

## اثر تمرینات فزاینده شمشیربازی بر بیان ژن و فعالیت سرمی ماتریکس متالوپروتئیناز ۲ (MMP2) در دختران شمشیرباز نخبه

بختیار ترتیبیان<sup>۱</sup>، معصومه فتحعلی زاده<sup>۲</sup>، دینا کیهانی<sup>۳</sup>

۱. دانشیار گروه آسیب شناسی و حرکات اصلاحی دانشگاه علامه طباطبائی تهران ( هسته پژوهشی فیزیولوژی تندرستی و فعالیت بدنی)
۲. کارشناسی ارشد فیزیولوژی ورزشی دانشگاه ارومیه
۳. دانشجوی دکتری تخصصی گرایش فیزیولوژی ورزشی قلب و عروق و تنفس دانشگاه ارومیه

تاریخ پذیرش مقاله: ۹۵/۱/۵

تاریخ دریافت مقاله: ۹۳/۲/۱۳

### چکیده

**هدف تحقیق:** متالوپروتئینازهای ماتریکس (MMPs) نقش مهمی در هموستاز ماتریکس خارج سلولی عضلات اسکلتی بازی می کنند. هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر هشت هفته تمرینات شمشیربازی فزاینده بر بیان ژن و فعالیت سرمی ماتریکس متالوپروتئیناز ۲ دختران شمشیرباز نخبه بود. **روش تحقیق:** در این پژوهش ۱۹ شمشیرباز دختر جوان داوطلبانه انتخاب و به صورت تصادفی در دو گروه تجربی و کنترل تقسیم بندی شدند. آزمودنی های گروه تجربی ۸ هفته و هر هفته ۵ جلسه در تمرین شمشیربازی فزاینده شرکت کردند. در حالی که گروه کنترل در این مدت هیچ گونه برنامه تمرینی نداشتند. نمونه های خونی ناشتای آزمودنی قبل، ۴ هفته بعد و نهایتاً ۴۸ ساعت پس از اتمام دوره تمرینی گرفته شد. بیان ژن MMP2 آزمودنی ها با استفاده از روش Real time-PCR اندازه گیری شد و فعالیت MMP2 به روش الیزا اندازه گیری گردید. در پایان با استفاده از آزمون آماری t مستقل میانگین بیان ژن mmp2 دو گروه تجربی و کنترل مقایسه شد. **نتایج:** نتایج این پژوهش نشان داد که میزان بیان mRNA ژن MMP2 پس از ۸ هفته تمرین در گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل کاهش معناداری داشت ( $P < 0.05$ ). **بحث و نتیجه گیری:** فعالیت پروتئیناز MMP2 و بیان ژن این آنزیم پس از تمرینات فزاینده شمشیربازی در افراد فعال کاهش می یابد که در نتیجه، فعالیت بدنی سبب کاهش تخریب ماتریکس خارج سلولی و صدمات بافت عضلانی در دختران شمشیرباز و فعال می شود.

**کلید واژه ها:** ژن گلاتیناز A، تمرینات شمشیربازی فزاینده، دختران ورزشکار

### Effect of progressive fencing exercis training on gene expression and serum activity of matrix metalloproteinase 2 (MMP2) in elite girls fencer

#### Abstract

**Purpose:** Matrix metalloproteinases (MMPs) play an important role in the homeostasis of the extracellular matrix (ECM) in skeletal muscle. The purpose of the current study was to investigate the effect of 8 weeks progressive fencing exercises on MMP2 activity and gene expression in elite fencer girls. **Method:** In this study, 19 young athlete girls were voluntarily selected and randomly allocated to the experimental and control groups. Subjects in the experimental group performed five sessions of progressive fencing exercise per week for 8 weeks, while the control group didn't participate in any exercise programs. A Fasting blood sample was taken from all participants before, after four weeks and finally 48 hours after the exercise program. MMP2 gene expression was measured using Real time-PCR and Serum MMP2 activity was measured by ELISA method. Finally, to compare the mean of mmp2 gene expression in experimental and control group, independent t-test was used. **Results:** Results showed that expression of MMP2 mRNA was significantly decreased following eight week progressive fencing exercises in the exercise group in comparison with the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions:** Proteinase activity of MMP2 and gene expression of this enzyme is reduced in active individuals after progressive fencing training; in conclusion physical activity reduces the degradation of extracellular matrix and muscle tissue injury in elite fencer girls.

**Keywords:** Gelatinase A gene, progressive fencing exercises, athlete girls.

تلفن: ۰۹۱۲۶۰۹۰۵۵۱

✉ نویسنده مسئول: بختیار ترتیبیان

ارومیه، کیلومتر ۱۱ جاده سرو، دانشگاه ارومیه، دانشکده تربیت بدنی، گروه فیزیولوژی ورزشی

پست الکترونیکی: ba.tartibian@gmail.com

## مقدمه

تسهیل می‌کنند (۱۱، ۱۲). به نظر می‌رسد ماتریکس متالوپروتئیناز نوع دو (MMP2) مهمترین ماتریکس متالوپروتئینازی باشد که با عملکرد و یا نقص عملکرد عضلات اسکلتی در ارتباط است (۱۳). MMP2 (گلاتیناز A) در هنگام هموستاز در تارهای عضلات اسکلتی تولید می‌شود و با محرک‌های فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی دچار بیش‌تنظیمی می‌شود (۱۴، ۱۵). مطالعات نشان داده‌اند که این آنزیم همچون MMP9 (گلاتیناز B) در آنژیوژن (رگ زایی) درگیر است و سبب تجزیه کلژن‌های غشاء پایه (نوع IV)، فیبرونکتین، پروتئوگلیکان‌ها و لامینین می‌شود (۱۶). MMP2 به واسطه تغییراتی که در ماتریکس خارج سلولی ایجاد می‌کند و همچنین با فعالسازی مولکول‌های سیگنالینگ بر حرکت، تمایز و تولید مجدد میوفیبریل‌های عضلانی تأثیرگذار است (۱۷). با وجود این که منابع سلولی گلاتینازها (MMP2 و MMP9) در بافت عضلانی در هنگام ورزش ناشناخته مانده است، اما جالب است که تحقیقات اخیر فعالیت درون سلولی و وجود سوسبترهایی غیر از اجزای ماتریکس خارج سلولی برای گلاتینازها را گزارش داده‌اند (۱۸). نتایج مطالعات انجام شده بیانگر این است که نحوه فعال شدن و بیان ژنی MMP2 و سایر ماتریکس متالوپروتئینازهای عضلات اسکلتی مانند MMP9 در پاسخ به تمرینات ورزشی متفاوت است (۱۹). در حال حاضر اطلاعات محدودی در رابطه با اثر فعالیت ورزشی بر بیان ژن و غلظت سرمی MMPs وجود دارد. برخی محققان بر این باورند که سطوح mRNA و پروتئین MMPs متعاقب تمرینات ورزشی شدید افزایش می‌یابد (۲۰، ۲۱). در این راستا، رالمن<sup>۱۱</sup> و همکاران (۲۰۰۹) اثر تمرینات ورزشی با محدودیت و بدون محدودیت جریان خون را بر بیان و فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازهای عضلات اسکلتی مردان جوان سنجیدند و در زمان‌های قبل، ۱۰ روز بعد و پنج هفته پس از دوره تمرینی از عضله پهن خارجی بایوپسی (نمونه برداری از بافت عضلانی) انجام شد، آن‌ها گزارش کردند که پس از ده روز سطح MMP2 mRNA و MMP9 با صرف نظر از جریان خون افزایش یافت و این افزایش تا ۵ هفته پس از انجام دوره تمرینی باقی ماند (۲۲). در حالی

تغییرات عملکردی و ویژگی‌های مورفولوژیک عضلات اسکلتی تحت شرایط مختلف و در پاسخ به دامنه وسیعی از محرک‌های پاتولوژیک و فیزیولوژیک اتفاق می‌افتد (۱) که بیشتر این مراحل به تغییرات ماتریکس خارج سلولی<sup>۱</sup> (ECM) وابسته‌اند. در واقع، بیش‌تنظیمی بسیاری از ژن‌ها در پاسخ به تمرینات ورزشی به گونه‌ای مرتبط با ماتریکس خارج سلولی می‌باشد (۲). از این رو تمرینات ورزشی متفاوت تغییرات زیادی در روند بیان ژن‌ها ایجاد می‌کنند که سبب تنظیم ساختار ماتریکس خارج سلولی، میوفیبریل‌ها و ترکیبات پروتئینی غشاء می‌شوند و در نتیجه آنزیم‌های متابولیکی بازده عملکرد عضلات اسکلتی را در فعالیت‌های ورزشی جدید ارتقاء می‌دهند (۳-۵). ماتریکس متالوپروتئینازها<sup>۲</sup> (MMP)، پروتئینازهایی هستند که ترکیبات ماتریکس سلولی را تنظیم نموده و برای ایجاد تغییرات در ساختار ماتریکس خارج سلولی به عنوان اندوپیتیدازهای وابسته به روی و کلسیم<sup>۳</sup> شناخته شده‌اند (۶). ژنوم انسانی ۲۴ ژن ماتریکسین<sup>۴</sup> دارد که شامل یک ژن نسخه برداری شده MMP23 است، با این حال، ۲۳ نوع MMP متفاوت وجود دارد که در ۶ گروه متفاوت کلژنازها<sup>۵</sup>، گلاتینازها<sup>۶</sup>، استرومولیزین‌ها<sup>۷</sup>، ماتریلیزین‌ها<sup>۸</sup>، ماتریکس متالوپروتئینازهای متصل به غشاء (MT-MMPs)<sup>۹</sup> و سایر ماتریکس متالوپروتئینازها<sup>۱۰</sup> طبقه‌بندی شده‌اند (۷). ماتریکس متالوپروتئینازها در بیشتر بافت‌ها یافت می‌شوند، مطالعات نشان داده‌اند که MMPها در رشد، تکامل و آنژیوژن (رگ زایی) نقش حیاتی بازی می‌کنند (۸، ۹). هر کدام از ماتریکس متالوپروتئینازها سوبسترای خاصی را مورد هدف قرار می‌دهند، بنابراین MMPs مناسب در زمان و مکان خاص و در پاسخ به رفتار معینی ترشح می‌شوند تا تغییرات غشایی و سازگاری را تعدیل نمایند (۱۰).

نقش ماتریکس متالوپروتئینازها در عضلات اسکلتی در عملکرد پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی همکاری در تجزیه و بازسازی ماتریکس است، در حالی که رهاسازی ماتریکس متالوپروتئینازها در جریان خون آنژیوژن را

بررسی قرار گرفته است (۱۵) و با توجه به تشابه ماهیت تمرینات شمشیربازی با تمرینات تناوبی شدید و همچنین با توجه به بیان ژنی این فاکتور در بافت خون انسان، اندازه‌گیری بیان ژنی MMP2 در خون روی نمونه‌های انسانی ضروری به نظر می‌رسد. از این رو محققان مطالعه حاضر بر آنند تا اثر هشت هفته تمرینات شمشیربازی فزاینده را بر فعالیت سرمی و بیان ژن ماتریکس متالوپروتئیناز نوع ۲ در دختران شمشیرباز نخبه بررسی نمایند.

### روش پژوهش

**نمونه‌ها:** پژوهش حاضر از نوع تحقیقات نیمه تجربی و شامل دو گروه با پیش‌آزمون و دو پس‌آزمون بوده است. به همین منظور، ۱۹ آزمودنی با دامنه سنی ۱۶ تا ۲۱ سال به طور تصادفی از بین دختران شمشیر باز نخبه به عنوان نمونه آماری انتخاب و در دو گروه تجربی (۱۱ نفر) و کنترل (۸ نفر) قرار گرفتند. معیارهای ورود به مطالعه عبارت بودند از: شرکت در فعالیت‌های ورزشی منظم حداقل به مدت ۳ سال، سابقه شرکت در مسابقات ملی و بین‌المللی شمشیربازی، عدم شرکت در فعالیت ورزشی یک ماه قبل از انجام پژوهش، داشتن خواب و انگیزه کافی جهت شرکت در مطالعه. معیارهای خروج از مطالعه عبارت بودند از: استفاده از دارو، عدم تمایل برای شرکت در پژوهش، عدم رضایت والدین، آسیب عضلانی قبل از تمرینات و یا در طی دوره تمرینی. در طی یک جلسه توجیهی آزمودنی‌ها با اهداف و مراحل انجام پژوهش آشنا شدند و در ادامه با استفاده از پرسشنامه مخصوص وضعیت سلامتی (۲۶)، عدم استفاده از دارو، خواب کافی (حداقل ۷ ساعت در شبانه روز)، عدم استفاده از مکمل‌ها، عدم استفاده از مواد مخدر و انگیزه لازم جهت شرکت در پژوهش کنترل گردید. رژیم غذایی آزمودنی‌ها بوسیله پرسشنامه ثبت سه روزه غذایی (۲۷) و خود گزارشی کنترل شد. با توجه به اینکه تعدادی از آزمودنی‌ها به سن قانونی نرسیده بودند، رضایت نامه کتبی از والدینشان دریافت شد.

که برخی مطالعات در این زمینه یافته‌های متفاوتی را گزارش داده‌اند. در جدیدترین مطالعات انجام شده هادلر اولسن<sup>۱۲</sup> و همکاران (۲۰۱۴) کاهش فعالیت گلاتینولیتیکی عضلات نوع II و نوع I را متعاقب تمرینات شدید تناوبی در موش‌ها گزارش دادند. محققان در آن پژوهش همبستگی مثبت معنادار فعالیت گلاتینولیتیکی و MMP2 را نشان دادند (۲۳). در همین راستا، طاهری و همکاران (۱۳۹۰) پاسخ مشابه سطح فعالیت MMP2 را در دو گروه مردان جوان فعال و غیرفعال متعاقب یک وهله فعالیت ورزشی زیربیشینه (۵۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی) گزارش دادند (۲۴). به نظر می‌رسد نوع فعالیت بدنی در پاسخ MMP2 نقش داشته باشد. شمشیربازی شامل دوره‌های متناوب کوتاه شدید و حمله‌های ناگهانی در برابر دفاع حریف مقابل می‌باشد و با دوره‌های با شدت کمتر مانند پرش‌های کوتاه همراه است. شمشیربازی مدرن با سه اسلحهٔ ایه، فلوره و سایر اجرا می‌گردد. نیازهای انرژی این ورزش غیرقابل پیش‌بینی است و بستگی به مدت زمان مراحل مختلف آن دارد. تحقیقات نشان داده‌اند که قدرت انفجاری برون‌گرا عضلات پا برای به حداکثر رساندن عملکرد شمشیربازان نخبه بسیار مهم است (۲۵). لذا به نظر می‌رسد با توجه به بکارگیری عضلات بالاتنه و پایین تنه آنزیم‌های پروتئینازی در عملکرد عضلانی این ورزشکاران دخیل باشد. اگرچه در مطالعات معدودی تأثیر تمرینات ورزشی متفاوت را بر عملکرد شمشیربازان نخبه زن سنجیده‌اند اما مطالعه‌ای که آنزیم‌های عضلانی این ورزشکاران را مورد بررسی قرار دهد، یافت نشد. هم‌چنین در مطالعاتی که در زمینه MMPها انجام شده، MMP2 کمتر مورد بررسی قرار گرفته است و تمرکز بیشتر مطالعات بر MMP9 بوده است، ضمن اینکه برنامه‌های تمرینی که در بیشتر مطالعات استفاده شده است از نوع جلسات تمرینی حاد و برون‌گرا بوده است و با توجه به تفاوت شدت، مدت، جنسیت، نژاد و سطح فعالیت بدنی جامعه مورد بررسی، نتایج به دست آمده یکسان نبوده و حتی گاهی تناقض به چشم می‌خورد. از آنجایی که بیان ژن MMP2 در عضلات تند انقباض حیوانات به دنبال تمرینات تناوبی شدید مورد

## پروتکل تحقیق

**روش جمع آوری اطلاعات:** شاخص‌های دموگرافیک آزمودنی‌ها شامل قد (سانتی متر) و وزن (کیلوگرم) به ترتیب با استفاده از قدسنج دیواری سکا<sup>۱۳</sup> ساخت کشور آلمان (با دقت ۰/۱ میلی متر) و ترازوی زوهنل<sup>۱۴</sup> ساخت کشور آلمان (با دقت ۰/۱ کیلوگرم) با حداقل لباس و بدون کفش اندازه‌گیری شد. شاخص توده بدن (کیلوگرم/مترمربع) و درصد چربی آزمودنی‌ها با استفاده از دستگاه پرتابل اومرون ساخت چین و ضربان قلب (ضربه در دقیقه) و فشار خون (میلی متر جیوه) با فشارسنج مچی (مدل لایکای ساخت کشور ایتالیا) اندازه‌گیری شدند. همچنین زمان برنامه تمرینی توسط کرنومتر کاسیو ساخت ژاپن با دقت ۰/۰۱ ثانیه اندازه‌گیری گردید (جدول ۳).

**برنامه تمرینی:** گروه تجربی ۸ هفته در یک دوره تمرینی شمشیربازی شدید فزاینده شرکت کردند. این تمرینات تحت نظر مربیان مجرب شمشیربازی تیم ملی و با حضور متخصص فیزیولوژی ورزش انجام گرفت. جلسات تمرینی در سالن ورزشی ویژه شمشیربازی در شهرستان ارومیه با دامنه دمای ۲۸-۲۵ درجه سانتیگراد، دامنه رطوبت نسبی ۵۵-۵۰ درصد، تهویه و نور محیطی مناسب و بین ساعات ۱۵:۰۰ تا ۱۶:۳۰ بعدازظهر در چهار هفته اول و بین ساعات ۱۵:۰۰ تا ۱۷:۰۰ بعدازظهر در چهار هفته دوم انجام شد. چهار هفته اول تمرینات شامل تمرینات اختصاصی شمشیربازی با شدت ۶۰ تا ۷۰ درصد ضربان قلب ذخیره بود که ۵ جلسه در هفته و هر جلسه تقریباً ۹۰ دقیقه بطول می‌انجامید. برنامه هر جلسه شامل ۲۰ دقیقه دویدن آرام و گرم کردن عمومی، ۱۰ دقیقه گرم کردن اختصاصی، ۱۰ دقیقه تمرینات مخصوص شمشیربازی مانند تمرین حرکات قدم، توش، دفاع‌ها، حمله، فلش و حرکات ترکیبی که توسط هر فرد به تنهایی و با در نظر گرفتن حریف فرضی انجام شد، سپس شمشیربازان در سه دوره نبرد نه دقیقه‌ای (با سه اسلحه) (۳×۳) و یک دقیقه استراحت بین هر سه دقیقه شرکت کردند و بین هر دوره ده دقیقه استراحت داشتند (۲۸) و نهایتاً ۱۰ دقیقه پایانی به سرد کردن اختصاص یافت. از هفته پنجم تا هفته هشتم

مدت جلسات تمرینی به ۱۲۰ دقیقه و شدت تمرینات تا ۸۵ درصد ضربان قلب ذخیره (فرمول زیر) (۲۹) آزمودنی‌ها افزایش یافت.

ضربان قلب استراحت + (شدت تمرین × ضربان قلب استراحت - ضربان قلب پیشینه) = ضربان قلب ذخیره

## روش‌های آزمایشگاهی

**خون‌گیری:** در ابتدای شروع دوره تمرینی از همه آزمودنی‌ها پس از حداقل ۱۱ ساعت ناشتایی بین ساعات ۸ تا ۱۰ صبح به مقدار ۱۰ میلی لیتر از ورید بازویی دست چپ خون‌گیری به عمل آمد. مرحله دوم و سوم خون‌گیری در پایان هفته چهارم و هفته هشتم ۴۸ ساعت پس از اتمام آخرین جلسه تمرینی انجام شد و طی مراحل خاصی پس از آماده سازی، نمونه‌ها در دمای ۸۰- فریز شدند.

## جداسازی لنفوسیت‌ها: در مراحل اولیه، لنفوسیت‌های

خون توسط محلول فایکول جدا شدند که در ابتدا ۴ میلی لیتر از خون حاوی ماده ضد انعقاد (EDTA) با ۴ میلی لیتر سالین مخلوط شدند، سپس در دو لوله سانترفیوژ ۴ میلی مول فایکول ریخته شد. سپس خون رقیق شده با نرمالین به هر کدام از لوله‌های حاوی فایکول اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه سانترفیوژ (۴۰۰g) شد. لایه‌ای که حاوی لنفوسیت‌ها<sup>۱۵</sup> بود به آرامی جدا شد و به یک لوله سانترفیوژ تمیز منتقل شد. معادل حجم لنفوسیت‌های جدا شده سالین اضافه شد و در سانترفیوژ ۲۶۰ گرم و در دمای ۲۲ درجه قرار گرفت. سپس مایع روی سلول‌های پک شده بیرون ریخته شد و بعد از جداسازی لنفوسیت‌ها مراحل استخراج RNA به ترتیب و بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت انجام شد.

## استخراج RNA: جداسازی RNA از نمونه‌های خونی

با استفاده از کیت<sup>۱۶</sup> استخراج و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد و RNA توسط محلول جداسازی RNA<sup>۱۷</sup> استخراج شد. ۴۰۰ میکرولیتر از بافر RLT برای هر نمونه با ۴۰ میکرومتر از ۲-مرکاپتواتانول مخلوط شد، پس از آن خون محیطی با بافر لیزکننده سلول مخلوط شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد انکوبه و سانترفیوژ (۱۰۰۰۰g) شد. رسوب به دست آمده

اندازه‌گیری شد. این روش به کمک پرایمر اختصاصی MMP2 انجام شد و برای کنترل تکثیر این ژن از پرایمر اختصاصی  $\beta$ actin استفاده شد زیرا ژن خانه‌گردان<sup>۲۹</sup>  $\beta$ actin می‌تواند شاهد خوبی برای بررسی بیان ژن MMP2 باشد (جدول ۱). برنامه Real time PCR شامل ۵۰<sup>o</sup> به مدت ۲ دقیقه، ۹۵<sup>o</sup> به مدت ۱۰ دقیقه، ۹۵<sup>o</sup> به مدت ۳۰ ثانیه و ۶۰<sup>o</sup> به مدت ۴۰ ثانیه (دو مرحله پایانی تکرار ۳۵ سیکل) بود. کمی‌سازی مقادیر بیان ژن هدف از فرمول<sup>۳۰</sup> استفاده شد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در بیان ژن ماتریکس متالوپروتئیناز ۲ ژن

توالی آغازگر	پرایمر	
5'-GTGCCATGTAATCCCCACT-3'	مستقیم	MMP2
5'-CTCCACTCCTCCCTTCCTC-3'	معکوس	
5'-ACCGAGCGGGCTACAG-3'	مستقیم	Bactin
5'-CTTAATGTCACGCACGATTTC-3'	معکوس	

**اندازه‌گیری غلظت سرمی MMP2:** غلظت سرمی MMP2 (نانوگرم بر میلی لیتر) دختران شمشیر باز نخبه، در سه مرحله زمانی پایه، پایان چهار هفته اول و پایان چهار هفته دوم تمرینات فزاینده شمشیربازی توسط کیت<sup>۳۰</sup> ساخت کشور آمریکا (شرکت لایف تکنولوژی<sup>۳۱</sup>) و به روش الیزا<sup>۳۲</sup> اندازه‌گیری شد.

### تحلیل آماری

برای توصیف داده‌های تحقیق حاضر از آمار توصیفی شامل میانگین و انحراف استاندارد استفاده گردید. از آزمون کلموگراف-اسمیرنوف برای تعیین توزیع طبیعی داده‌ها و از آزمون آماری اندازه‌های تکراری<sup>۳۳</sup> و آزمون تعقیبی بنفرونی برای مقایسه فعالیت MMP2 سرمی در زمان‌های مختلف استفاده شد. همچنین از آزمون‌های t مستقل برای مقایسه دو گروه کنترل و تجربی و از آزمون t زوجی برای مقایسه درون گروهی بیان ژن MMP2 استفاده گردید. داده‌های پژوهش حاضر با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه<sup>۳۴</sup> و در سطح معناداری  $P \leq 0.05$  تجزیه و تحلیل شدند.

با ۴۰۰ میکرولیتر از بافر RLT باز شد. روی لیزات رد شده از ستون چرخشی ۶۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ اضافه شد و سپس به ستون چرخشی دیگری انتقال داده شد و به مدت ۱۵ ثانیه سانتریفیوژ (۸۰۰ g) شد سپس ۷۰۰ میکرومتر از بافر RWI روی ستون اضافه شد و به مدت ۱۵ ثانیه (۸۰۰ g) سانتریفیوژ شد. تیوپ جمع آوری کننده تعویض شد و مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از بافر RPE اضافه شد و به مدت ۲ دقیقه (۱۰۰۰ g) سانتریفیوژ شد. پس از اتمام مراحل فوق ستون‌ها به یک میکروتیوپ ۱/۵ میلی لیتری منتقل شده و پس از اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر آب مقطر<sup>۱۸</sup> به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ (۱۰۰۰ g) انجام شد. ستون‌ها دور انداخته شدند و مایع به دست آمده که RNA استخراج شده بود جهت سنتز cDNA در دمای ۸۰- قرار گرفت. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده توسط اسپکتروسکوپی UV تعیین شد.

**سنتز cDNA:** برای انجام واکنش RT-PCR، از روی RNA با استفاده از آنزیم<sup>۱۹</sup>، cDNA ساخته شد. به این منظور از کیت<sup>۲۰</sup> سنتز (محصول شرکت فرمنتاز<sup>۲۱</sup> کانادا) استفاده گردید. مقدار ۱ میکرولیتر RNA همراه با یک میکرولیتر<sup>۲۲</sup> بافر در یک لوله ریخته شد و با استفاده از محلول دیگری<sup>۲۳</sup> به حجم ۹ میلی مول رسید. به مقدار ۱ میکرولیتر از پرایمر<sup>۲۴</sup> الیگو<sup>۲۵</sup> (شرکت فرمنتاز کانادا) به لوله اضافه شد و با محلول<sup>۲۶</sup> حجم آن به ۱۱ میلی مول رسید. مخلوطی شامل ۴ میکرولیتر از بافر 5X، ۱ میکرولیتر از بازدارنده ریونوکلئاز<sup>۲۷</sup> و ۲ میکرولیتر از dNTP (10mM) (شرکت فرمنتاز کانادا) آماده شد. پس از اینکه نمونه‌ها چند دقیقه روی یخ قرار گرفتند با مخلوط فوق ترکیب شدند و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. سپس ۱ میکرولیتر از آنزیم نسخه بردار معکوس کننده<sup>۲۸</sup> به نمونه‌ها اضافه گردید و نمونه‌ها در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. پس از اتمام تمامی مراحل فوق نمونه‌ها به دمای ۲۰- منتقل شدند.

**روش Real time PCR:** سطح نسبی mRNA ژن

MMP2 ورزشکاران با استفاده از تکنیک Real time PCR (دستگاه با نام تجاری Smart cycler ساخت کشور آمریکا)

## نتایج

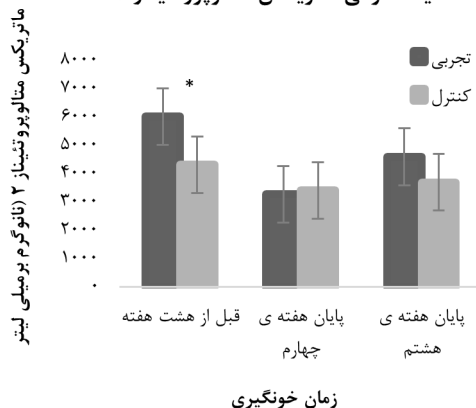
متغیرهای زمینه‌ای اندازه‌گیری شده آزمودنی‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است. گروه تجربی پس از پایان چهار هفته اول و چهار هفته دوم کاهش معنادار غلظت سرمی MMP2 را نسبت به مقدار پایه نشان دادند ( $P < 0.05$ )، اگرچه تفاوت معناداری در غلظت سرمی MMP2 در اندازه‌گیری‌های چهار هفته اول و چهار هفته دوم مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ). از یافته‌های پژوهش حاضر نیز می‌توان به کاهش معنادار غلظت سرمی MMP2 پس از پایان چهار هفته اول و چهار هفته دوم نسبت به مقدار پایه در گروه کنترل اشاره نمود ( $P < 0.05$ )، اگرچه افزایش معنادار غلظت سرمی MMP2 در پایان چهار هفته دوم نسبت به چهار

هفته اول گزارش شد ( $P < 0.05$ ). در مقایسه‌ای که بین دو گروه تجربی و کنترل انجام شد، نتایج حاکی از تفاوت معنادار غلظت سرمی MMP2 پایه بین دو گروه بود ( $P < 0.05$ ) اما در اندازه‌گیری‌های انجام شده پس از چهار هفته اول و چهار هفته دوم تفاوت معناداری در غلظت سرمی MMP2 بین دو گروه مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ) (شکل ۱). بیان ژن MMP2 در هر دو گروه تجربی و کنترل پس از پایان هشت هفته تمرینات فزاینده شمشیربازی کاهش معناداری داشته است، اگرچه کاهش معنادار بیان ژن MMP2 در گروه تجربی نسبت به گروه کنترل در مقایسه بین گروهی پس از هشت هفته تمرین شمشیربازی فزاینده نیز گزارش شد ( $P < 0.05$ ) (شکل ۱).

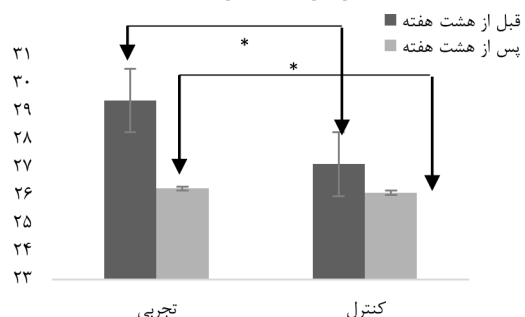
جدول ۲. متغیرهای زمینه‌ای و دموگرافیک آزمودنی

مقدار P	گروه کنترل	گروه تجربی	متغیرهای زمینه‌ای
۰/۹۳	۱۸/۷۵ ± ۱/۹۱	۱۸/۸۲ ± ۱/۴۰	سن (سال)
۰/۲۲	۲۳/۵۳ ± ۰/۹۸	۲۳/۰۳ ± ۰/۷۳	شاخص توده بدن (کیلوگرم بر متر مربع)
۰/۹۹	۲۴/۸۹ ± ۱/۰۵	۲۴/۹۰ ± ۰/۹۵	درصد چربی
۰/۷۶	۶۹ ± ۲	۶۷ ± ۲	ضربان قلب استراحت (ضربه در دقیقه)
۰/۹۴	۱۱۱/۲۳ ± ۱/۴۵	۱۱۰/۲۲ ± ۱/۳۴	فشار خون سیستول (میلی متر جیوه)
۰/۸۷	۷۹/۴۲ ± ۲/۳۷	۷۸/۱۸ ± ۲/۶۵	فشار خون دیاستول (میلی متر جیوه)

فعالیت سرمی ماتریکس متالوپروتئیناز ۲



تغییرات بیان ژن ماتریکس متالوزروتیناز ۲



شکل ۱. مقایسه فعالیت سرمی (سمت راست) و بیان ژن MMP2 در دو گروه تجربی و کنترل (سمت چپ) - \*: تفاوت معنادار در دو گروه

### بحث و نتیجه گیری

هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر هشت هفته تمرینات فزاینده شمشیربازی بر بیان ژن و فعالیت سرمی MMP2 دختران ورزشکار نخبه بود. نتایج پژوهش نشان داد که فعالیت سرمی MMP2 در طی زمان‌های مختلف در هر دو گروه تجربی و کنترل تغییرات معناداری داشته است ( $P < 0/05$ )، اگرچه در پایان هفته چهارم و هفته هشتم با وجود افزایش شدت تمرینات تفاوت معناداری در فعالیت سرمی MMP2 گروه تجربی مشاهده نشد ( $P > 0/05$ ). بررسی‌های آماری نشان داد که بیان ژن MMP2 در گروه تجربی نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری داشت (همچنین یافته‌های این پژوهش بیانگر کاهش بیان ژن MMP2 در هر دو گروه تجربی و کنترل پس از پایان هشت هفته تمرینات شمشیربازی فزاینده بود ( $P < 0/05$ ). تحقیقات انجام شده روی فعالیت سرمی و بیان ژن ماتریکس متالوپروتئینازها متعاقب فعالیت بدنی در نمونه‌های انسانی بسیار محدودند و یافته‌های این مطالعات کاهش، افزایش و یا عدم تغییر فعالیت و بیان ژنی این آنزیم را در زمان‌های مختلف پس از اجرای تمرینات ورزشی گزارش کردند (۲۳، ۳۰).

یورسو<sup>۳۴</sup> و همکاران (۲۰۰۹) در پژوهشی همسو با مطالعه حاضر، اثر دو نوع تمرینات ورزشی را بر MMP1، MMP2، MMP3 و MMP9 پس از یک دوره تمرینی مقاومتی شدید حاد سنجیدند و کاهش معنادار غلظت سرمی MMP2 در پایان هفته چهارم نسبت به غلظت پایه در گروه تمرینات ورزشی با شدت متوسط را گزارش کردند، همچنین افزایش غلظت MMP2 سرمی در پایان هفته هشتم نسبت به هفته چهارم در این گروه گزارش شد، در حالی که در گروه تمرینات مقاومتی افزایش MMP2 سرمی در پایان هفته چهارم و هشتم نسبت به غلظت پایه مشاهده شد (۱۹). در همین راستا، امیرساسان<sup>۳۵</sup> و همکاران (۲۰۱۱) افزایش معنادار فعالیت سرمی MMP2 و MMP9 در ورزشکاران را بلافاصله پس از یک دوره تمرینات شدید و کاهش معنادار فعالیت آن‌ها را در روز بعد گزارش دادند، گروه غیرفعال همانند ورزشکاران افزایش معنادار فعالیت

MMP2 و MMP9 را بلافاصله پس از ورزش نشان دادند اما ۲۴ ساعت پس از تمرینات هوازی شدید فعالیت سرمی MMP2 و MMP9 در گروه غیرورزشکار همچنان ادامه داشت و کاهش معناداری مشاهده نشد (۳۰)، اگرچه پاسخ افراد ورزشکار و غیرورزشکار به فعالیت شدید هوازی در ایجاد پاسخ التهابی تا ۲۴ ساعت بعد از تمرینات مشابه بود که احتمالاً علت اصلی را باید در شدت و مدت انجام فعالیت و میزان صدمات میوفیبریلی جستجو کرد. هادلر اولسن<sup>۳۶</sup> و همکاران (۲۰۱۴) کاهش فعالیت گلیکولیتیکی و MMP2 را در موش‌های تمرین کرده بررسی کردند که با یافته‌های پژوهش حاضر همسو بود. پژوهشگران آن مطالعه علت اصلی کاهش فعالیت MMP2 را از دست رفتن سریع و عدم تثبیت آن پس فعالیت بدنی در موش‌ها دانستند. آن‌ها نیز اظهار داشتند که اگر فرآیند انقباضی، فعالیت درون سلولی MMP-2 را تحریک 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 MMP2 را افزایش دهد (۲۳) که برای تعمیم این نظریه، نمونه‌های انسانی و انجام مطالعات بیشتر، ضروری به نظر می‌رسد. در پژوهشی ناهمسو طاهری و همکاران (۱۳۹۰) عدم تفاوت معنادار غلظت MMP2 سرمی را متعاقب فعالیت هوازی زیربیشینه (۵۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی) در دو گروه مردان فعال و غیرفعال گزارش کردند (۲۴). علت احتمالی عدم تفاوت معنادار MMP2 در دو گروه مورد پژوهش در مطالعه طاهری و همکاران، مشارکت پایین تارهای عضلانی تندانقباض در برنامه تمرینی زیربیشینه است، زیرا آنزیم‌های گلیکولیتیکی (۳۱) همانند انولاز- $\alpha$ ،  $\beta$  و  $\alpha$ <sup>۳۷</sup>، فروکتوز بیس فسفات<sup>۳۸</sup>، آلدولاز<sup>۳۹</sup> A، گلیسرآلدئید فسفات دهیدروژناز (GAPDH) عضلات نوع II به فور یافت می‌شوند و سوبسترای درون سلولی MMP2 هستند (۱۸)، لذا mRNA و پروتئین MMP2 در تارهای عضلانی نوع II بیشتر بیان می‌شوند (۱۵). از دلایل ناهمسو بودن مطالعه طاهری با مطالعه حاضر می‌توان به شدت تمرینات مورد استفاده، تفاوت جنسیتی آزمودنی‌ها و زمان اندازه‌گیری فعالیت سرمی MMP2 اشاره نمود زیرا در

مهارکننده‌های پروتئینی درون‌زا<sup>۴۳</sup> مانند TIMP،  $\alpha 2$ -ماکروگلوبولین<sup>۴۴</sup> و تجزیه پروتازها دانست. همچنین در دسترس بودن سوبسترا تعیین کننده فعالیت MMP2 در ورزشکاران است. اگرچه کاهش برخی فاکتورهای التهابی محرک MMP2 در اثر دوره‌های تمرینی متناوب می‌توانند در این کاهش دخیل باشند (۶). با این حال نمی‌توان در رابطه با TIMP-2 نظر قطعی داد چون این عامل خود با فاکتورهای دیگری در ارتباط است (۳۴). از طرف دیگر مطالعات نشان داده اند که عضلات با تارهای نوع ۲ بیشتر، سطوح پروتئین و MMP2 mRNA بیشتری نسبت به عضلات با اکثریت تارهای نوع ۱ دارند (۲۳).

با توجه به سازوکارهای دخیل در کاهش بیان mRNA MMP2 و یافته‌های پژوهش حاضر کاهش mRNA MMP2 دختران شمشیرباز نخبه در گروه تجربی نسبت به گروه کنترل را می‌توان به کاهش بیان TIMP-2 mRNA و یا بکارگیری عضلات با تارهای نوع یک بیشتر در فواصل تمرینات نسبت داد، اگرچه برخی مطالعات بیانگر این هستند که MMPها شاید در مراحل اولیه سازگاری به فعالیت بدنی درگیر باشند (۳۵) و با توجه به وجود سازگاری به فعالیت‌های بدنی در ورزشکاران نخبه ممکن است نقش کمرنگ تری داشته باشند. پژوهش حاضر برای اولین بار نقش تمرینات ورزشی شمشیر بازی را بر بیان ژن MMP2 زنان ورزشکار نخبه سنجیده است و به عنوان یک سازوکار کلی، کاهش بیان ژن MMP2 را می‌توان با کاهش تخریب بافت عضلانی و نوع فعالیت و تمرینات شمشیر بازی در ارتباط دانست، با این حال مکانیسم تاثیر تمرینات ورزشی بر بیان ژن و فعالیت MMP2 در زنان ورزشکار و به ویژه تمرین کرده نیاز به بررسی بیشتری دارد. در پژوهش حاضر وجود تفاوت‌های فردی، عدم اندازه‌گیری فعالیت فعال کننده‌های آنزیم MMP2، و انجام مطالعه بر روی جنسیت و گروه سنی خاص، از جمله محدودیت‌های مطالعه حاضر است، لذا امید است تحقیقات آتی بتوانند با حذف چنین محدودیت‌هایی نتایج جامع تری در نمونه‌های انسانی فعال و غیرفعال ارائه دهند.

مطالعه حاضر اولین زمان اندازه‌گیری سرمی پایان هفته چهارم و ۲۴ ساعت پس از جلسه تمرین بوده است در حالی که در آن پژوهش اندازه‌گیری فعالیت MMP2 دو ساعت پس از اجرای برنامه تمرینی بود.

یقین‌آریان<sup>۴۰</sup> و همکاران (۲۰۱۲) با وجود مشاهده افزایش فعالیت MMP-2 هسته، متعاقب تمرینات ورزشی و افزایش فعالیت و بیان سیتوپلاسمیک MMP9 در عضلات پشت ساق پا، تفاوت معناداری در MMP2 mRNA عضلات پشت ساق پا موش‌های تمرین کرده و گروه کنترل گزارش ندادند (۳۲). یافته‌های پژوهش رالمن و همکاران (۲۰۰۹) با یافته‌های مطالعه حاضر موافق نبود. افزایش سریع فعالیت و MMP9 mRNA پس از یک جلسه فعالیت ورزشی و افزایش فعالیت MMP2، ده روز پس از تمرینات ورزشی از یافته‌های مطالعه پژوهشگران بود، اگرچه لازم به ذکر است که محدودیت گردش خون سبب ایجاد تفاوت معنادار در mRNA هر دو آنزیم MMP2 و MMP9 نشد (۲۲). با این وجود، افزایش MMP2 پس از ده روز را میتوان به افزایش MMP14 به عنوان یک فاکتور فعال کننده MMP2 مرتبط دانست (۳۳)، اما روند افزایشی MMP2 متعاقب تمرینات ورزشی با محدودیت و بدون محدودیت گردش خون را نمی‌توان به افزایش نیتریک اکساید نسبت داد زیرا اگر عامل نیتریک اکساید در فعالیت MMP2 دخیل بود محققان روند افزایشی مشابهی را شاهد بودند. با این حال احتمالاً علت ناهمسو بودن مطالعه رالمن و همکاران با پژوهش حاضر در شدت فعالیت بدنی، نوع محرک و آزمودنی‌های متفاوت است و به طور کلی پژوهشی که با روش مطالعه حاضر روی نمونه‌های انسانی انجام شده باشد یافت نشد. مطالعات نشان داده اند که نسبت مهارکننده بافتی ماتریکس متالوپروتئیناز ۲ (TIMP-2)<sup>۴۱</sup> به ماتریکس متالوپروتئیناز غشایی نوع ۱ (MTI-MMP)<sup>۴۲</sup> می‌تواند نقش حیاتی در فعالسازی MMP2 داشته باشد، و اگر سطح TIMP-2 نسبت به MTI-MMP بسیار پایین باشد، سبب جایگیری کم MMP2 در سطح سلول می‌شود (۳۴). بنابراین کاهش بیان ژن MMP2 در پاسخ به دوره‌های تمرینی طولانی مدت را می‌توان مربوط به بیان



19. Reverse transcriptase
20. cDNAsynthesis
21. Fermentas
22. DNAs I reaction buffer 10x
23. DEPC-traeted
24. Primer
25. oligo (dT)
26. DEPC H2O
27. Ribonuclease inhibitor
28. Reverse Transcriptase Enzyme
29. Housekeeping gene
30. MMP2 Human ELISA kit
31. Life technologies
32. Elisa
33. Repeated measures
34. Urso
35. Amirsasan
36. Hadler-Olsen
37. Enolase- $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$
38. Fructose bisphosphate
39. Aldolase A
40. Yeghiazaryan
41. Inhibitor of metalloproteinase-2
42. Membrane type-1 matrix metalloproteinase
43. Endogenous
44.  $\alpha$ 2-macroglobulin

#### منابع:

1. Pette D. Historical perspectives: (2001). plasticity of mammalian skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*;90(3):1119-24.
2. Timmons JA, Jansson E, Fischer H, Gustafsson T, Greenhaff PL, Ridder J, et al. (2005). Modulation of extracellular matrix genes reflects the magnitude of physiological adaptation to aerobic exercise training in humans. *BMC biology*;3(1):19.
3. Flück M. Functional, (2006). structural and molecular plasticity of mammalian skeletal muscle in response to exercise stimuli. *Journal of Experimental Biology*;209(12):2239-48.
4. Goldspink G. Gene expression in muscle in response to exercise. (2003). *Journal of Muscle Research & Cell Motility*;24(2-3):121-6.
5. Pilegaard H, Ordway GA, Saltin B, Neufer PD. Transcriptional regulation of gene expression in human skeletal muscle during recovery from exercise. (2000). *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*; 279(4):E806-E14.

#### نتیجه گیری

بطور کلی می توان گفت که هشت هفته تمرینات فزاینده شمشیربازی سبب کاهش بیان ژن و فعالیت پروتئینازی MMP2 در دختران شمشیرباز نخبه می شود که با توجه به این یافته ها شاخص مخرب ماتریکس خارج سلولی در ورزشکاران نخبه نسبت به گروه کنترل کاهش نشان می دهد و در نتیجه پروتئین های عضلانی این ورزشکاران کمتر دچار تخریب و تجزیه شده و آسیب عضلانی کمتری را نسبت به افراد گروه کنترل تجربه می کنند. امید است پژوهش حاضر روزه ای برای انجام تحقیقات بیشتر در این زمینه باشد. پیشنهاد می شود که در پژوهش های آتی، بیان ژنی این فاکتور در فعالیت های بدنی با شدت ها و مدت های متفاوت مورد بررسی قرار گیرد. همچنین با توجه به این که بیان ژن MMP2 بیشتر در بافت عضلانی مورد بررسی قرار گرفته به نظر می رسد اندازه گیری این فاکتور در بافت خون به دنبال فعالیت بدنی روزه جدیدی از حقایق علمی به روی پژوهشگران بگشاید.

#### تشکر و قدردانی:

این مطالعه با حمایت های مالی و معنوی دانشگاه ارومیه انجام گردیده است. لذا از مسئولین، مربیان و آزمودنی هایی که صبورانه محققین را در انجام این مطالعه یاری کردند، تقدیر و تشکر به عمل می آید.

#### پی نوشت ها

1. Extracellular matrix
2. Matrix metalloproteinases (MMPs)
3. Zinc and calcium-dependent
4. Matrixin
5. Collagenases
6. Gelatinases
7. Stromelysins
8. Matrilysins
9. Membrane-bound MMPs (MT-MMPs)
10. Other MMPs
11. Rullman
12. Hadler-Olsen
13. SECA
14. Soehnle
15. Mononuclear Layer
16. EZ-RNA isolation kit
17. Accuzol total RNA extraction reagent
18. DNase/RNase Free

6. da Cunha Nascimento D, Durigan RdCM, Tibana RA, Durigan JLQ, Navalta JW, Prestes J. (2014). The Response of Matrix Metalloproteinase-9 and-2 to Exercise. *Sports Medicine*:1-10.
7. Murphy G, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. (2008). *Molecular aspects of medicine*; 29(5):290-308.
8. Baum O, Ganster M, Baumgartner I, Nieselt K, Djonov V. (2007). Basement membrane remodeling in skeletal muscles of patients with limb ischemia involves regulation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases. *Journal of vascular research*;44(3):202-13.
9. Deryugina EI, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. (2006). *Cancer and Metastasis Reviews*;25(1):9-34.
10. Shaikh S, Chowdhury A, Banerjee AK, Sarkar J, Chakraborti S. (2013). Exercise and Matrix Metalloproteases in Health and Disease: A Brief Overview. *Proteases in Health and Disease*: Springer. p. 49-62.
11. Suhr F, Brixius K, de Marées M, Bölcck B, Kleinöder H, Achtzehn S, et al. (2007). Effects of short-term vibration and hypoxia during high-intensity cycling exercise on circulating levels of angiogenic regulators in humans. *Journal of Applied Physiology*;103(2):474-83.
12. Giannelli G, De Marzo A, Marinosci F, Antonaci S. (2005). Matrix metalloproteinase imbalance in muscle disuse atrophy.
13. Carmeli E, Moas M, Reznick AZ, Coleman R. (2004). Matrix metalloproteinases and skeletal muscle: a brief review. *Muscle & nerve*;29(2):191-7.
14. Alameddine HS. (2012). Matrix metalloproteinases in skeletal muscles. friends or foes? *Neurobiology of disease*;48(3):508-18.
15. Carmeli E, Beiker R, Maor M, Kodesh E. (2010). Increased iNOS, MMP-2 ,and HSP-72 in skeletal muscle following high-intensity exercise training. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*;21(2):127-46.
16. Gillies AR, Lieber RL. (2011). Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. *Muscle & nerve*;44(3):318-31.
17. Chen X, Li Y. (2009). Role of matrix metalloproteinases in skeletal muscle.
18. Cauwe B, Opdenakker G. (2010). Intracellular substrate cleavage: a novel dimension in the biochemistry, biology and pathology of matrix metalloproteinases. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*;45(5):351-423.
19. Urso ML, Pierce JR, Alemany JA, Harman EA, Nindl BC. (2009). Effects of exercise training on the matrix metalloprotease response to acute exercise. *European journal of applied physiology*;106(5):655-63.
20. Carmeli E, Haimovitch TG. (2006). The expression of MMP-2 following immobilization and high-intensity running in plantaris muscle fiber in rats. *The Scientific World Journal*;6:542-50.
21. Langberg H, Rosendal L, Kjær M. (2001). Training-induced changes in peritendinous type I collagen turnover determined by microdialysis in humans. *The Journal of Physiology*. 534(1):297-302.
22. Rullman E, Norrbom J, Strömberg A, Wågsäter D, Rundqvist H, Haas T, et al. (2009). Endurance exercise activates matrix metalloproteinases in human skeletal muscle. *Journal of applied physiology*;106(3):804-12.
23. Hadler-Olsen E, Solli AI, Hafstad A, Winberg JO, Uhlin-Hansen L. (2014). Intracellular MMP-2 Activity in Skeletal Muscle is Associated with Type II Fibers. *Journal of Cellular Physiology*.
24. Taheri Chadorneshin H, Nourshahi M, Ranjbar K. A comparison of angiogenic proteinases in active and non-active in response to submaximal exercises. 2011. *Joutnal of Research on sport science*; 10(3): 143-157.
25. Tsolakis C, Bogdanis GC, Nikolaou A, Zacharogiannis E. (2011). Influence of type of muscle contraction and gender on postactivation potentiation of upper and lower limb explosive performance in elite fencers. *Journal of sports science & medicine*;10(3):577.
26. Goldberg D, Williams P. (2000). General health questionnaire (GHQ). Swindon, Wiltshire, UK: nferNelson.
27. Bergman E, Boyungs J, Erickson M. (1990) Comparison of a food frequency questionnaire and a 3-day diet record. *Journal of the American Dietetic Association*;90(10):1431-3.
28. Bottoms L. (2011). Physiological responses and energy expenditure to simulated epee fencing in

- elite female fencers. *Serbian journal of sports sciences*;5(1):17-20.
29. Karvonen MJ, Kentala E, Mustala O, editors. (1956). The effects of training on heart rate; a longitudinal study. *Annales medicinae experimentalis et biologiae Fenniae*;
30. Ramin A, Abbas M, Ali GA, Asghar RA, Amir L, Farshid S, et al. (2011). Effects of exhaustive aerobic exercise on matrix metalloproteinases activity in athletes and non-athletes. *World J Sport Sci*;4:185-91.
31. Schiaffino S, Reggiani C. (2011). Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiological reviews*;91(4):1447-531.
32. Yeghiazaryan M, Żybura-Broda K, Cabaj A, Włodarczyk J, Sławińska U, Rylski M, et al. (2012). Fine-structural distribution of MMP-2 and MMP-9 activities in the rat skeletal muscle upon training: a study by high-resolution in situ zymography. *Histochemistry and cell biology*;138(1):75-87.
33. Hadler-Olsen E, Fadnes B, Sylte I, Uhlin-Hansen L, Winberg JO. (2011). Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. *FEBS Journal*.;278(1):28-45.
34. Barnes BR, Szelenyi ER, Warren GL, Urso ML. (2009). Alterations in mRNA and protein levels of metalloproteinases-2,-9, and-14 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 responses to traumatic skeletal muscle injury. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*; 297(6): C1501-C8.
35. Rullman E, Rundqvist H, Wågsäter D, Fischer H, Eriksson P, Sundberg CJ, et al. (2007). A single bout of exercise activates matrix metalloproteinase in human skeletal muscle. *Journal of applied physiology*;102(6):2346-51.