSP وجود دارد. در شرایط استرس، پروتئین های تجزیه شده، HSP را از HSF جدا می‌کنند و در نتیجه سنتز HSF-۱ و درنهایت سنتز HSP را فعال می‌کنند. با این سازوکار، بیان HSPهای دیگر نیز تنظیم می‌شود. HSF جداشده از کمپلکس به وضعیت تریمری تبدیل می‌شود و لذا می‌تواند به DNA پیوند خورد. فرایند تریمریزاسیون و اتصال به DNA، فعال شدن HSF نامیده می‌شود. در میان HSPهای کوچک تنها HSP۲۵ از راه شوک گرمایی القاء می‌شوند (۱۲). لازم به ذکر است درمقایسه با HSPهای دیگر، Hspb۱ با سینتیک آهسته‌تری انباشته و در زمان طولانی‌تری پس از استرس سنتز می‌شود (۱۴و۱۳). Hspb۱، ظرف چند دقیقه با شوک گرمایی، هیپوکسی، تخلیه ATP، تغییر در PH، مهارکننده‌های متابولیک، و فعالیت ورزشی فعال می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند فعالیت ورزشی و شوک گرمایی می‌توانند با سازوکار یکسانی بیان HSP را تحریک کنند. هرچند HSPها در سطح نسخه برداری تنظیم می‌شوند، ممکن است سازوکارهای پس از نسخه برداری نیز در بیان آنها در سطح پروتئین دخالت داشته باشند. HSPmRNA در شرایط فیزیولوژیک طبیعی ناپایدار است. در مطالعات قبلی، انباشت سریع HSPmRNA پس از شوک گرمایی و تنزل بعدی آن نشان داده شده است. از این رو، وقتی وضعیت فیزیولوژیک به حالت طبیعی برگردد، مقدار HSPmRNA کاهش می‌یابد که به میزان ترجمه کمتری منجرمی شود(۱۲). پس اگر بتوان افزایش دما را پس از فعالیت ورزشی سریعاً به دمای فیزیولوژیک برگرداند، شاید ثبات mRNA ازبین برود و درنتیجه بیان HSP کاهش یابد. پژوهشگران نشان داده‌اند به جز عوامل استرسی دیگر، فعالیت ورزشی بیان Hspb1 را افزایش می‌دهد(۱۵). البته، پروتئین های شوک گرمایی کوچک اغلب پس از فعالیتهای ورزشی غیر آسیب زا افزایش نیافته اند(۱۶). لذا، Hspb1 بیشتر به فعالیتی حساس است که استرس مکانیکی زیادی بر تارهای عضلانی وارد کند تا فعالیتی که استرس متابولیکی زیادی دارد. مطالعات نشان دادند Hspb1 به عنوان یک عامل سلولی اولیه مهم در سازگاری کوتاه مدت به یک فعالیت ورزشی با انقباض های شدید مطرح است (۱۷). از این رو، افزایش بیان آنها پس از پروتکل های فعالیت ورزشی آسیب زا مثل انقباض های برونگرای شدید (۲۰-۱۸) و دویدن در سرپایینی (۲۵-۲۱) دیده شده است، اما پس از فعالیت ورزشی غیرآسیب زا ، مثل دویدن با سرعت متوسط (۱۶) خیر. Paulsen و همکاران (۲۰۰۷)، تاثیر یک وهله فعالیت ورزشی بیشینه نامتعارف برونگرا، شامل ۳۰۰ تکرار را بر بیان HSP25 در دانشجویان مرد سالم مطالعه کردند (۲۰). بررسی های مولکولی در این مطالعه نشان داد مقادیر بیان ژن Hspb1 عضله در زمان های ۴ و ۲۴ ساعت پس از فعالیت ورزشی، به ترتیب ۴ و ۸ برابر افزایش داشته است (۲۰). در مطالعه دیگری، Gaeeni و همکارانش (۱۳۹۰) نشان دادند میزان پروتئین HSP25 بالافاصله پس از دویدن سراشیبی افزایش می یابد و ۴۸ ساعت پس از آن به اوج خود می رسد. آنها همچنین گزارش کردند در وهله های دیرتر میزان پروتئین کاهش یافت، اما یک هفته پس از فعالیت ورزشی همچنان بالاتر از مقادیر استراحتی بوده است (۲۵). Kojima و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کرده اند استفاده از گرما شکل فسفوریله HSP25 را در عضله اسکلتی افزایش می‌دهد. احتمالاً، هنگام بازسازی عضله اسکلتی آسیب دیده، استرس گرمایی با بیان HSP در تکثیر سلول های ماهواره‌ای و سنتز پروتئین شرکت می‌کند (۲۲). لذا، ویژگی های مورفولوژیکی عضله می‌تواند از راه عوامل متابولیکی مربوط به استرس گرمایی تنظیم شود. با وجود این ، ارتباط دقیق بین استرس گرمایی ناشی از فعالیت ورزشی، HSP۲۵، و سازگاری های عضلانی پس از تمرین ورزشی (از جمله هایپرتروفی) به خوبی روشن نشده است. با توجه به شواهد موجود، گرمای فیزیولوژیک ناشی از تاثیر فعالیت ورزشی می‌تواند عامل مهمی در فرایند بازیافت و سازگاری های کوتاه مدت ناشی از جلسه تمرینی باشد. باتوجه به گزارش های ضد و نقیض درباره آثار سرمادرمانی که ریشه در دخالت منفی کاهش دمای عضلانی با فرایندهای نوسازی و سازگاری دارد و همین طور نقش مهم ژن Hspb1 درفرایندهای بازشکل گیری و نوسازی (۱۸) و حفاظت از ساختار میوفیبریلی

در مقابل آسیب (۲۳) این احتمال وجود دارد که غوطه وری در آب سرد پس از جلسه تمرینی در دوره بازیافت – که مهم ترین آثار تمرین در این دوره ایجاد می‌شود – با کاهش بیان ژن Hspb1 سهم سازگاری های مطلوب جلسه تمرینی را کاهش دهد. لذا، در این پژوهش هدف بررسی تاثیر به کارگیری سرما پس از فعالیت ورزشی برونگرا بر بیان ژن Hspb1 در دوره های بازیافت و نگاهی بر رویدادهای مولکولی ناشی از این روش بازیافت بوده است.

مواد و روش ها

پژوهش حاضر از نوع تجربی با مدل حیوانی بود. جامعه و نمونه آماری. جامعه آماری این مطالعه را موش های نر صحرایی نژاد ویستار موسسه واکسن و سرم سازی رازی تشکیل دادند که از این بین ۴۰ راس موش صحرایی نر بالغ در دامنه وزنی ۱۰±۳۰۰گرم به عنوان نمونه در نظرگرفته شدند. شرایط نگهداری حیوانات. پس از انتقال، برای سازگاری با شرایط جدید آزمودنیها برای مدت یک هفته بدون هیچ مداخله ای در حیوانخانه قرار گرفتند. حیوانات به صورت چهارتایی در قفسهای تیپ ۳ مخصوص جوندگان گذاشته شدند. غذای حیوانات به صورت پلت و آب آشامیدنی روزانه در بطری های ۵۰۰ میلی لیتری مخصوص جوندگان در اختیار آنها قرار گرفت. با درنظرگرفتن اینکه جوندگان در چرخه تاریکی فعال هستند، در این چرخه از نظر فعالیت ورزشی نیز عملکرد بهتری دارند. لذا، برای سهولت کار پژوهشگر، چرخه روشنایی- تاریکی حیوانات به تدریج معکوس شد تا درنهایت ۱۲ ساعت تاریکی از ساعت شش صبح تا شش بعد از ظهر تنظیم شد. دمای محیط بین ۱۹ تا ۲۳ درجه سانتی گراد و میزان رطوبت بین ۴۵ تا ۶۰ درصد کنترل شد. برای تهویه حیوانخانه از سیستم تهویه مطبوع و تصفیه هوا استفاده شد. حیوانات پس از سازگاری با محیط آزمایشگاه و چرخه شبانه روزی موردنظر، به مدت دو هفته دوره آشناسازی با نوارگردان و سازگاری در حوضچه آب سرد گذاشته شدند. در این دوره حیوانات با شوک بادی برای دویدن بر روی نوارگردان شرطی شدند. طرح تجربی. آزمودنیها به صورت تصادفی در دو گروه فعالیت ورزشی (Ex) و غوطه وری در آب سرد پس از فعالیت ورزشی (Ex+CWI) قرارگرفتند. هر گروه به سه زیر گروه قبل از فعالیت ورزشی، سه ساعت پس از فعالیت ورزشی (بازیافت اولیه) و ۴۸ ساعت پس از فعالیت ورزشی (بازیافت تاخیری) تقسیم شد (پنج گروه، هر گروه شامل هشت آزمودنی). زیر گروه قبل از فعالیت ورزشی در دو گروه یکسان بود. پروتکل فعالیت ورزشی مورد استفاده در این پژوهش شامل ۹۰ دقیقه دویدن سراشیبی بر روی نوارگردان با سرعت ۲۰ متر بر دقیقه با شیب منفی ۱۶ درجه به صورت تناوبی بود(۱۸ تناوب پنج دقیقه ای، دو دقیقه استراحت بین تناوبها). غوطه وری در آب سرد به مدت ۱۰ دقیقه و در حوضچه ای با دمای ۱۰ درجه سانتی گراد صورت گرفت. حوضچه طوری درنظرگرفته شده بود که حیوانات تا ناحیه گردن در آب بودند و امکان حرکت کردن نداشتند. *روش نمونه گیری.* در مراحل زمانی موردنظر، موش های صحرایی با استفاده از تزریق زیر جلدی کوکتل کتامین و زایلوسین بیهوش شدند. پس از اطمینان از بیهوشی کامل حیوانات با بررسی پاسخ های رفلکسی عضله اسکلتی سولئوس از پای چپ حیوانات جدا گردید. آماده سازی نمونه و اندازه گیری Hspb1mRNA. نمونه های عضلانی (۵۰ میلی گرم) بلافاصله پس از جداسازی در محلول RNA later قرارداده و تا زمان سنجش در فریزر منفی ۸۰ نگهداری شدند. پس از استخراج RNA از بافت عضلانی مطابق با پروتکل کیت ساخت شرکت کیاژن (شماره کاتالوگ ۷۴۱۳۴)، برای سنتز cDNA از کیت سنتز cDNA ساخت شرکت کیاژن (شماره کاتالوگ ۲۰۵۳۱۱) استفاده شد. در این پژوهش روش کمی- مقایسه ای ΔCT Real time با استفاده از SYBR-Green برای تعیین میزان بیان mRNA ژن Hspb1 استفاده شد. برای مقایسه کیفی و کمی در میزان بیان ژن مذکور، ازبیان ژن β-actin به عنوان ژن مرجع استفاده شد(جدول ۱). در این روش در هر دور دو گروه بررسی شدند. درنهایت تغییرات بیان ژن بر اساس کمیت نسبی (Relative Quantity, RQ) بدست آمد. روش های آماری. برای بررسی معنی داری نتایج حاصل از بیان ژن از نرم افزار ویژه آماری تحت نام rest استفاده شد. سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ درنظرگرفته شد.

یافته ها

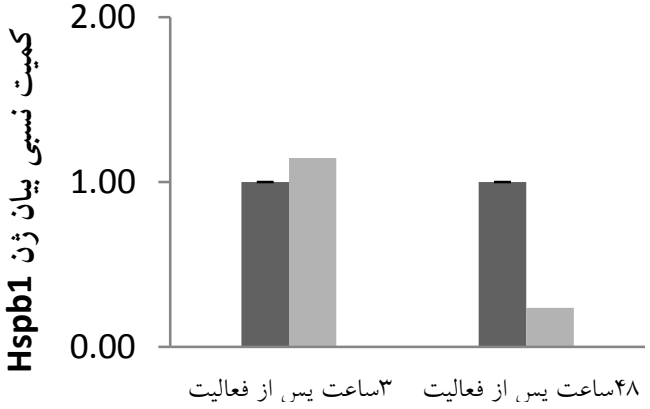
نتایج این پژوهش در جدول ۲ ارائه شده است. همانطور که مشاهده می شود بیان ژن Hspb۱، ۴۸ ساعت پس از فعالیت ورزشی درحد معنی داری در گروه Ex+CWI کمتر از گروه Ex بود(P=۰/۰۱۶) . به علاوه، در وهله زمانی ۳ ساعت پس از فعالیت ورزشی، بیان ژن در هر دو گروه Ex و Ex+CWI نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری داشته است. **علاوه** براین، مقایسه دو گروه Ex و Ex+CWI نشان داد در وهله زمانی ۴۸ ساعت پس از فعالیت ورزشی، بیان ژن در گروه Ex+CWI درحد معنی داری کمتر از گروه کنترل گزارش شده است (P=۰/۰۰۵).

جدول ۱: توالی پرایمرهای استفاده شده در پژوهش

توالی پرایمر	نام پرایمر
’TGGCTACATCTCTCGGTGCT -3-’۵	HSP25 F
’ATGGTGATCTCCGCTGATTG -3-’۵	HSP25 R
’ACCATGTACCCAGGCATTGC -3 -’۵	β-actin F
’ATGACTCTACCCACGGCAAG -3-’۵	β-actin R

جدول ۲: بیان نسبی ژن Hspb1 در هر دو گروه نسبت به ژن مرجع β-actin

گروه	ژن	نوع ژن	بیان ژن	انحراف معیار	ارزش P	نتیجه نهایی
۳ ساعت پس از Ex نسبت به کنترل	Hspb1	هدف	۳/۱۲۷	۲/۱–۵/۳	۰/۰۱	↑
	-actinβ	مرجع	۱/۰۰۰			
۴۸ساعت پس از Ex نسبت به کنترل	Hspb1	هدف	۴/۳۳	۰/۹۹–۱۵/۰۵	۰/۱۰۶	معنی دار نیست
	-actinβ	مرجع	۱/۰۰۰			
۳ ساعت پس از Ex+CWI نسبت به کنترل	Hspb1	هدف	۵/۶۹	۲/۵۳–۱۵/۰۸	۰/۰۰۰	↑
	-actinβ	مرجع	۱/۰۰۰			
۴۸ ساعت پس از Ex+CWI نسبت به کنترل	Hspb1	هدف	۰/۵۲۹	۰/۳۵۲–۰/۷۹۶	۰/۰۰۵	↓
	-actinβ	مرجع	۱/۰۰۰			
۳ ساعت پس از Ex+CWI نسبت به ۳ ساعت پس از Ex	Hspb1	هدف	۱/۱۴۵	۰/۶۷۹–۲/۵۸۱	۰/۸۷۲	معنی دار نیست
	-actinβ	مرجع	۱/۰۰۰			
۴۸ ساعت پس از Ex+CWI نسبت به ۴۸ ساعت پس از Ex	Hspb1	هدف	۰/۲۳۶	۰/۰۸۶–۰/۶۵۱	۰/۰۱۶	↓
	-actinβ	مرجع	۱/۰۰۰			



شکل ۱: تغییرات کمیت نسبی بیان ژن Hspb1 در اثر غوطه وری در آب سرد پس از فعالیت ورزشی

بحث

بررسی تغییرات کمی بیان ژن Hspb۱ نسبت به ژن مرجع β-actin نشان داد بین گروه Ex و گروه Ex+CWI تغییر معنی داری وجود دارد. به نحوی که بیان ژن Hspb۱، ۴۸ ساعت پس از فعالیت ورزشی درحد معنی داری در گروه Ex+CWI کمتر از گروه Ex بود(P=۰/۰۱۶). به علاوه، نتایج نشان می‌دهند در وهله زمانی ۳ ساعت پس از فعالیت ورزشی، بیان ژن در هر دو گروه Ex و Ex+CWI نسبت به گروه کنترل (به ترتیب، حدود ۳ و ۵ برابر) افزایش معنی داری داشته است. درواقع، افزایش بیان ژن در گروه Ex+CWI بیشتر از گروه Ex بوده است، اما این تفاوت از نظر آماری معنی دار نیست. ۴۸ ساعت پس از فعالیت ورزشی بیان ژن باوجود آنکه کمی زیادتر از گروه کنترل بوده اما تفاوت معنی داری مشاهده نشد. این درحالی است که در همین وهله زمانی بیان ژن در گروه Ex+CWI درحد معنی داری کمتر از گروه کنترل گزارش شده است(P=۰/۰۰۵). وهله‌های زمانی آسیب عبارتند از آسیب اولیه و بدنبال آن فرایند التهابی. آسیب اولیه در اثر آسیب مکانیکی ساختار سلول عضلانی از جمله سارکومرها، سایتواسکلتون، و سارکولما ایجاد می‌شود. بلافاصله پس از انقباض‌های برونگرا، بهم ریختگی نظم سارکومر ازجمله کشیدگی بیش از حد سارکومرها و سارکومرهای نامرتب مشاهده می‌شود. پس از آسیب اولیه، فرایند التهابی عبارتند از فعال شدن و هجوم سلولهای التهابی به عضله آسیب دیده، مهاجرت به جایگاههای آسیب، بیگانه خواری بافت دچار نکروز، و رهاشدن چموکینها و رادیکالهای آزاد. رادیکالهای آزاد ناشی از عوامل التهابی می‌توانند آسیب وارد شده به عضله اسکلتی را تشدید کنند. در مجموع، به نظر می‌رسد آسیب تاخیری پس از فعالیت ورزشی برونگرا احتمالاً ناشی از سلولهای التهابی است (۲۳). همسو با نتایج این پژوهش و افزایش بیان ژن Hspb۱ در هر دو گروه آزمایشی در وهله زمانی ۳ ساعت، پالسون و همکاران (۲۰۰۷) تاثیر یک وهله فعالیت ورزشی

بیشینه نامتعارف برونگرا شامل ۳۰۰ تکرار را بر بیان Hspb۱ در دانشجویان مرد سالم مطالعه کردند(۲۰). بررسی های مولکولی این مطالعه نشان می‌دهد مقادیر mRNA عضله نیز در زمان های ۴ و ۲۴ ساعت به ترتیب ۴ و ۸ برابر افزایش داشته است. برخلاف نتایج این پژوهش، تامسون و همکاران (۲۰۰۳) تغییر معنی داری در بیان ژن Hspb1 پس از دویدن در سراشیبی (در شیب منفی ۱۰ درجه، به مدت ۳۰ دقیقه، با سرعت معادل ۷۷درصد حداکثر ضربان بیشینه) گزارش نکردند(۱۸). هرچند، میزان افزایش HSP25mRNA در هر دو عضله ۱۳۵ درصد افزایش داشت، به دلیل تفاوتهای فردی زیاد در عضله راست رانی (درگیر در دویدن در سراشیبی) معنی دار نبود. در تفسیر مطالعات انسانی باید توجه داشت تفاوتهای فردی نقش مهمی در تغییرات بیان ژن Hsp۱ دارند(۲۰). در واقع، مقادیر پروتئین و mRNA – هردو – در پاسخ ژن به استرسهای بعدی تاثیردارند. عامل نسخه برداری شوک گرمایی (HSF-1)، ظرف چند دقیقه، با شوک گرمایی، هیپوکسی، تخلیه ATP، تغییر در PH، مهارکننده‌های متابولیک، و فعالیت ورزشی فعال می‌شود. هرچند HSPها در سطح نسخه برداری تنظیم می‌شوند، ممکن است سازوکارهای پس از نسخه برداری نیز در بیان آنها در سطح پروتئین دخالت داشته باشند. با توجه به این مسئله، غوطه وری در آب سرد می‌تواند شرایط پس از نسخه برداری را تغییردهد و درنهایت حتی اگر بیان ژن در اثر فعالیت آسیب زا در ابتدا یکسان باشد، در مراحل پس از نسخه برداری و بیان در سطح پروتئین اثر خود را بگذارد و مقادیر نهایی پروتئین را تغییر دهد. فعالیت ورزشی، به خصوص فعالیت ورزشی برون گرا، به افزایش دمای عضلانی و مرکزی منجر می‌شود. لذا، شرایط فیزیولوژیک طبیعی سلول را تغییر می‌دهد. در مطالعات قبلی، انباشت سریع HSPmRNA پس از شوک گرمایی و کاهش بعدی آن نشان داده شده است(۱۶, ۲۰). در میان HSPهای کوچک تنها HSP25 از راه شوک گرمایی القاء می‌شود(۱۲). پژوهشها نشان داده‌اند HSPmRNA در شرایط فیزیولوژیک ناپایدار است. از سوئی، پژوهشها نشان داده‌اند غوطه وری در آب سرد، دمای مرکزی و عضلانی را کاهش می‌دهد(۲۴). به علاوه، نشان داده شده است Hspb۱ به ویژه از راه شوک گرمایی القاء می‌شود. پس از قرارگیری در آب سرد و خنک کردن بدن، بازگشت دما به شرایط فیزیولوژیک از سوئی می‌تواند بیان ژن را کاهش دهد و از سوئی ناپایداری HSPmRNA را افزایش می‌دهد. لذا، کاهش بیان ژن ۴۸ ساعت پس از فعالیت ورزشی می‌تواند با منطقهای فیزیولوژیک موجود همسو باشد. البته، شوک سرمایی خود عامل القای بیان HSP است. هرچند این شوک گذراست و سریعا شرایط به وضعیت طبیعی برمی گردد. شاید به همین دلیل است که در این پژوهش در وهله زمانی ۳ ساعت، با افزایش بیان اندکی در گروه Ex+CWI مواجه هستیم، هرچند که این افزایش از نظر آماری معنی دار نیست. از طرف دیگر باید این نکته را نیز مدنظر گرفت که تعداد کم آزمودنی ها می تواند دلیل معنی دار نبودن تفاوت موجود باشد. باوجود این، لوک و همکاران (۲۰۰۱) اعتقاد دارند سرمادرمانی می‌تواند دمای عضله را تا حدی کاهش دهد که از راه شوک سرمایی، HSPs افزایش و بدین ترتیب به سلول ها و بافتهای آسیب دیده کمک شود. در مطالعه‌ای که این پژوهشگران برای اثبات این فرضیه انجام دادند، استرس سرمایی برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای عضلانی ۸ یا ۲۰ درجه سانتی گراد، پروتئین های استرسی عضله را افزایش نداد (۲۵). البته، اگر دما بسیار کم (کمتر از ۵ درجه سانتی گراد) و مدت سرمادرمانی بسیار طولانی (یک تا هشت ساعت) باشد، شوک سرمایی به پروتئین ها آسیب می‌زند و پروتئین های استرسی به جای کاهش افزایش می‌یابند (۲۶). لازم به ذکر است Hspb۱ به ویژه نسبت به HSPهای دیگر با سینتیک آهسته‌تری انباشته و در زمان طولانی‌تری پس از استرس سنتز می-شود (۱۴و۱۳).

نتیجه‌گیری

مهم ترین یافته پژوهش این است که استفاده از غوطه وری در آب سرد پس از فعالیت ورزشی برونگرا می تواند بیان ژن Hspb1 را در دوره بازیافت تاخیری سرکوب کند. در این وهله زمانی عضله اسکلتی معمولا با آسیب ثانویه ای مواجه می شود که ناشی از فرایند التهابی و هجوم سلول های التهابی به عضله آسیب دیده است. لذا، با توجه به نقش احتمالی HSP25 در محافظت از عضله در برابر آسیب، ایجاد تاخیر یا سرکوب بیان ژن Hspb1 می تواند در فرایند بازیافت تاخیری تداخل ایجادکند. باتوجه به اهمیت دوره بازیافت و روشن تر شدن نقش این ژن در عضله اسکلتی پیشنهاد می شود تغییرات در سطح پروتئینی (HSP25) نیز بررسی شود. به علاوه، برای بررسی رفتار این ژن در پاسخ به سرما بهتر است وهله های زمانی نمونه گیری را افزایش داد تا مشخص شود در چه زمانی بیان این ژن به اوج خود می رسد.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی وزارت علوم، تحقیقات، و فناوری در حمایت از اجرای این کار پژوهشی با فراهم کردن امکان استفاده از امکانات پژوهشی وابسته و همچنین مسئولین محترم پژوهشگاه ملی ژنتیک و زیست فناوری در همکاری در مراحل اجرایی طرح پژوهشی قدردانی می‌شود.

References

1. Schniepp J, Campbell TS, Powell KL, Pincivero DM. The effects of cold-water immersion on power output and heart rate in elite cyclists. *J Strength Cond Res* 2002; **16**(4): 561-566.
2. Yamane M, Teruya H, Nakano M, Ogai R, Ohnishi N, Kosaka M. Post-exercise leg and forearm flexor muscle cooling in humans attenuates endurance and resistance training effects on muscle performance and on circulatory adaptation. *Eur J Appl Physiol* 2006; **96**(5): 572-580.
3. Crowe MJ, O'Connor D, Rudd D. Cold water recovery reduces anaerobic performance. *Int J Sports Med* 2007; **28**(12): 994-998.
4. Sellwood KL, Brukner P, Williams D, Nicol A, Hinman R. Ice-water immersion and delayed-onset muscle soreness: a randomised controlled trial. *Br J Sports Med* 2007; **41**(6): 392-397.
5. Ingram J, Dawson B, Goodman C, Wallman K, Beilby J. Effect of water immersion methods on post-exercise recovery from simulated team sport exercise. *J Sci Med Sport* 2009; **12**(3): 417-421.
6. Bleakley CM, Davison GW. What is the biochemical and physiological rationale for using cold-water immersion in sports recovery? A systematic review. *Br J Sports Med* 2010; **44**(3): 179-187.
7. Datta A, Tipton M. Respiratory responses to cold water immersion: neural pathways, interactions, and clinical consequences awake and asleep. *J Appl Physiol* 2006; **100**(6): 2057-2064.
8. Tipton MJ. The initial responses to cold-water immersion in man. *Clin Sci* (*Lond*) 1989; **77**(6): 581-588.
9. Uehara K, Goto K, Kobayashi T, Kojima A, Akema T, Sugiura T, et al. Heat-stress enhances proliferative potential in rat soleus muscle. *Jpn J Physiol* 2004; **54**(3): 263-271.
10. Morimoto RI. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* 1993; **259**(5100): 1409-1410.
11. Kregel KC. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol* 2002; **92**(5): 2177-2186.
12. Mounier N, Arrigo AP. Actin cytoskeleton and small heat shock proteins: how do they interact? *Cell Stress Chaperones* 2002; **7**(2): 167-176.
13. Arrigo AP, Pauli D. Characterization of HSP27 and three immunologically related polypeptides during Drosophila development. *Exp Cell Res* 1988; **175**(1): 169-183.
14. Landry J, Chretien P, Laszlo A, Lambert H. Phosphorylation of HSP27 during development and decay of thermotolerance in Chinese hamster cells. *J Cell Physiol* 1991; **147**(1): 93-101.
15. Murlasits Z, Cutlip RG, Geronilla KB, Rao KM, Wonderlin WF, Alway SE. Resistance training increases heat shock protein levels in skeletal muscle of young and old rats. *Exp Geronto* 2006; **41**(4): 398-406.
16. Morton JP, MacLaren DP, Cable NT, Bongers T, Griffiths RD, Campbell IT, et al. Time course and differential responses of the major heat shock protein families in human skeletal muscle following acute nondamaging treadmill exercise. *J Appl Physiol* 2006; **101**(1): 176-182.
17. Folkesson M, Mackey AL, Holm L, Kjaer M, Paulsen G, Raastad T, et al. Immunohistochemical changes in the expression of HSP27 in exercised human vastus lateralis muscle. *Acta Physiol (Oxf)* 2008; **194**(3): 215-222.
18. Thompson HS, Maynard EB, Morales ER, Scordilis SP. Exercise-induced HSP27, HSP70 and MAPK responses in human skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 2003; **178**(1): 61-72.
19. Thompson HS, Clarkson PM, Scordilis SP. The repeated bout effect and heat shock proteins: intramuscular HSP27 and HSP70 expression following two bouts of eccentric exercise in humans. *Acta Physiol Scand* 2002; **174**(1): 47-56.
20. Paulsen G, Vissing K, Kalhovde JM, Ugelstad I, Bayer ML, Kadi F, et al. Maximal eccentric exercise induces a rapid accumulation of small heat shock proteins on myofibrils and a delayed HSP70 response in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; **293**(2): 844-853.
21. Feasson L, Stockholm D, Freyssenet D, Richard I, Duguez S, Beckmann JS, et al. Molecular adaptations of neuromuscular disease-associated proteins in response to eccentric exercise in human skeletal muscle. *J Physiol* 2002; **543**(1): 297-306.
22. Kojima A, Goto K, Morioka S, Naito T, Akema T, Fujiya H, et al. Heat stress facilitates the regeneration of injured skeletal muscle in rats. *J Orthop Sci* 2007; **12**(1): 74-82.

23. Koh TJ. Do small heat shock proteins protect skeletal muscle from injury? *Exerc Sport Sci Rev* 2002; **30**(3): 117-121.
24. Peiffer JJ, Abbiss CR, Watson G, Nosaka K, Laursen PB. Effect of cold-water immersion duration on body temperature and muscle function. *J Sports Sci* 2009; **27**(10): 987-993.
25. Locke M, Celotti C. Cold stress does not induce stress proteins SP 25 and SP 72 in rat skeletal muscle. *Cryobiology* 2001; **43**(1): 54-62.
26. Matz JM, Blake MJ, Tatelman HM, Lavoi KP, Holbrook NJ. Characterization and regulation of cold-induced heat shock protein expression in mouse brown adipose tissue. *Am J Physiol* 1995; **269**(1 Pt 2): 38-47.