تأثیر هشت هفته فعالیت استقامتی بر بیان ژن‌های فاکتور افزایش‌دهنده مایوسیت-۲ و هیستون داستیلاز-۴ عضلات اسکلتی کند و تند انقباض موش‌های صحرایی نر ویستار

فرید بهرامی[۱]، محمد فتحی*[۲]، حسن احمدوند[۳]، ناصر پژوهی[۴]

۱- دانشجوی دوره دکتری فیزیولوژی ورزش، گروه تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، دانشکده ادبیات، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.

۲- استادیار، گروه تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، دانشکده ادبیات، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.

۳- استاد، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران.

۴- استادیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران.

یافته / دوره بیستم / شماره ۱ / بهار ۹۷ / مسلسل ۷۵

چکیده

دریافت مقاله: ۹۶/۱۰/۲۰ پذیرش مقاله: ۹۶/۱۲/۱۲

* **مقدمه:** عضلات اسکلتی از تارهایی با انقباضات مختلف تشکیل‌شده‌اند که به‌طور عمده به تارهای کند انقباض و تند انقباض تقسیم می‌شوند. هدف از این پژوهش بررسی تأثیر هشت هفته فعالیت استقامتی بر بیان ژن فاکتور افزایش‌دهنده مایوسیت-۲ و هیستون داستیلاز-۴ در عضلات اسکلتی نوع کند و تند انقباض موش‌های صحرایی نر ویستار است.

* **مواد و روش‌ها:** بدین منظور ۲۰ سر موش صحرایی نر ویستار با ۴ هفته سن از مرکز تحقیقات رازی دانشگاه علوم پزشکی لرستان خریداری شد. شرایط آزمایشگاهی یکسان برای موش‌ها تا رسیدن به سن بلوغ فراهم شد. آشناسازی استقامتی ۱۴ روزه برای آشنایی با دویدن روی تردمیل صورت گرفت. در پایان دوره، موش‌ها به‌صورت تصادفی به دو گروه تجربی (ده سر) و گروه کنترل (ده سر) تقسیم شدند. یک برنامه استقامتی ۸ هفته‌ای، ۵ جلسه در هفته برای گروه تجربی اجرا شد.

* **یافته‌ها:** این پژوهش نشان داد بیان نسبی ژن هیستون داستیلاز-۴ در عضله بازکننده دراز انگشتان پا تمرینی در مقایسه با گروه شاهد به لحاظ آماری تغییر معناداری نداشت و بیان نسبی ژن فاکتور افزایش‌دهنده مایوسیت-۲ در عضله بازکننده دراز انگشتان پا گروه تمرینی نسبت به گروه شاهد علی‌رغم کاهش، به لحاظ آماری معنی‌دار نبود. در عضله نعلی بیان نسبی ژن هیستون داستیلاز-۴ در گروه تمرینی نسبت به گروه شاهد از لحاظ آماری تغییر معناداری مشاهده نگردید؛ اما بیان نسبی ژن فاکتور افزایش‌دهنده مایوسیت-۲ در گروه تمرینی در مقایسه با گروه شاهد به لحاظ آماری کاهش معنی‌داری داشت ($P<۰/۰۵$).

* **بحث و نتیجه‌گیری:** به‌طور خلاصه نتایج این پژوهش نشان داد که فعالیت استقامتی به مدت ۸ هفته موجب تغییر در بیان ژن‌های هیستون داستیلاز-۴ و فاکتور افزایش‌دهنده مایوسیت-۲ در عضله بازکننده دراز انگشتان پا نگردید اما در عضله نعلی، بیان ژن فاکتور افزایش‌دهنده مایوسیت-۲ کاهش یافت همچنین در میزان بیان ژن هیستون داستیلاز-۴ نیز تغییری مشاهده نشد.

* **واژه‌های کلیدی:** فعالیت استقامتی، ژن فاکتور افزایش دهنده مایوسیت-۲، ژن هیستون داستیلاز-۴، عضلات کند و تند انقباض.

*آدرس مکاتبه: خرم آباد، دانشگاه لرستان، دانشکده ادبیات، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی.

پست الکترونیک: javidfathi7@gmail.com

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 13:02 +0430 on Tuesday August 14th 2018

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 13:02 +0430 on Tuesday August 14th 2018

مقدمه

عضلات اسکلتی از میوفیبریل‌های ناهمگون با انقباضات مختلف و اجزای متابولیسمی تشکیل شده‌اند. این آرایش عضله اسکلتی را قادر می‌سازد که نقش‌های مختلفی را ازجمله نگه‌داشتن قامت بدن و انجام دادن حرکات سریع را داشته باشد (۱). تارها به‌طور عمده به تارهای کند/اکسیداتیو و تارهای تند/گلیکولیتیک تقسیم می‌شوند و کارکردهای تارها به‌وسیله بیان پروتئین‌های انقباضی و آنزیم‌های متابولیکی در سطح نسخه‌برداری تعریف می‌شوند (۲). تارهای عضلانی دارای فنوتیپ‌های مختلفی هستند که می‌توان آن‌ها را بر اساس بیان ایزوفرم‌های زنجیره سنگین مایوزین (MHC) به تارهای نوع I، برای تارهای کند انقباض و IIa و IIx/d یا IIb برای تارهای تند انقباض تقسیم نمود (۳). تارهای نوع I دارای میتوکندری فراوان، ظرفیت اکسایشی بالا و بسترهای عروق خونی گسترده‌ای دارند و در مقابل خستگی مقاوم‌اند؛ اما تارهای نوع II ظرفیت گلیکولیتیک بالایی داشته و در انقباضات سریع و بیشینه درگیر هستند و مقاومت آن‌ها در مقابل خستگی پائین است (۴) این ناهمگونی در ویژگی‌های متابولیک و انقباضی تارهای عضلانی نشان‌دهنده مولکول‌های پروتئینی متفاوت درگیر در انقباض مانند مایوزین، تروپونین I، تروپونین T، تروپونین C و اکتینین است که دست‌کم دارای دو ایزوفرم متفاوت در تارهای آهسته و سریع می‌باشند (۵). ازجمله عوامل اثرگذار بر تغییر ایزوفرم تارها می‌توان به شرایطی مانند فعالیت کاهش‌یافته عصبی-عضلانی به شکل آسیب طناب نخاعی، ثابت کردن عضو، حذف جاذبه (۶) و فعالیت انقباضی تار یا همان فعالیت بدنی اشاره نمود (۷). تحقیقات نشان می‌دهد فعالیت استقامتی تارهای عضلانی را به سمت تارهای کند انقباض هدایت می‌کند و تارهای تند انقباض بیشتر از نوع IIx/IIb به نوع IIa تغییر می‌یابد (۱). درصورتی‌که تمرینات مقاومتی موجب تبدیل تارهای نوع I به نوع سریع‌تر و افزایش میزان MHC نوع IIa و IIx/d در مدل‌های حیوانی (۸) و انسانی (۱۱-۹) می‌گردد. بعلاوه در پاسخ به افزایش یا کاهش فعالیت، بیشتر تارهای کند انقباض عضله نعلی قابلیت تبدیل به تارهای تند انقباض را دارند درحالی‌که تغییر در عمده تارهای تند عضلات موش‌های صحرایی به‌سختی به سمت تارهای کند متمایل می‌شوند (۱۲). این عدم تأثیرپذیری تارهای نوع تند انقباض به تمرینات استقامتی نامشخص است. شناخت و درک این عدم تأثیرپذیری نیازمند بررسی‌های سلولی و مولکولی درگیر فرایند تغییر فنوتیپ‌های تارهای عضلانی در واکنش به فعالیت‌های مختلف ورزشی است. تغییر فنوتیپ تارهای عضلانی از طریق مسیرهای پیام‌رسانی که بیان ژن مرتبط با نیمرخ تارها را اصلاح می‌کنند، تنظیم می‌گردد. عامل رونویسی ژن‌های فاکتور افزایش‌دهنده مایوسیت ۱-۲، هیستون داستیلاز-۴ و miRNA ویژه عضله اسکلتی یعنی miR-133، miR-1 و miR-206 نقش مهمی در تعیین فنوتیپ‌های عضلانی دارند و فعالیت آن‌ها با توجه به محرک فیزیولوژیک موجب تغییر نوع تارها می‌گردد (۱۰). ژن فاکتور افزایش‌دهنده مایوسیت-۲ تنظیم‌کننده کلیدی رشد عضلانی است که به‌طور ویژه در عضلات کند انقباض اکسایشی بیان می‌گردد و در پاسخ به مسیر سیگنالینگ وابسته به کلسیم، تارهای سریع-گلیکولیتیک را به تارهای آهسته اکسایشی تبدیل می‌کند (۱۳). این تغییر به سمت تارهای کند انقباض از طریق PGC-1α و بیوژنز میتوکندریایی و به صورت همکاری با ژن فاکتور افزایش‌دهنده مایوسیت-۲ انجام می‌شود (۱۱) و در واقع ژن فاکتور افزایش‌دهنده مایوسیت-۲ نقش کلیدی در فعال کردن بیان PGC-1αدارد (۶،۱۴،۱۵). فعالیت ژن فاکتور افزایش‌دهنده مایوسیت-۲ در تارهای کند/اکسیداتیو بیشتر از تارهای تند/گلیکولیتیک است (۱۳) و ژن فاکتور افزایش‌دهنده مایوسیت-۲ به‌وسیله ژن هیستون داستیلاز-۴ از نوع IIa سرکوب می‌گردد. ژن

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 13:02 +0430 on Tuesday August 14th 2018

هیستون داستیلاز-۴ از طریق تأثیر بر ساختار کروماتین و سرکوب فعالیت برخی عوامل رونویسی، موجب تکثیر و تمایز سلول می‌گردند (۱۵). هیستون داستیلاز-۴ قادر به مهار بیان ژن پروتئین فاکتور افزایش‌دهنده مایوسیت-۲ بوده که در بهبود رشد عضلانی اهمیت فراوانی دارد (۹). شواهد اخیر نشان می‌دهد که miR-1 به mRNA هیستون داستیلاز-۴ متصل شده و بیان آن را مهار می‌کند و درنتیجه موجب تمایز سلول‌های عضلانی می‌شود (۱۶).

با در نظر گرفتن اینکه تمرینات استقامتی قابلیت کاهش تعداد تارچه‌های نوع تند را داشته (۸) و اینکه مسیرهای سیگنالینگ و بیان ژنی در تعیین فنوتیپ تارها نقش محوری دارند، شناخت تغییرات عوامل ژن‌های فاکتور افزایش‌دهنده مایوسیت-۲ و هیستون داستیلاز-۴ در تارهای کند و تند انقباض در اثر تمرینات استقامتی ممکن است بتواند سازوکارهای مولکولی تغییر فنوتیپ تارها در اثر فعالیت استقامتی را روشن سازد. ازاین‌رو هدف پژوهش حاضر، بررسی تأثیر هشت هفته فعالیت استقامتی بر بیان ژن‌های فاکتور افزایش‌دهنده مایوسیت-۲ و هیستون داستیلاز-۴ در عضلات اسکلتی نوع کند و تند موش‌های صحرایی نر ویستار است.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر اثر ۸ هفته فعالیت استقامتی بر بیان ژن‌های فاکتور افزایش‌دهنده مایوسیت-۲ و هیستون داستیلاز-۴ بر عضلات اسکلتی کند و تند انقباض را به روش تجربی ارزیابی کرد. بدین منظور ۲۰ سر موش صحرایی نر ویستار با ۴ هفته سن (۱۰±۱۱۰ گرم) از مرکز رازی دانشگاه علوم پزشکی لرستان خریداری شد. برای تمامی آن‌ها شرایط مناسب آزمایشگاهی (دسترسی آزاد به آب و غذا مخصوص موش، با روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت و میانگین دما ۳±۲۴ درجه سانتی‌گراد) به صورت یکسان در آزمایشگاه تا رسیدن به سن بلوغ (۸ هفته) فراهم شد. در این مدت موش‌ها در ۵ قفس یکسان نگهداری شدند. در پایان این مرحله میانگین و انحراف استاندارد وزن موش‌ها ۲۳±۲۷۰ بود. آنگاه دوره آشناسازی موش‌ها با تمرینات استقامتی آغاز شد که این دوره ۱۴ روزه برای آشنایی با دویدن روی ترید میل مخصوص جوندگان (۹ متر در دقیقه، ۵ دقیقه و ۴ روز در هفته) صورت گرفت. در پایان جلسات آشناسازی، موش‌ها به‌صورت تصادفی به ۲ گروه (۱۰ سر به‌عنوان گروه کنترل و ۱۰ سر دیگر به‌عنوان گروه تجربی) تقسیم شدند. از موش‌های گروه تجربی ۲ سر موش نتوانست برنامه را به پایان برسانند؛ بنابراین تعداد موش‌ها به ۱۶ سر (۸ سر کنترل و ۸ سر تجربی) کاهش یافت.

برنامه تمرینی

با استفاده از مطالعات قبلی، یک برنامه تمرین استقامتی برای موش‌ها طراحی شد (۱۷,۱۸). برنامه تمرین استقامتی مورد استفاده در پژوهش حاضر، شامل ۸ هفته و در هفته ۵ جلسه فعالیت استقامتی بر روی نوار گردان مخصوص جوندگان بود (۱۹). زمان و شدت هر جلسه تمرینی در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱. نمایش عددی پروتکل تمرینی در هفته‌های مختلف

	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم	هفته پنجم	هفته ششم	هفته هفتم	هفته هشتم
مدت تمرین (دقیقه)	۱۵	۲۰	۲۵	۳۰	۳۵	۴۰	۴۵	۵۰
سرعت نوار گردان (متر بر دقیقه)	۱۰	۱۰	۱۵	۱۵	۲۰	۲۰	۲۳	۲۳
گرم کردن	۵ دقیقه با سرعت ۱۰ متر در دقیقه							
سرد کردن	۵ دقیقه با سرعت ۹ متر در دقیقه							

ملاحظات اخلاقی

مجوز این پژوهش توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی لرستان صادر شد (LUMS.REC.1395.172). در زمان تمرینات تمامی موش‌هایی که نمی‌توانستند دوره تمرینی را ادامه دهند کنار گذاشته شدند. در هنگام کشتن موش‌ها مقدار مناسبی کتامین و زایلازین تزریق شد (کتامین ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و زایلازین ۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن)

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 13:02 +0430 on Tuesday August 14th 2018

به‌طوری‌که موش‌ها کاملاً بی‌هوش شوند و بـه تحریـک‌هـا پاسخ ندهند، سپس تشریح شدند.

استخراج RNA از بافت

۱۰۰-۵۰ میلـی‌گـرم از بافـت را برداشـته و ۱۰۰۰ میکرولیتر ترایـزول بـه آن اضـافه کـرده و سـپس توسـط دسـتگاه الکتـرو اولتراسـونیک همـوژن و بعـد از آن ۳۰۰ میکرولیتـر کلروفـرم اضـافه گردیـد و محلـول مـورد نظـر به‌خوبی مخلوط (پیپتاژ) و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در یخ نگهداری و بعد از این مدت محلول مـوردنظر را در داخـل دستگاه سانتریفیوژ (Tlettich ساخت آلمان) قرار داده شد (۱۵ دقیقه، دور ۱۲۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد). بعد از دستگاه سانتریفیوژ محلول به ۳ قسمت تقسیم شده که لایه اولی شفاف است RNA بوده به‌آرامی به‌وسیله سـمپلر (BRAND) به میکروتیوب کدگذاری شده دیگـری انتقـال یافـت و ۵۰۰ میکرولیتـر ایزوپروپـانول بـه آن اضـافه و به‌خوبی مخلوط شد (پیپتاژ) و به مدت ۱۰ دقیقـه در یـخ نگهداری شد. رسوب سفیدرنگ ته میکروتیـوب (RNA) را با الکل ۷۰ درصد به میزان ۱۰۰۰ لاندا شستشو و آنگاه در سـانتریفیوژ بـه مـدت ۱۰ دقیقـه، دور ۷۵۰۰ و ۴ درجـه سانتی‌گراد قرار داده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در داخـل هود (استریل شده با الکل ۷۵ درصد و نـور UV) گذاشـته تا خشک شود. در مرحله بعد با ۱۷ تا ۲۰ لانـدا آب دبـس رسوب ته میکروتیوب را حل کرده و جهت قرائت در داخل دستگاه نانودراپ WPA (BiowaveII) گذاشته شد. میزان خلـوص RNA بـا اسـتفاده از دسـتگاه نـانودراپ و نسـبت طول‌موج ۲۶۰nm و ۲۸۰nm ارزیابی شد کـه نسـبت‌هـای به دست آمده در دامنه ۱/۶ تا ۱/۸ قرار داشتند (۲۰).

سنتز CDNA

بعد از استخراج RNA بافت‌هـای مـوردنظر، اقـدام بـه سنتز CDNA شد. برای این کـار از کیـت سـنتز CDNA شـرکت یکتـا تجهیـز آزمـا (Revert Aid first Strand cDNA Synthesis kit k1621) استفاده شد. تمام مراحـل سنتز طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت.

ارزیابی بیان ژن

جهت ارزیابی بیان ژن از دسـتگاه Real – Time PCR شرکت Corbett استفاده شد. مسـترمیکس اسـتفاده شـده در این مرحله متعلق بـه شـرکت یکتـا تجهیـز آزمـا بـود. مسـترمیکس طبـق دسـتورالعمل کیـت و بررسـی میـزان کارایی ژن‌های رفرنس و هدف، برای یک نمونه ترکیبـی از مسـترمیکس (۱۰ میکرولیتـر)، پرایمـر رفـت (۰/۴ میکرولیتر)، پرایمر برگشـت (۰/۴ میکرولیتـر)، cDNA (۱ میکرولیتر) و آب دبس (۸/۲ میکرولیتر) در نظـر گرفتـه و میزان بیان ژن با استفاده از روش نسـبی ارزیـابی شـد. در هر Run (۳۶ سیکلی) یک نمونه بـه‌عنـوان کنتـرل منفـی بـرای تعیـین آلـودگی مسـترمیکس (طبـق دسـتورالعمل شرکت Corbett نبایـد NTCAmplification آن بیشـتر از ۱ باشـد) در نظـر گرفتـه شـد و ژن‌هـای کنتـرل داخلـی (Beta)، کنترل مثبت (گروه کنترل)، هیستون داستیلاز-۴ و فاکتور افـزایش‌دهنـده مایوسـیت-۲ هـم‌زمـان (در یـک Run) ارزیابی شد. نمونه‌ها به‌صورت سه‌تایی ارزیابی شدند. لازم به ذکر است در برخی موارد نیاز بود که آزمون مجدداً تکرار شود که در صورت نیاز تکرار گردید.

جدول ۲. مشخصات پرایمرهای مورداستفاده در پژوهش

نام		توالی ۳`-۵`	توالی مرجع NCBI	اندازه محصول
BetaActin	F	GATCAAGATCATTGCTCCTCCTG	NM – 017008.4	۷۴
	R	AGGGTGTAAAACGCAGCTCA		
MEF2	F	AGTGCAGGTAACACAGGTGG	XM – 003749164.1	۸۴
	R	GGTTACCAGGTGAGACCAGC		
HADC4	F	AACCTAACCTGAAATTACGGTC	NM – 053449.1	۱۳۷
	R	ACATGCGGAGTCTGTAACATC		

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 13:02 +0430 on Tuesday August 14th 2018

آنالیز آماری

داده‌های به‌دست‌آمده از دستگاه Real – Time PCR با استفاده از نرم‌افزار Excel منظم و سپس به نرم‌افزار RG-Rest 2009 انتقال داده شد.

یافته‌ها

جدول ۳. اطلاعات خروجی از نرم‌افزار Rest-RG از میزان بیان نسبی ژن هیستون داستیلاز-۴ و فاکتور افزایش دهنده مایوسیت-۲ در عضله بازکننده دراز انگشتان پا

ژن	نوع ژن موردمطالعه	بازده واکنش	میزان بیان	خطای معیار	P(H1)	نتیجه
بتا	رفرنس	۰/۸۲	۱/۲۰	۶/۰۳۳-۰/۱۹۸	۰/۶۱	-
هیستون داستیلاز-۴	هدف	۰/۷۳	۱/۹۴	۱۰/۷۶۲-۰/۴۶۱	۰/۰۸	-
فاکتور افزایش‌دهنده مایوسیت-۲	هدف	۰/۷۵	۰/۹۳	۴/۰۷-۰/۲۰۷	۰/۸۲	-

در عضله بازکننده دراز انگشتان در حضور ژن رفرنس Beta میزان بیان نسبی ژن هیستون داستیلاز-۴ گروه تمرین در مقایسه با گروه شاهد علی‌رغم افزایش، به لحاظ آماری تغییر معنی‌داری مشاهده نشد.

میزان بیان نسبی ژن فاکتور افزایش‌دهنده مایوسیت-۲ عضله بازکننده دراز انگشتان گروه تمرینی در حضور ژن رفرنس در مقایسه با گروه شاهد علی‌رغم کاهش، به لحاظ آماری تغییر معنی‌داری مشاهده نشد.

جدول ۴. اطلاعات خروجی از نرم‌افزار Rest-RG از میزان بیان نسبی ژن هیستون داستیلاز-۴ و فاکتور افزایش‌دهنده مایوسیت-۲ در عضله نعلی

ژن	نوع ژن موردمطالعه	بازده واکنش	میزان بیان	خطای معیار	P(H1)	نتیجه
بتا	رفرنس	۰/۸۲	۱/۳۱	۳/۷۵-۰/۳۳	۰/۶۱	-
هیستون داستیلاز-۴	هدف	۰/۷۵	۰/۸۱	۳/۳۵-۰/۲۱	۰/۴۷	-
فاکتور افزایش‌دهنده مایوسیت-۲	هدف	۰/۷۸	۰/۶۲	۱/۴۱-۰/۲۷	۰/۰۰	کاهش

در عضله نعلی میزان بیان نسبی ژن هیستون داستیلاز-۴ در گروه تمرین نسبت به گروه شاهد علی‌رغم کاهش، به لحاظ آماری تغییر معنی‌داری نداشته است. همچنین در همین عضله میزان بیان نسبی ژن فاکتور افزایش‌دهنده مایوسیت-۲ در گروه تمرینی نسبت به گروه شاهد به لحاظ آماری کاهش معنی‌داری نشان داد ($P<۰/۰۵$).

بحث و نتیجه‌گیری

تمرین ورزشی ظرفیت متابولیکی عضله اسکلتی را افزایش می‌دهد و موجب بهبود هموستازی و افزایش سلامتی می‌شود. این بهبود ناشی از بیان تعدادی از آنزیم‌های متابولیکی است. در سطح مولکولی، ممانعت بیشتر این ژن‌ها به‌وسیله خانواده‌ی از ممانعت کننده‌های رونویسی یعنی ژن هیستون داستیلاز-۴ نوع II از طریق تعاملشان با ژن فاکتور افزایش‌دهنده مایوسیت-۲ صورت می‌گیرد (۲۱). تعامل این دو ژن به شکلی است که ژن هیستون داستیلاز-۴ باعث جلوگیری از فعالیت ژن فاکتور افزایش‌دهنده مایوسیت-۲ می‌شود. ژن فاکتور افزایش‌دهنده مایوسیت-۲ تنظیم‌کننده کلیدی رشد عضلانی است (۱) که به‌طور ویژه در عضلات کند انقباض اکسایشی بیان می‌گردد (۲۲) با توجه به تأثیر ژن فاکتور افزایش‌دهنده مایوسیت-۲ فعال‌شده و بهبود ظرفیت استقامتی و اکسایشی عضلات اسکلتی می‌توان فرصت‌هایی را برای پیشبرد روش‌های درمان بیماری‌های مرتبط با عضلات اسکلتی مهیا کرد (۱۰) و از طرفی دیگر PKD یک کیناز مهم برای هیستون داستیلازهای عضلات اسکلتی است و شاید بتوان بخشی از این پروتئین کینازها بر سازگاری‌های عضلانی را به تعامل با هیستون داستیلازها نسبت داد زیرا نه‌تنها در سازگاری‌های ناشی از عدم تعادل متابولیک (آنچه در فعالیت استقامتی رخ می‌دهد) درگیرند بلکه در تعامل با دیگر فاکتورهای رونویسی در تجدید ساختار عضله سهیم‌اند (۲۳).

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 13:02 +0430 on Tuesday August 14th 2018

نتایج این پژوهش نشان داد بیان ژن هیستون داستیلاز-۴ در عضله بازکننده دراز انگشتان گروه تمرینی در مقایسه با گروه شاهد تغییر معنی‌داری نکرده و بیان ژن فاکتور افزایش‌دهنده مایوسیت-۲ در عضله بازکننده دراز انگشتان گروه تمرینی در مقایسه با گروه غیر تمرینی علی‌رغم کاهش اما از لحاظ آماری معنی‌داری نبود. همچنین در عضله نعلی بیان ژن هیستون داستیلاز-۴ در گروه تمرینی نسبت به گروه شاهد تغییر معنی‌داری مشاهده نگردید اما بیان ژن فاکتور افزایش‌دهنده مایوسیت-۲ در گروه تمرینی در مقایسه با گروه شاهد از لحاظ آماری کاهش معنی‌داری نشان داد. نشان داده شده که پروتئین‌های هیستون داستیلاز-۴ کلاس نوع II (ممانعت کننده فاکتور رونویسی فاکتور افزایش‌دهنده مایوسیت-۲) در عضله نعلی (عضله کند) در مقایسه با پهن جانبی (عضله تند) نمی‌توانند تجمع یابند (۱۹) که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. گزارش‌شده که شکل فعالیت ژن فاکتور افزایش‌دهنده مایوسیت-۲ در عضلات اسکلتی موش‌های ترانس‌ژنیک موجب شکل‌گیری تارهای کند انقباض و افزایش استقامت آن‌ها می‌شود (۱۲) که موش‌ها را قادر می‌سازد تا تقریباً دو برابر بیشتر از همتایان عادی خود بدوند؛ بنابراین سرکوب انتخابی هیستون داستیلاز کلاس نوع II در عضلات کند ممکن است موجب مکانیسمی شود که افزایش اجرای بدنی و مقاومت در برابر خستگی را به‌وسیله افزایش فعالیت فاکتور افزایش‌دهنده مایوسیت-۲ را به دنبال داشته باشد (۲۲).

مطالعات نشان داده که فعالیت ورزشی موجب تغییراتی در فاکتورهای رونویسی می‌شود که این فاکتورها مخصوصاً به فعالیت‌های استقامتی پاسخ می‌دهند البته باید یادآوری کرد که این تغییرات لزوماً افزایش یا کاهش بیان ژن نیست (۲) بلکه می‌تواند تعدیل‌های پس‌رونویسی مانند فسفوریلاسیون و یا دفسفوریلاسیون پروتئین‌های موجود نیز باشد (۱) مشاهده شد در آزمودنی‌های تحقیق مذکور علی‌رغم عدم مشاهده افزایش بیان ژن فاکتور افزایش‌دهنده مایوسیت-۲ در اثر فعالیت استقامتی، آزمودنی‌ها نسبت به گروه غیر تمرینی دارای استقامت بیشتری بودند، به‌طوری‌که در هفته هشتم پروتکل تمرینی ۵۰ دقیقه با سرعت ۲۳ متر بر دقیقه بر روی نوار گردان می‌دویدند که با تحقیقات اسپانگنبرگ و همکاران همخوانی داشت (۲).

تنظیم ژن فاکتور افزایش‌دهنده مایوسیت-۲ تحت کنترل آبشار مسیر سیگنالینگ AMPK، هیستون داستیلاز-۵ و PGC-1 در مدت پاسخ تنظیمی به تمرین استقامتی است (۲۴). عامل کلیدی در تغییر نوع تار تغییر در میزان جریان کلسیم است. افزایش مداوم اما کم شدت در میزان کلسیم درون‌سلولی موجب فعال شدن کالسی‌نورین می‌شود. کالسی‌نورین سبب دفسفوریلاسیون فاکتور رونویسی NFAT شده، سپس NFAT فسفوریله شده به داخل هسته حرکت کرده و در آنجا از طریق فعال‌سازی فاکتور رونویسی خانواده ژن فاکتور افزایش‌دهنده مایوسیت-۲ موجب آغاز رونویسی تارهای کند انقباض می‌شود (۲۲)؛ اما افزایش تناوبی در میزان کلسیم موجب فعال‌سازی کالسی نورین نشده و NFAT در حالت فسفوریله شده باقی‌مانده و بدین ترتیب نمی‌تواند وارد هسته شود و برنامه بیان تارهای تند انقباض غالب می‌ماند. مکانیسم دوم خیلی کم در اثر تمرینات ورزشی اتفاق می‌افتد. گزارش‌شده که تنها در افرادی که دچار فلج عضلانی می‌شوند تبدیل تارهای به سمت نوع تند انقباض به‌وضوح رخ داده و حتی ۱۲ ماه تمرین دوچرخه‌سواری و تحریک الکتریکی منجر به افزایش شدید MHC-IIa و به همان اندازه کاهش در MHC-IIx شده است (۱۶) که با یافته‌های پژوهش حاضر همخوانی ندارد. عدم تغییر بیان ژن هیستون داستیلاز-۴ در عضله نعلی در این پژوهش ممکن است به این دلیل باشد که عضله نعلی از کندترین عضلات اسکلتی محسوب شده و

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 13:02 +0430 on Tuesday August 14th 2018

تغییر ژن هیستون داستیلاز-۴ موجب تغییر رهایش ژن فاکتور افزایش‌دهنده مایوسیت-۲ از کنترل منفی می‌شود. همان‌طور که بیان شد ژن فاکتور افزایش‌دهنده مایوسیت-۲ ازجمله فاکتورهایی است که افزایش بیان آن با القای تمایز ژن هیستون داستیلاز-۴ تارهای عضلانی به نوع کند همراه است (۱۱).

از آنجا که عضله نعلی رت دارای درصد بالایی از تارهای کند انقباض (۸۹ درصد تارهای نوع I و ۱۱ درصد تارهای نوع IIa) به نظر می‌رسد ظرفیت تغییر و تبدیل این تارها به سمت تارهای نوع تند بسیار کم است (۱۹,۲۳,۲۵) که با یافته‌های پژوهش حاضر همخوانی دارد. به نظر می‌رسد تغییر در بیان این دو فاکتور در سطح پیش رونویس ضرورتی نداشته و نکته دیگر اینکه می‌بایست به تعدیلات پس‌رونویسی و همچنین بخش‌های زیر سلولی مانند سیتوپلاسم و هسته هم توجه داشت (۲۶). مک‌گی و همکاران در پژوهشی با دوچرخه‌سواری با تقریباً ۷۵ درصد VO2Peak برای یک ساعت، نشان دادند که به دنبال ۶۰ دقیقه دوچرخه‌سواری میزان mRNA تام ایزوفرم‌های ۴، ۵، ۷ و ۹ فاکتور هیستون داستیلاز کلاس IIa درون عضله پهن جانبی با تمرین ثابت باقی می‌ماند که با یافته‌های پژوهش حاضر همخوانی دارد؛ اما میزان ایزوفرم‌های ۴ و۵ هسته‌ای آن کاهش می‌یابد (۲۶). هرچند نمونه‌های آزمودنی‌ها، نوع عضله و پروتکل تمرینی در این پژوهش‌ها متفاوت است اما یافته‌های پژوهش مک‌گی (۲۶) با نتایج این پژوهش در مورد عضله نعلی هم‌خوانی داشته و نشان داد که فعالیت‌های بدنی لزوماً منجر به افزایش بیان برخی ژن‌ها نشده و ممکن است با جابجا کردن آن‌ها در عملکردشان تغییر ایجاد کند. همچنین در پژوهشی دیگر که میزان هیستون داستیلاز کلاس IIa هسته نسبت به ورزش ارزیابی شد، مشاهده گردید بعد از ورزش تنها نسبت هیستون داستیلاز ۵/۴ هسته کاهش‌یافته و میزان پروتئین آن‌ها قبل و بعد از ورزش بدون تغییر باقی می‌ماند. رفت و برگشت هسته –سیتوپلاسم پروتئین‌های هیستون داستیلاز ۵/۴ پیشنهاد منطقی برای توجیه این رویداد است. پس از آن فعال‌سازی کینازهای بالقوه در پاسخ به ورزش که ممکن است هدف هیستون داستیلاز ۵/۴ برای خروج از هسته پروتئین‌ها باشد را مورد ارزیابی قرارداد و نشان داد که افزایش معنی‌داری در فسفوریلاسیون II caMK و AMPK بعد از یک جلسه تمرین استقامتی حاد رخ می‌دهد. ایندوکیناز موجب فسفوریلاسیون هیستون داستیلاز کلاس IIa شده و موجب خروج آن‌ها از هسته به سیتوپلاسم می‌شود (۲۴) و بدین‌صورت فعالیت آن‌ها را کاهش می‌دهد بنابراین فرصتی برای فعالیت ژن فاکتور افزایش‌دهنده مایوسیت-۲ فراهم می‌شود.

به‌طور خلاصه نتایج پژوهش حاضر نشان داد که فعالیت استقامتی به مدت ۸ هفته موجب تغییری در بیان ژن‌های هیستون داستیلاز-۴ و فاکتور افزایش‌دهنده مایوسیت-۲ در عضله بازکننده دراز انگشتان نگردید اما در عضله نعلی ژن فاکتور افزایش‌دهنده مایوسیت-۲ کاهش یافت و از طرفی در میزان بیان ژن هیستون داستیلاز-۴ نیز تغییری مشاهده نشد. در این پژوهش میزان پروتئین اندازه‌گیری نشد، لذا پیشنهاد می‌شود در تحقیقات آینده تغییرات پس‌رونویسی ژن‌های مورد بررسی، بعد از فعالیت‌های استقامتی در عضلات بازکننده دراز انگشتان و نعلی بررسی گردد.

تشکر و قدردانی

در پایان از راهنمایی ارزنده آقایان دکتر محمد فتحی و دکتر حسن احمدوند و کارکنان مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی علی‌الخصوص سرکار خانم فروزان هادی پور، سعید ویس‌کرمی و رضا رستمی تشکر و قدرانی می‌گردد.

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 13:02 +0430 on Tuesday August 14th 2018

References

1. Cohen TJ, Choi MC, Kapur M, Lira VA, Yan Z, Yao TP. HDAC4 regulates muscle fiber type-specific gene expression programs. Mol Cells. 2015; 38(4): 343-348.
2. Spangenburg EE, Booth FW. Molecular regulation of individual skeletal muscle fibre types. Acta Physiol Scand. 2003; 178(4): 413-424.
3. Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. Physiol Rev. 2011; 91(4): 1447-1531.
4. Claflin DR, Larkin LM, Cederna PS, Horowitz JF, Alexander NB, Cole NM, et al. Effects of high- and low-velocity resistance training on the contractile properties of skeletal muscle fibers from young and older humans. J Appl Physiol (1985). 2011; 111(4): 1021-1030.
5. Schiaffino S, Reggiani C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. Physiol Rev. 1996; 76(2): 371-423.
6. Talmadge RJ. Myosin heavy chain isoform expression following reduced neuromuscular activity: potential regulatory mechanisms. Muscle Nerve. 2000; 23(5): 661-679.
7. Pette D. The adaptive potential of skeletal muscle fibers. Can J Appl Physiol. 2002; 27(4): 423-448.
8. Bigard XA, Janmot C, Merino D, Lienhard F, Guezennec YC, D'Albis A. Endurance training affects myosin heavy chain phenotype in regenerating fast-twitch muscle. J Appl Physiol (1985). 1996; 81(6): 2658-2665.
9. Naya FJ, Olson E. MEF2: a transcriptional target for signaling pathways controlling skeletal muscle growth and differentiation. Curr Opin Cell Biol. 1999; 11(6): 683-688.
10. Potthoff MJ, Wu H, Arnold MA, Shelton JM, Backs J, McAnally J, et al. Histone deacetylase degradation and MEF2 activation promote the formation of slow-twitch myofibers. J Clin Invest. 2007; 117(9): 2459-2467.
11. Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, et al. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. Nature. 2002; 418(6899): 797-801.
12. Wynne B. Encyclopedia of Global Health. American College of Sports Medicine (ACSM). SAGE Publications, Inc. 2015.
13. Wu H, Rothermel B, Kanatous S, Rosenberg P, Naya FJ, Shelton JM, et al. Activation of MEF2 by muscle activity is mediated through a calcineurin-dependent pathway. EMBO J. 2001; 20(22): 6414-6423.
14. Akimoto T, Sorg BS, Yan Z. Real-time imaging of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha promoter activity in skeletal muscles of living mice. Am J Physiol Cell Physiol. 2004; 287(3): C790-796.
15. Vega RB, Matsuda K, Oh J, Barbosa AC, Yang X, Meadows E, et al. Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. Cell. 2004; 119(4): 555-566.
16. Backs J, Worst BC, Lehmann LH, Patrick DM, Jebessa Z, Kreusser MM, et al. Selective repression of MEF2 activity by PKA-dependent proteolysis of HDAC4. J Cell Biol. 2011; 195(3): 403-415.
17. Sturgeon KM, Ky B, Libonati JR, Schmitz KH. The effects of exercise on cardiovascular outcomes before, during, and after treatment for breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2014; 143(2): 219-226.
18. Sun L, Shen W, Liu Z, Guan S, Liu J, Ding S. Endurance exercise causes mitochondrial and oxidative stress in rat liver: effects of a combination of

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 13:02 +0430 on Tuesday August 14th 2018

mitochondrial targeting nutrients. Life Sci. 2010; 86(1): 39-44.
19. Fathi M, Gharakhanlu R. The Effect of one Session Resistance Exercise on Hdac4 gene Expression in Slow and Fast Twitch Muscles of Male Wistar Rats. Journal Ilam Univ Med Sci. 2016; 24(2): 149-157.
20. Rio DC, Ares M, Jr., Hannon GJ, Nilsen TW. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). Cold Spring Harb Protoc. 2010; 12(6): 39-54.
21. McGee SL. Exercise and MEF2-HDAC interactions. Appl Physiol Nutr Metab. 2007; 32(5): 852-856.
22. Harridge SD. Plasticity of human skeletal muscle: gene expression to in vivo function. Exp Physiol. 2007; 92(5): 783-797.
23. Vissing K, McGee SL, Roepstorff C, Schjerling P, Hargreaves M, Kiens B. Effect of sex differences on human MEF2 regulation during endurance exercise. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2008; 294(2): E408-415.
24. Saleem A, Safdar A. Exercise-induced histone acetylation - playing tag with the genome. J Physiol. 2010; 588(6): 905-906.
25. Putman CT, Xu X, Gillies E, MacLean IM, Bell GJ. Effects of strength, endurance and combined training on myosin heavy chain content and fibre-type distribution in humans. Eur J Appl Physiol. 2004; 92(4): 376-384.
26. McGee SL, Fairlie E, Garnham AP, Hargreaves M. Exercise-induced histone modifications in human skeletal muscle. J Physiol. 2009; 587(24): 5951-5958.

Downloaded from yafte.lums.ac.ir at 13:02 +0430 on Tuesday August 14th 2018

The effect of endurance activity on the HDACA4 and MEF2 gene expression in skeletal muscles of male Wistar rats

Bahrami F[1], Fathi M[* 2], Ahmadvand H[3], Pajohi N[4]

1.PhD student in physiology, Department of Physical Education and Sport Sciences , Lorestan University,khorammabad,Iran.
2. Assistant professor , Department of Physical Education and Sport Sciences , Lorestan University, khorammabad ,Iran, javidfathi7@gmail.com
3. Full Professor, Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, Lorestan University of Medical Sciences, khorammabad ,Iran.
4. Assistant Professor , physiology , Faculty of Medical Sciences, Lorestan University of Medical Sciences, khorammabad ,Iran.

Received: *10 Jun 2018* **Accepted:** *3 March 2018*

Abstract

Background **:** Skeletal muscles are composed of various contracted fibrils, which are mainly divided into fast-twitch and slow-twitch. This study aimed to investigate 8 weeks endurance activity on the MEF2 and HDACA4 gene expression in fast-twitch and slow-twitch skeletal muscles in male Wistar rats.

Materials and Methods: in order to carry out this study, 20 heads of male Wistar rats, age 4 weeks (110± 10), were bought from the Razi Institute of Lorestan Medical University. The same laboratory conditions were provided for the rats for the completion of 14 days of an endurance familiarization course to teach running on treadmill. At the end of this course, the rats were randomly divided into 2 groups. Experimental group (n=10 head) and control group (n= 10 head). An eight week endurance program, 5 sessions per week, was performed for the experimental group.

Results: this study showed that there was no significant change in the relative gene expression of HDACA4 and MEF2 in EDL muscle in either group (P>0.05). However, the relative gene expression of MEF2 in the experimental group was not statically significant in comparison to the control group (P>0.05). In sol muscles, there was no statically significant changes in either group's gene expression. The relative gene expression of MEF2 in the experimental group showed a statistically significant reduction in comparison to the control group (P>0.05).

Conclusion: in summary, the results of this research have shown that doing 8 weeks endurance exercises did not cause any changes in HDAC4 and MEF2 gene expression in EDL muscle. Although in the SOL muscle, MEF2 gene expression decreased, no changes in the level of HDAC4 gene expression were observed.

Keywords: Endurance activity, MEF2 gene, HDACA4 gene, Slow – twitch and fast- twitch muscles

Citation: BahramiF, Fathi M , Ahmadvand H, Pajohi N. The effect of endurance activity on the HDACA4 and MEF2 gene expression in skeletal muscles of male Wistar rats. Yafte. 2018; 20(1):68-77.