

## تأثیر تمرین استقامتی بر بیان ژن miR-133 و SRF عضلات اسکلتی تند و کند انقباض در رت های نر نژاد ویستار

راضیه رضایی<sup>۱</sup>، سعید شاکریان<sup>۲\*</sup>، مسعود نیکبخت<sup>۲</sup>، فرانک هادی<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزش، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۲. دانشیار گروه فیزیولوژی ورزش، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۳. استادیار گروه ژنتیک مولکولی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران.

### چکیده

**زمینه و هدف:** عوامل miR-133 و SRF در فرآیندهای مختلف سلولی درگیر می باشند، اما هنوز تأثیر تمرین استقامتی بر بیان آنها در عضلات تند و کند انقباض مشخص نشده است. هدف این تحقیق ارزیابی تأثیر تمرین استقامتی بر بیان miR-133 و SRF عضلات تند و کند انقباض در رت های نر نژاد ویستار بود. **روش تحقیق:** در این مطالعه ۱۴ رت با وزن  $113 \pm 20$  گرم (۵ هفته سن داشتند) به مدت ۴ هفته تحت شرایط کنترل شده، نگهداری شدند و بعد از دوره آشناسازی به صورت تصادفی به دو گروه کنترل و تجربی (۷ سر رت در هر گروه) تقسیم شدند. گروه تجربی یک برنامه تمرین استقامتی ۱۴ هفته ای، هفته ای ۶ جلسه (که به تدریج به ۶۰ دقیقه و سرعت ۳۰ متر بر دقیقه رسید) را روی نوارگردان اجرا نمودند و ۴۸ ساعت پس از پایان آخرین جلسه، همراه با گروه کنترل تشریح شدند. سپس عضله کند انقباض (نعلی) و تند انقباض (بازکننده بلند انگشتان) آنها جدا شد. سطح بیان miR-133 و ژن SRF با استفاده از روش Real time-PCR اندازه گیری شدند. نتایج تحقیق با استفاده از آزمون آماری t تک نمونه و همبسته در سطح  $p < 0.01$  استخراج گردید. **یافته ها:** پس از ۱۴ هفته تمرین استقامتی، بیان miR-133 عضله بازکننده بلند انگشتان گروه تجربی نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری ( $p = 0.001$ ) کاهش پیدا کرد؛ اما بیان miR-133 عضله نعلی افزایش معنی داری ( $p = 0.001$ ) نشان داد. همچنین بیان miR-133 عضله بازکننده بلند انگشتان گروه تجربی نسبت به عضله نعلی همان گروه به طور معنی داری ( $p = 0.001$ ) کاهش و میزان بیان ژن SRF عضله بازکننده بلند انگشتان گروه تجربی به طور معنی داری ( $p = 0.009$ ) افزایش یافت. اما بیان این ژن در عضله نعلی تغییر نکرد ( $p > 0.05$ ). **نتیجه گیری:** تمرین استقامتی باعث القاء تغییراتی در بیان miR-133 و ژن SRF متناسب با خصوصیات تارهای تند و کند انقباض می شود.

**واژه های کلیدی:** تمرین استقامتی، عضلات تند انقباض، عضلات کند انقباض، ژن SRF، ژن miR-133.

\*نویسنده مسئول، آدرس: اهواز، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزش؛

## مقدمه

در مورد تأثیر فعالیت بدنی بر فاکتورهای سلولی و مولکولی گوناگون تحقیقات گسترده‌ای انجام شده است (ابراهیم پور و ایراندوست، ۲۰۱۶؛ قربانیان و قاسم نیان، ۲۰۱۶)، در مورد تأثیر فعالیت بدنی بر بیان miR ها نیز تحقیقاتی انجام گرفته، اما تحقیق‌های بیشتری در این زمینه مورد نیاز است. نتایج نشان می‌دهد که مایومیرها تحت تأثیر فعالیت بدنی قرار می‌گیرند. مشخص شده است که فعالیت استقامتی و مقاومتی، هر دو، باعث تغییر در بیان برخی مایومیرها می‌شوند (سان<sup>۲۴</sup> و دیگران، ۲۰۱۳). تغییراتی که در اثر فعالیت بدنی در بیان مایومیرها گزارش شده، پیشنهاد می‌کند که بیان آن‌ها ممکن است در سازگاری ناشی از تمرین نقش داشته باشد (الیاه<sup>۲۵</sup> و دیگران، ۲۰۰۹؛ کربی و مک کارتی<sup>۲۶</sup>، ۲۰۱۳). تحقیقات نشان داده‌اند که نه تنها مایومیرها به فعالیت بدنی پاسخ می‌دهند، بلکه بر عناصر هدف خود نیز تأثیر می‌گذارند (صفدر و دیگران، ۲۰۰۹). مک کارتی و اسر<sup>۲۷</sup> (۲۰۰۷) در مطالعه‌ای نشان داده‌اند که اعمال یک دوره بار عملکردی (قطع عضله همکار) با کاهش بیان miR-1-2 و miR-133 a-1 همراه است و میزان آنزیم‌های فراوری کننده آن‌ها نیز تغییر کرد. مطالعات کلر<sup>۲۸</sup> و دیگران (۲۰۰۸)، دراموند<sup>۲۹</sup> و دیگران (۲۰۰۸)، نیلسن و دیگران (۲۰۱۰) و روسل<sup>۳۰</sup> و دیگران (۲۰۱۳) نیز نشان دادند که مایومیرها در اثر فعالیت بدنی تغییر می‌کنند. فعالیت بدنی یک عامل بسیار مهم در تجدید ساختار و تغییر بیان ژن‌های درگیر در عضله اسکلتی است. این تغییرات تحت عنوان سازگاری‌های ایجاد شده در اثر تمرینات ورزشی، از طریق مسیرهای گوناگون و با میانجی‌گری فاکتورهای واسطه‌ای متفاوت انجام می‌شود. از جمله این میانجی‌ها، miR-133 می‌باشد که این عامل در ارتباط با SRF که یکی از فاکتورهای هدف آن است، می‌تواند از جمله مسیرهای موثر در سازگاری عضلات اسکلتی باشد. بنابراین بررسی تأثیر تمرینات ورزشی بر miR-133 و SRF می‌تواند حداقل بخشی

میکرو آر ان<sup>۱</sup> (miR) ویژه عضله<sup>۲</sup> فرآیندهای گوناگون عضله مانند تکثیر، تمایز میوبلاست‌ها، انقباض‌پذیری و پاسخ به استرس را تنظیم می‌کند (نیلسن<sup>۳</sup> و دیگران، ۲۰۱۰). به نظر می‌رسد miR ها وسیله‌ای برای ایجاد تعادل بین فرآیندهای متفاوت رشد و تمایز میوبلاست و تنظیم چرخه رشد و نمو عضلات هستند (صفدر<sup>۴</sup> و دیگران، ۲۰۰۹). miR-133 یکی از اعضای این خانواده است که دارای دو هومولوگ می‌باشد. توالی نوکلئوتید این دو یکسان است و تنها تفاوت آن‌ها، قرارگیری بر روی دو کروموزوم مجزا است که در مورد رت، به ترتیب کروموزوم ۲ و ۱۸ می‌باشد (چن<sup>۵</sup> و دیگران، ۲۰۰۶). miR-133 دارای ۲۲ نوکلئوتید است (ون رویج<sup>۶</sup> و دیگران، ۲۰۰۸) که در آپوپتوزیس<sup>۷</sup>، هدایت قلبی، میوژنیزیس<sup>۸</sup> و هایپرتروفی عضله اسکلتی و قلبی نقش دارد (کالیس<sup>۹</sup> و دیگران، ۲۰۰۸). مشخص شده که مایومیرها از طریق تأثیر بر روی ژن‌های هدف خود، اثرات خود را القاء می‌کنند. به عنوان مثال miR-133 فاکتور پاسخ سرم<sup>۱۰</sup> (SRF)، پروتئین متصل به دستگاه پلی پیریمیدین (nPTB)، Rho<sup>۱۱</sup> و عامل ضروری برای هایپرتروفی<sup>۱۲</sup> (ERG) که کانال پتانسیمی دریچه دار حساس به ولتاژ زیر خانواده<sup>۱۳</sup> KCNQ1 را کد می‌کند، پروتئین کنترل کننده تقسیم سلولی<sup>۱۴</sup> Cdc42، کاسپاز<sup>۱۵</sup>، عامل هسته‌ای درگیر در نمو قلبی<sup>۱۶</sup> (WHSC2/ NELF-A) و ژن‌های کانال مرکز هدایت قلبی<sup>۱۷</sup> (HCN2 و HCN4) را کنترل می‌کند (کالیس و دیگران، ۲۰۰۷؛ ون رویج و دیگران، ۲۰۰۸؛ ویلیامز<sup>۱۸</sup> و دیگران، ۲۰۰۹؛ تام و باورساجز<sup>۱۹</sup>، ۲۰۰۹). علاوه بر این miR-133 در سازماندهی اکتین سارکومری (میوشیما<sup>۲۰</sup> و دیگران، ۲۰۰۹)، مهار شکل‌گیری چربی قهوه‌ای (بین<sup>۲۱</sup> و دیگران، ۲۰۱۳)، افزایش تمایز به وسیله تنظیم مسیر فاکتور شبه انسولین-۱<sup>۲۲</sup> (IGF-1) از طریق تنظیم کاهشی گیرنده IGF-1 نقش دارد (هانگ<sup>۲۳</sup> و دیگران، ۲۰۱۱).

1. microRNA
2. MyomiR
3. Nielsen
4. Safdar
5. Chen
6. Van Rooij
7. Apoptosis
8. Myogenesis
9. Callis
10. Serum response factor

11. Rhodopsin
12. Ether-a-go-gorelated gene
13. Potassium voltage- gated channel subfamily Q member
14. Cell division control protein 42
15. Caspase 9
16. Negative elongation factor A/Wolf- Hirschhorn syndrome candidate 2
17. Hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated potassium channel 2
18. Williams
19. Thum & Bauersachs
20. Mishima

21. Yin
22. Insulin-like growth factor 1
23. Huang
24. Sun
25. Elia
26. Kirby & McCarthy
27. Esser
28. Keller
29. Drummond
30. Russell

اصلی پروتکل ۱۲ دقیقه بود، اما به طور هفتگی مدت زمان بخش اصلی پروتکل افزایش یافت (در هفته اول تا سوم، هر روز ۲ دقیقه به مدت زمان اجرای بخش اصلی پروتکل اضافه شد)؛ به طوری که در پایان روز بیستم، مدت زمان بخش اصلی پروتکل به ۵۰ دقیقه رسید و با در نظر گرفتن پنج دقیقه برای گرم کردن و ۵ دقیقه نیز برای سرد کردن، مدت زمان کل تمرین به ۶۰ دقیقه رسید. تمرین با سرعت ۲۰ متر در دقیقه شروع شد و هر هفته ۲ متر بر دقیقه به سرعت اضافه گردید؛ به طوری که در پایان هفته ششم به ۳۰ متر در دقیقه رسید. نهایتاً در هفته های هفتم تا دهم به تدریج ۵ درجه بر شیب نوارگردان (ابتدای هر هفته تقریباً ۱/۲ درجه شیب) اضافه شد. این پروتکل (۶۰ دقیقه دویدن شامل ۵ دقیقه گرم کردن با سرعت ۱۲ متر در دقیقه، ۵۰ دقیقه دویدن با سرعت ۳۰ متر در دقیقه، با شیب ۵ درجه به عنوان بخش اصلی پروتکل و در نهایت ۵ دقیقه دویدن با سرعت ۹ متر در دقیقه به عنوان بخش سرد کردن)) تا پایان هفته چهاردهم حفظ شد. پروتکل بین ساعات ۵ تا ۷ بعدازظهر اجرا می شد. در انتهای دستگاه نوارگردان، یک شوک الکتریکی برای جلوگیری از توقف حیوان، تعبیه شده بود.

۴۸ ساعت (برای اجتناب از تاثیر جلسه پایانی) پس از پایان آخرین جلسه تمرینی، رت ها با ترکیبی از کتامین (۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) بی هوش شدند. بعد از بی هوشی کامل، عضلات نعلی و بازکننده بلند انگشتان تحت شرایط استریل خارج و بلافاصله در میکروتیوب جاسازی شده و وارد تانک نیتروژن مایع شدند. پس از پایان این مرحله، میکروتیوب ها به یخچال ۸۰- درجه سانتی گراد انتقال داده شدند.

برای استخراج RNA از بافت های هموژن شده، به ۱۰۰ میلی گرم از بافت داخل میکروتیوب، ۱ میلی لیتر تریزول<sup>۳</sup> (ماده لیز کننده) اضافه شد و ادامه کار طبق دستورالعمل استخراج RNA با استفاده از تریزول انجام شد. غلظت RNA با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (شرکت اپندورف<sup>۴</sup>) و نسبت طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰

از فرآیند سازگاری تارهای عضلات اسکلتی با تمرینات ورزشی را روشن سازد.

فعالیت استقامتی به عنوان یک عامل موثر در تکثیر و تمایز عضلات، پروتئین های آنزیمی و ساختار عضله (فرآیند هایی که بازیگر اصلی آنها miR-133 و SRF است) شناخته شده است. اما طبق بررسی های انجام شده تاکنون تحقیقی تأثیر فعالیت استقامتی بلندمدت بر بیان miR-133 و SRF عضلات تند و کند انقباض را مورد مطالعه قرار نداده است. از این رو هدف این تحقیق بررسی تأثیر یک دوره فعالیت استقامتی بر بیان miR-133 و SRF عضلات اسکلتی تند و کند انقباض در رت های نر نژاد ویستار بود.

### روش تحقیق

آزمودنی های این تحقیق ۲۰ رت نر نابالغ نژاد ویستار (با ۵ هفته سن) بودند که از انستیتو پاستور خریداری شده و تا رسیدن به سن بلوغ (که ۴ هفته طول کشید) در آزمایشگاه حیوانات نگهداری شدند. رت ها در این مدت در ۵ قفس یکسان نگهداری شدند و برای آن ها شرایط مناسب آزمایشگاهی (میانگین دما ۲۲±۳ درجه سانتی گراد، دسترسی آزاد به آب و غذا و شرایط چرخه تاریکی و روشنایی ۱۲:۱۲ ساعت) فراهم شد. یک دوره آشناسازی با تمرین شامل ۵ جلسه دویدن روی نوارگردان با سرعت ۹ متر در دقیقه، به مدت ۵ دقیقه در هر جلسه برای تمام رت ها در نظر گرفته شد. پس از پایان جلسات آشناسازی، رت ها به طور تصادفی به دو گروه کنترل (۱۰ سر) و گروه تمرینی (۱۰ سر) تقسیم شدند. طی اجرای پروتکل ورزشی، تعداد ۳ سر از رت های گروه تمرینی نتوانستند پروتکل تمرینی را به پایان برسانند، لذا از مطالعه خارج شدند و تعداد نهایی به ۷ رت در هر گروه رسید. بر اساس مطالعات (جین<sup>۱</sup> و دیگران، ۲۰۰۰؛ سان<sup>۲</sup> و دیگران، ۲۰۱۰) یک پروتکل فعالیت استقامتی شامل ۱۴ هفته، هفته ای ۶ روز دویدن روی نوارگردان برای رت ها طراحی و اجرا گردید. هر جلسه با یک بخش ۵ دقیقه ای با سرعت ۱۲ متر در دقیقه با هدف گرم کردن شروع می شد. در جلسه اول، بخش

1. Jin
2. Sun
3. Trizol
4. Eppendorff

نانومتر ارزیابی شد. غلظت‌های به دست آمده در دامنه ۱/۶ تا ۱/۸ قرار داشتند. برای رونویسی RNA به cDNA<sup>۱</sup> از کیت شرکت اگزیکون<sup>۲</sup> با شماره محصول ۲۰۳۳۰۰ بهره برداری شد و برای رونویسی RNA به cDNA ژن SRF از کیت شرکت ترموسایننتیفیک<sup>۳</sup> (ساخت کشور آمریکا) با شماره محصول K1621 استفاده شد. تمام مراحل مطابق دستورالعمل شرکت‌سازنده انجام گردید. ترموسایکلر<sup>۴</sup> مورد استفاده در این مرحله متعلق به شرکت اپندورف بود.

برای ارزیابی بیان miR-133 و ژن SRF از تکنیک ریل تایم پی سی آر<sup>۵</sup> و دستگاه شرکت آپلاید بایوسیستم<sup>۶</sup> استفاده شد. قبل از ارزیابی نهایی بیان ژن SRF طبق دستورالعمل روش ریل تایم پی سی آر، میزان کارآیی<sup>۷</sup> ژن رفرنس<sup>۸</sup> (GAPDH) و ژن هدف (SRF) بررسی شد و مشاهده گردید که میزان کارآیی برای این دو ژن در بالاترین میزان (عدد یک) است. سایبرگرین مسترمیکس<sup>۹</sup> استفاده شده متعلق به شرکت تاکارا<sup>۱۰</sup> با شماره محصول RR0810A (ساخت کشور ژاپن) بود. طبق دستورالعمل کیت، برای یک نمونه ۱۰ میکرولیتری، ترکیبی از مستر میکس (۵ میکرو لیتر) پرایمر (۱ میکرولیتر)، cDNA (۱ میکرولیتر) و آب مقطر (۳ میکرولیتر) در نظر گرفته شد و میزان بیان ژن با استفاده از روش نسبی ارزیابی شد. در هر دوره<sup>۱۱</sup> (۴۰ سیکلی) یک نمونه به عنوان کنترل منفی برای تعیین آلودگی مسترمیکس در نظر گرفته شد و کنترل داخلی (GAPDH)، کنترل مثبت (گروه کنترل) و ژن SRF همزمان در یک دوره ارزیابی شد. ژن رفرنس در این تحقیق ژن GAPDH بود.

اما سایبرگرین مسترمیکس برای miR-133 با شماره محصول ۲۰۳۴۵۰، پرایمرهای miR-133 (بسا توالی

۱۱. Run  
۱۲. Duplicate  
۱۳. Cycle threshold  
۱۴. Fold Change  
۱۵. Livak  
۱۶. Pfaffl  
۱۷. Yuan  
۱۸. Shapiro-Wilk  
۱۹. One sample t test

یافته‌ها

میانگین تعداد سیکل‌های گروه کنترل و تجربی پس از تمرین استقامتی و همچنین مقادیر بیان miR-133 و ژن SRF برای هر دو بافت (تندانبض و کندانبض) در جدول ۱ مشخص شده است.

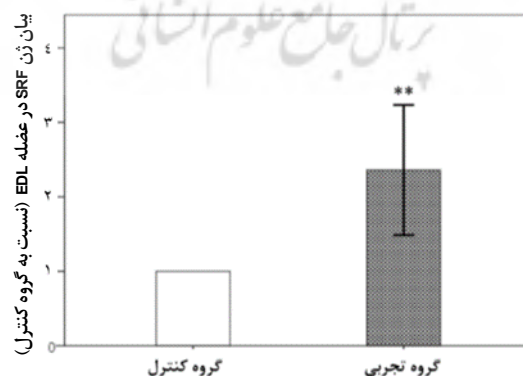
1. Compiementary DNA
2. Exiqon
3. ThermoScientific
4. Thermocycler
5. Real time PCR
6. Applied BioSystem
7. Efficiency
8. Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase
9. SYBR green master mix
10. Takara

11. Run
12. Duplicate
13. Cycle threshold
14. Fold Change
15. Livak
16. Pfaffl
17. Yuan
18. Shapiro-Wilk
19. One sample t test

جدول ۱. توصیف CT (چرخه PCR) فاکتورهای ارزیابی شده گروه های شرکت کننده در تحقیق

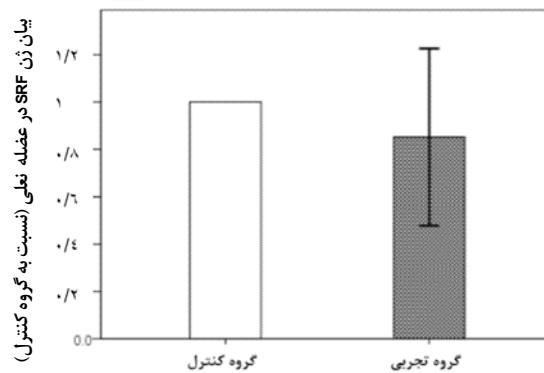
شاخص‌ها	گروه	تعداد	میانگین	انحراف استاندارد
ژن SRF عضله EDL	کنترل	۷	۲۳/۲۱	۰/۷۷
	تجربی	۷	۱۹/۲۳	۰/۸۷
ژن SRF عضله نعلی	کنترل	۷	۲۶/۱۲	۰/۷۹
	تجربی	۷	۲۵/۹	۰/۷۶
ژن GAPDH عضله EDL	کنترل	۷	۱۵/۲	۰/۸۷
	تجربی	۷	۱۶/۱	۰/۸۶
ژن GAPDH عضله نعلی	کنترل	۷	۱۸/۴	۰/۹۹
	تجربی	۷	۱۶/۸۲	۰/۸۱
ژن miR-133 عضله EDL	کنترل	۷	۲۸/۴	۱/۰۶
	تجربی	۷	۲۱/۱	۰/۴۳
ژن miR-133 عضله نعلی	کنترل	۷	۳۰/۸	۱/۰۲
	تجربی	۷	۱۹/۲	۱/۱
ژن U6 عضله نعلی	کنترل	۷	۲۴/۷	۰/۷
	تجربی	۷	۲۲/۴	۱/۲۳
ژن U6 عضله EDL	کنترل	۷	۲۳/۳	۱/۸۰
	تجربی	۷	۲۱/۱	۱/۲

همچنین نتایج آزمون t تک نمونه برای ژن SRF نشان داد که بر اثر ۱۴ هفته فعالیت استقامتی، میانگین بیان ژن SRF در عضله تند انقباض باز کننده بلند انگشتان پا گروه تجربی با افزایش معنی دار ( $t=3/80$  و  $p=0/009$ ) همراه بوده، در حالی که در عضله کند انقباض نعلی این تغییر غیر معنی دار ( $t=-0/96$  و  $p=0/37$ ) می باشد (شکل ۱ و ۲). از طرف دیگر، نتایج آزمون t تک نمونه برای miR-133 نشان داد که فعالیت استقامتی اجرا شده موجب کاهش معنی دار ( $t=-13/10$ ) و افزایش معنی دار ( $p=0/001$ ) بیان miR-133 در عضله تند انقباض باز کننده بلند انگشتان پا نسبت به گروه کنترل شده است (شکل ۳).

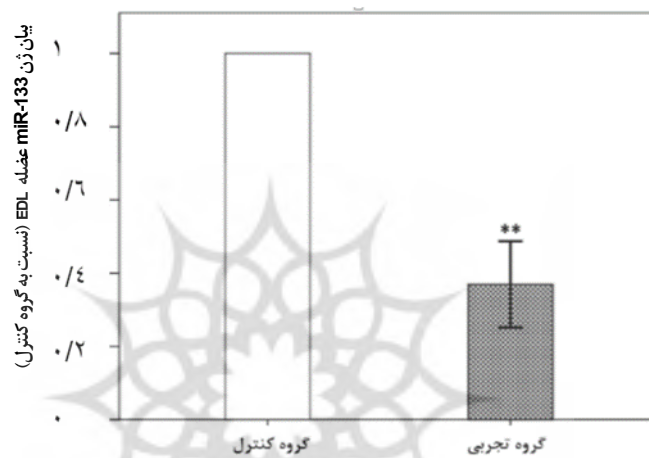


شکل ۱. مقایسه تأثیر یک دوره فعالیت استقامتی بر بیان ژن SRF عضله باز کننده بلند انگشتان پا گروه کنترل و تجربی؛

\*\* نشانه تفاوت معنی دار با گروه کنترل در سطح  $p < 0/009$ .

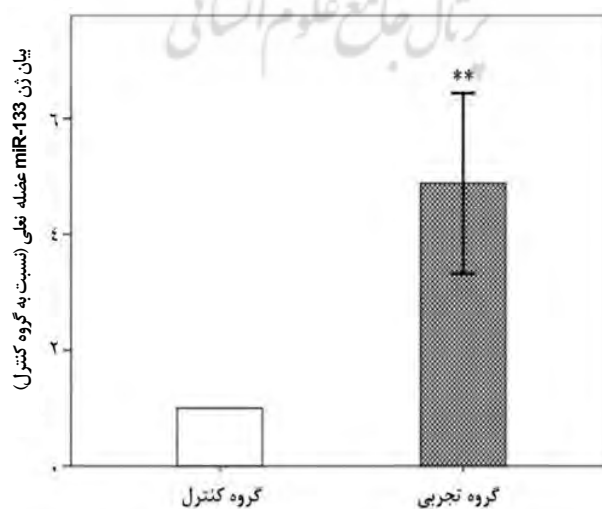


شکل ۲. مقایسه تأثیر یک دوره فعالیت استقامتی بر بیان ژن SRF عضله نعلی گروه کنترل و تجربی.



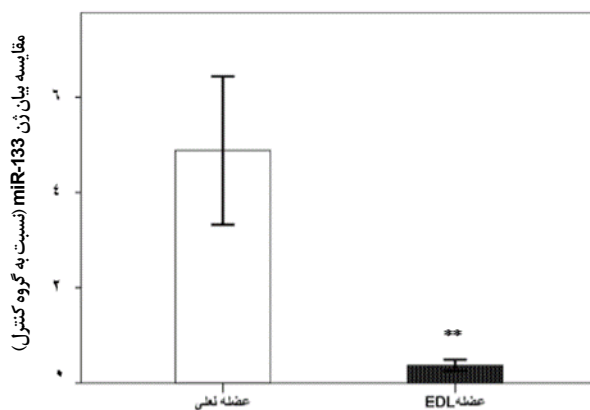
شکل ۳. مقایسه تأثیر یک دوره فعالیت استقامتی بر بیان miR-133 عضله باز کننده بلند انگشتان گروه کنترل و تجربی؛ \*\* نشانه تفاوت معنی دار با گروه کنترل در سطح  $p < 0.001$ .

همچنین نتایج آزمون t تک نمونه نشان داد که ۱۴ هفته بیان miR-133 در عضله کند انقباض نعلی گروه تجربی نسبت به تمرین استقامتی باعث افزایش معنی دار ( $t = 6/10$  و  $p = 0/001$ ) گروه کنترل شده است (شکل ۴).



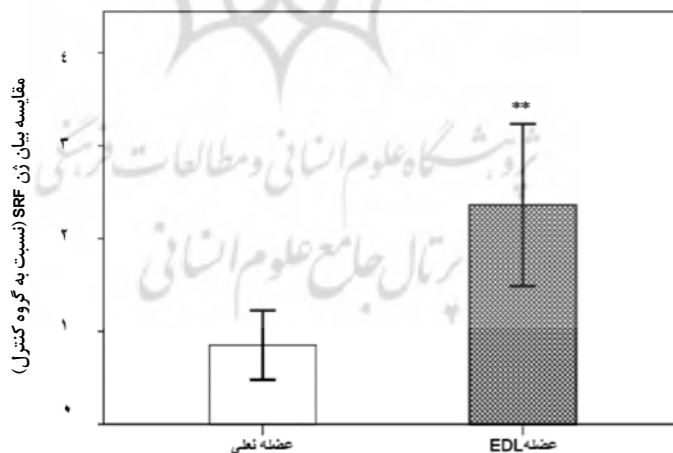
شکل ۴. مقایسه تأثیر یک دوره فعالیت استقامتی بر بیان miR-133 در عضله نعلی گروه کنترل و تجربی؛ \*\* نشانه تفاوت معنی دار با گروه کنترل در سطح  $p < 0.001$ .

نتایج آزمون t همبسته در مورد مقایسه میزان بیان miR-133 در عضله باز کننده بلند انگشتان نسبت به عضله نعلی شده عضلات نعلی و باز کننده بلند انگشتان پا نشان داد که تمرین استقامتی باعث کاهش معنی دار ( $t = -7/09$  و  $p = 0/001$ ) بیان



شکل ۵. مقایسه تأثیر یک دوره فعالیت استقامتی بر بیان miR-133 در عضله نعلی و EDL گروه تجربی؛ \*\* نشانه تفاوت معنی دار با گروه کنترل در سطح  $p < 0/001$ .

نتایج آزمون t همبسته در مورد مقایسه میزان بیان SRF در عضله باز کننده بلند انگشتان نسبت به عضله نعلی شده است عضلات نعلی و باز کننده بلند انگشتان پا نشان داد که تمرین استقامتی باعث افزایش معنی دار ( $t = 3/26$  و  $P = 0/01$ ) بیان SRF



شکل ۶. مقایسه تأثیر یک دوره فعالیت استقامتی بر بیان SRF در عضله نعلی و EDL گروه تجربی؛ \*\* نشانه تفاوت معنی دار با گروه کنترل در سطح  $p < 0/01$ .

## بحث

تقریباً یکسان است (تالماج، ۲۰۰۰). به عبارت دیگر، شاید تفاوت‌های موجود در نتایج مطالعات مختلف، ناشی از تفاوت در نوع تار مورد مطالعه باشد.

مشخص شده که miR-133 تکثیر میوبلاست‌ها را افزایش می‌دهد و حداقل بخشی از این عمل از طریق سرکوب SRF (تنظیم کننده اساسی تمایز عضله و فعال کننده اصلی میوژنز) به انجام می‌رسد (چن و دیگران، ۲۰۰۶؛ ون رویج و دیگران، ۲۰۰۸). مک کارتی و اسر (۲۰۰۷) گزارش کردند که miR-133 a و miR-1 بعد از ۷ روز افزایش بار عملکردی در موش کاهش می‌یابد، آن‌ها نتیجه گرفتند که کاهش این دو میر برای افزایش بیان ژن‌هایی که در هایپرتروفی عضله اسکلتی درگیرند، مورد نیاز است. در مقابل، افزایش miR-133 و miR-1 در تثبیت و عدم تغییر در توده عضله اسکلتی درگیرند (صفدر و دیگران، ۲۰۰۹). مشخص شده است که تمرینات استقامتی، ظرفیت تبدیل تارها را به سمت کسب خصوصیات تارهای کند انقباض تغییر می‌دهند. ممکن است افزایش بیان miR-133 که باعث سرکوب بیان SRF (تعیین کننده مهم تمایز) می‌شود، باعث تثبیت تارهای کند انقباض شود. عضله نعلی دارای درصد بالایی از تارهای کند انقباض است و افزایش بیان miR-133 احتمالاً نشانه‌ای از تثبیت تارهای کند انقباض در این عضله می‌باشد؛ به این صورت که افزایش miR-133 باعث جلوگیری از بیان SRF شده و بنابراین مانع انتقال سلول‌ها به فاز تمایز گردیده و آن‌ها را در مرحله تکثیر نگه می‌دارد. اما در عضله بازکننده بلند انگشتان که دارای تارهای کند انقباض به مراتب کمتر و درصد بیشتر تارهای تند انقباض است، کاهش miR-133 باعث افزایش SRF شده و ممکن است تمایز را در این تارها افزایش داده و تارها به سمت خصوصیات کند انقباضی گرایش یابند. تمرین استقامتی توده عضله اسکلتی را بر اساس روش وابسته به فعالیت، حفظ می‌کند (صفدر و دیگران، ۲۰۰۹). بنابراین هر وهله از تمرین استقامتی، باعث القاء عوامل مایوژنیک می‌شود و بدین ترتیب تغییر و تجدید ساختار عضله اسکلتی افزایش می‌یابد (چن و دیگران، ۲۰۰۶). نیلسن و دیگران (۲۰۱۰) گزارش کرده اند که به دنبال یک وهله فعالیت استقامتی، بیان miR-133 در عضله پهن جانبی<sup>۱</sup> افزایش می‌یابد. فرض آنها این بود که وهله های تکراری تمرین استقامتی، منجر

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تمرین استقامتی میانگین بیان miR-133 عضله باز کننده بلند انگشتان را به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد، در حالی که این شاخص در عضله نعلی افزایش یافت. مقایسه تغییرات دو عضله نیز نشان دهنده کاهش بیان miR-133 در عضله باز کننده بلند انگشتان نسبت به عضله نعلی بود. همچنین نتایج تحقیق در مورد SRF نشان داد که تمرین استقامتی باعث افزایش معنی دار بیان ژن SRF در عضله باز کننده بلند انگشتان شد اما تغییری در بیان عضله نعلی مشاهده نشد. مقایسه تغییرات دو عضله نیز نشان داد که بیان SRF در عضله باز کننده بلند انگشتان افزایش معنی داری نسبت به عضله نعلی داشته است. عملکرد میرها سرکوب بیان ژن از طریق مهار فرآیند ترجمه<sup>۱</sup>، جلوگیری از شروع ترجمه mRNA و یا افزایش تجزیه mRNA است. بنابراین کاهش بیان miR منجر به افزایش بیان پروتئین و یا mRNA ژن هدف می‌شود (نیلسن و دیگران، ۲۰۱۰؛ کربی و مک کارتی ۲۰۱۳). لیویز<sup>۲</sup> و دیگران (۲۰۱۲) گزارش کرده اند که بیان مایومیرها با فعالیت بدنی رابطه عکس دارد؛ به این معنی که افزایش فعالیت بدنی میزان بیان مایومیرها را کاهش می‌دهد و بالعکس. به عنوان مثال نیلسن و دیگران (۲۰۱۰) و کلر و دیگران (۲۰۱۱) سرکوب بیان مایومیرها به دنبال تمرین استقامتی را نشان داده اند. کلر و دیگران (۲۰۱۱) نشان داده اند که ۶ هفته دوچرخه‌سواری بیان miR-133 و miR-1 نیز پهن جانبی انسان را کاهش می‌دهد. نیلسن و دیگران (۲۰۱۰) نیز گزارش کرده اند که بعد از ۱۲ هفته فعالیت استقامتی، بیان تمام مایومیرهای مورد بررسی در بیوپسی‌های بدست آمده از عضله پهن جانبی در حالت استراحت نسبت به پیش از دوره تمرینی، به طور معنی دار کاهش یافت. نتایج تحقیق حاضر در مورد تأثیر تمرین استقامتی بر miR-133 تار تند انقباض با نتایج مطالعه نیلسن و دیگران (۲۰۱۰) و کلر و دیگران (۲۰۱۱) همخوانی دارد. موضوع مهمی که باید مورد توجه قرار گیرد، تفاوت‌هایی است که در ترکیب نوع تار یک عضله در گونه‌های تجربی وجود دارد. عضله مورد مطالعه نیلسن و دیگران (۲۰۱۰) و کلر و دیگران (۲۰۱۱) عضله پهن جانبی بود که در نمونه‌های انسانی یک عضله بینابینی است؛ یعنی درصد تارهای تند انقباض و کند انقباض در این عضله

1. Translation  
2. Lewis  
3. Vastus lateralis



به افزایش این مایومیر در عضله اسکلتی انسان شود. با این وجود همان طور که اشاره شد، به دنبال ۱۲ هفته تمرین استقامتی با شدت بالا مایومیرهای بررسی شده کاهش یافتند. البته ممکن است مایومیرها در وهله های زمانی بعدی طی دوره بازیافت نیز کاهش یابند، زیرا یکی از محدودیت های مطالعه ذکر شده این بود که بیان مایومیرها تنها بلافاصله و ۳ ساعت پس از فعالیت استقامتی اندازه گیری شد. افزایش miR-1 و miR-133 بلافاصله بعد از فعالیت استقامتی، با افزایش عوامل رونویسی<sup>۱</sup> myoD، مایوژنین و MRF4<sup>۲</sup> همراه است که به دنبال فعالیت استقامتی حاد در عضله اسکلتی رخ می دهد و مشخص شده که این عوامل در تنظیم بیان مایومیرها نقش دارند (کادی<sup>۳</sup> و دیگران، ۲۰۰۴؛ کافی<sup>۴</sup> و دیگران، ۲۰۰۶؛ سوئیت من<sup>۵</sup> و دیگران، ۲۰۰۸).

پروتکل تمرین مطالعه سوسی<sup>۶</sup> و دیگران (۲۰۱۱) بر روی رت ها که شامل ۱۰ هفته تمرین هوازی شنا، به مدت ۶۰ دقیقه، ۵ روز در هفته بود، از لحاظ شدت و مدت تقریباً مشابه پروتکل مطالعه حاضر بود. آن ها نشان دادند که تمرین استقامتی با شدت متوسط و بالا، باعث کاهش miR-133 در بطن چپ قلب می شود. نتیجه مطالعه حاضر در مورد تأثیر تمرین بر عضله باز کننده بلند انگشتان با مطالعه سوسی و دیگران (۲۰۱۱) همخوانی دارد، اما در مورد miR-133 عضله نعلی چنین نیست. لازم به ذکر است که در مطالعه مذکور تأثیر تمرین بر miR-133 قلب بررسی شده و بدیهی است که بین بافت های قلب و عضله اسکلتی در پاسخ به تمرین، تفاوت هایی وجود داشته باشد.

عملکرد دیگر miR-133 تنظیم منفی گیرنده IGF-1 و مسیر پیام دهی PI3K/Akt<sup>۷</sup> (تشکیل دهنده مهم فرآیند رشد و نمو عضله اسکلتی) در مدت میوژنیزس عضله اسکلتی است. علاوه بر این، IGF-1 (القائه کننده موثر شکل گیری میوتوبها)، موجب افزایش بیان miR-133 در میوبلاست های تمایزی طی مدت تمایز می شود.

به افزایش این مایومیر در عضله اسکلتی انسان شود. با این وجود همان طور که اشاره شد، به دنبال ۱۲ هفته تمرین استقامتی با شدت بالا مایومیرهای بررسی شده کاهش یافتند. البته ممکن است مایومیرها در وهله های زمانی بعدی طی دوره بازیافت نیز کاهش یابند، زیرا یکی از محدودیت های مطالعه ذکر شده این بود که بیان مایومیرها تنها بلافاصله و ۳ ساعت پس از فعالیت استقامتی اندازه گیری شد. افزایش miR-1 و miR-133 بلافاصله بعد از فعالیت استقامتی، با افزایش عوامل رونویسی<sup>۱</sup> myoD، مایوژنین و MRF4<sup>۲</sup> همراه است که به دنبال فعالیت استقامتی حاد در عضله اسکلتی رخ می دهد و مشخص شده که این عوامل در تنظیم بیان مایومیرها نقش دارند (کادی<sup>۳</sup> و دیگران، ۲۰۰۴؛ کافی<sup>۴</sup> و دیگران، ۲۰۰۶؛ سوئیت من<sup>۵</sup> و دیگران، ۲۰۰۸).

پروتکل تمرین مطالعه سوسی<sup>۶</sup> و دیگران (۲۰۱۱) بر روی رت ها که شامل ۱۰ هفته تمرین هوازی شنا، به مدت ۶۰ دقیقه، ۵ روز در هفته بود، از لحاظ شدت و مدت تقریباً مشابه پروتکل مطالعه حاضر بود. آن ها نشان دادند که تمرین استقامتی با شدت متوسط و بالا، باعث کاهش miR-133 در بطن چپ قلب می شود. نتیجه مطالعه حاضر در مورد تأثیر تمرین بر عضله باز کننده بلند انگشتان با مطالعه سوسی و دیگران (۲۰۱۱) همخوانی دارد، اما در مورد miR-133 عضله نعلی چنین نیست. لازم به ذکر است که در مطالعه مذکور تأثیر تمرین بر miR-133 قلب بررسی شده و بدیهی است که بین بافت های قلب و عضله اسکلتی در پاسخ به تمرین، تفاوت هایی وجود داشته باشد.

عملکرد دیگر miR-133 تنظیم منفی گیرنده IGF-1 و مسیر پیام دهی PI3K/Akt<sup>۷</sup> (تشکیل دهنده مهم فرآیند رشد و نمو عضله اسکلتی) در مدت میوژنیزس عضله اسکلتی است. علاوه بر این، IGF-1 (القائه کننده موثر شکل گیری میوتوبها)، موجب افزایش بیان miR-133 در میوبلاست های تمایزی طی مدت تمایز می شود.

به افزایش این مایومیر در عضله اسکلتی انسان شود. با این وجود همان طور که اشاره شد، به دنبال ۱۲ هفته تمرین استقامتی با شدت بالا مایومیرهای بررسی شده کاهش یافتند. البته ممکن است مایومیرها در وهله های زمانی بعدی طی دوره بازیافت نیز کاهش یابند، زیرا یکی از محدودیت های مطالعه ذکر شده این بود که بیان مایومیرها تنها بلافاصله و ۳ ساعت پس از فعالیت استقامتی اندازه گیری شد. افزایش miR-1 و miR-133 بلافاصله بعد از فعالیت استقامتی، با افزایش عوامل رونویسی<sup>۱</sup> myoD، مایوژنین و MRF4<sup>۲</sup> همراه است که به دنبال فعالیت استقامتی حاد در عضله اسکلتی رخ می دهد و مشخص شده که این عوامل در تنظیم بیان مایومیرها نقش دارند (کادی<sup>۳</sup> و دیگران، ۲۰۰۴؛ کافی<sup>۴</sup> و دیگران، ۲۰۰۶؛ سوئیت من<sup>۵</sup> و دیگران، ۲۰۰۸).

پروتکل تمرین مطالعه سوسی<sup>۶</sup> و دیگران (۲۰۱۱) بر روی رت ها که شامل ۱۰ هفته تمرین هوازی شنا، به مدت ۶۰ دقیقه، ۵ روز در هفته بود، از لحاظ شدت و مدت تقریباً مشابه پروتکل مطالعه حاضر بود. آن ها نشان دادند که تمرین استقامتی با شدت متوسط و بالا، باعث کاهش miR-133 در بطن چپ قلب می شود. نتیجه مطالعه حاضر در مورد تأثیر تمرین بر عضله باز کننده بلند انگشتان با مطالعه سوسی و دیگران (۲۰۱۱) همخوانی دارد، اما در مورد miR-133 عضله نعلی چنین نیست. لازم به ذکر است که در مطالعه مذکور تأثیر تمرین بر miR-133 قلب بررسی شده و بدیهی است که بین بافت های قلب و عضله اسکلتی در پاسخ به تمرین، تفاوت هایی وجود داشته باشد.

عملکرد دیگر miR-133 تنظیم منفی گیرنده IGF-1 و مسیر پیام دهی PI3K/Akt<sup>۷</sup> (تشکیل دهنده مهم فرآیند رشد و نمو عضله اسکلتی) در مدت میوژنیزس عضله اسکلتی است. علاوه بر این، IGF-1 (القائه کننده موثر شکل گیری میوتوبها)، موجب افزایش بیان miR-133 در میوبلاست های تمایزی طی مدت تمایز می شود.

1. Myoblast determination protein 1
2. Myogenic regulatory factor 4
3. Kadi
4. Coffey
5. Sweetman

6. Soci
7. Phosphatidylinositol triphosphate/ Protein Kinase B
8. Huang
9. Schiaffino & Mammucari
10. Wu

## منابع

- Callis, T. E., Chen, J. F., & Wang, D. Z. (2007). MicroRNAs in skeletal and cardiac muscle development. *DNA and Cell Biology*, 26(4), 219-225.
- Callis, T. E., Deng, Z., Chen, J. F., & Wang, D. Z. (2008). Muscling through the microRNA world. *Experimental Biology and Medicine*, 233(2), 131-138.
- Chen, J. F., Mandel, E. M., Thomson, J. M., Wu, Q., Callis, T. E., Hammond, S. M., ... & Wang, D. Z. (2006). The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nature Genetics*, 38(2), 228-233.
- Coffey, V. G., Shield, A., Canny, B. J., Carey, K. A., Cameron-Smith, D., & Hawley, J. A. (2006). Interaction of contractile activity and training history on mRNA abundance in skeletal muscle from trained athletes. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, 290(5), E849-855.
- Drummond, M. J., McCarthy, J. J., Fry, C. S., Esser, K. A., & Rasmussen, B. B. (2008). Aging differentially affects human skeletal muscle microRNA expression at rest and after an anabolic stimulus of resistance exercise and essential amino acids. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, 295(6), E1333-1340.
- Ebrahimpour, S., & Irandoust, K. (2016). The effects of aerobic exercise and omega-3 supplementation on plasma ghrelin and appetite levels in obese women. *Journal of Practical Studies of Biosciences in Sport*, 4(7), 33-42. [Persian]
- Elia, L., Contu, R., Quintavalle, M., Varrone, F., Chimenti, C., Russo, M. A., ... & Condorelli, G. (2009). Reciprocal regulation of microRNA-1 and insulin-like growth factor-1 signal transduction cascade in cardiac and skeletal muscle in physiological and pathological conditions. *Circulation*, 120(23), 2377-2385.
- Ghorbanian, B., & Ghasemnian, A. (2016). The effects of 8 weeks interval endurance combined training on plasma TNF- $\alpha$ , IL-10, insulin resistance and lipid profile in boy adolescents. *Journal of Practical Studies of Biosciences in Sport*, 4(7), 43-54. [Persian]
- Huang, M. B., Xu, H., Xie, S. J., Zhou, H., & Qu, L. H. (2011). Insulin-like growth factor-1 receptor is regulated by microRNA-133 during skeletal myogenesis. *PLOS ONE*, 6(12), e29173.
- Jin, H., Yang, R., Li, W., Lu, H., Ryan, A. M., Ogasawara, A. K., ... & Paoni, N. F. (2000). Effects of exercise training on cardiac function, gene expression, and apoptosis in rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 279(6), H2994-3002.
- Kadi, F., Johansson, F., Johansson, R., Sjostrom, M., & Henriksson, J. (2004). Effects of one bout of endurance exercise on the expression of myogenin in human quadriceps muscle. *Histochemistry and Cell Biology*, 121(4), 329-334.
- Keller, P., Vollaard, N. B., Gustafsson, T., Gallagher, I. J., Sundberg, C. J., Rankinen, T., ... & Timmons, J. A. (2011). A transcriptional map of the impact of endurance exercise training on skeletal muscle phenotype. *Journal of Applied Physiology*, 110(1), 46-59.

- Kirby, T. J., & McCarthy, J. J. (2013). MicroRNAs in skeletal muscle biology and exercise adaptation. *Free Radical Biology and Medicine*, 64, 95-105.
- Lewis, A., Riddoch-Contreras, J., Natanek, S. A., Donaldson, A., Man, W. D., Moxham, J., ... & Kemp, P. R. (2012). Downregulation of the serum response factor/miR-1 axis in the quadriceps of patients with COPD. *Thorax*, 67(1), 26-34.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- McCarthy, J. J., & Esser, K. A. (2007). MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy. *Journal of Applied Physiology*, 102(1), 306-313.
- Mishima, Y., Abreu-Goodger, C., Staton, A. A., Stahlhut, C., Shou, C., Cheng, C., ... & Giraldez, A. J. (2009). Zebrafish miR-1 and miR-133 shape muscle gene expression and regulate sarcomeric actin organization. *Genes & Development*, 23(5), 619-632.
- Nielsen, S., Scheele, C., Yfanti, C., Akerstrom, T., Nielsen, A. R., Pedersen, B. K., & Laye, M. (2010). Muscle specific microRNAs are regulated by endurance exercise in human skeletal muscle. *The Journal of Physiology*, 588(20), 4029-4037.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45.
- Russell, A. P., Lamon, S., Boon, H., Wada, S., Guller, I., Brown, E. L., ... & Wadley, G. D. (2013). Regulation of miRNAs in human skeletal muscle following acute endurance exercise and short-term endurance training. *The Journal of Physiology*, 591(18), 4637-4653.
- Safdar, A., Abadi, A., Akhtar, M., Hettinga, B. P., & Tarnopolsky, M. A. (2009). miRNA in the regulation of skeletal muscle adaptation to acute endurance exercise in C57Bl/6J male mice. *PLOS ONE*, 4(5), e5610.
- Schiaffino, S., & Mammucari, C. (2011). Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skeletal Muscle*, 1(1), 4.
- Soci, U. P. R., Fernandes, T., Hashimoto, N. Y., Mota, G. F., Amadeu, M. A., Rosa, K. T., ... & Oliveira, E. M. (2011). MicroRNAs 29 are involved in the improvement of ventricular compliance promoted by aerobic exercise training in rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 43(11), 665-673.
- Sun, C. Y., She, X. M., Qin, Y., Chu, Z. B., Chen, L., Ai, L. S., ... & Hu, Y. (2013). miR-15a and miR-16 affect the angiogenesis of multiple myeloma by targeting VEGF. *Carcinogenesis*, 34(2), 426-435.
- Sun, L., Shen, W., Liu, Z., Guan, S., Liu, J., & Ding, S. (2010). Endurance exercise causes mitochondrial and oxidative stress in rat liver: effects of a combination of mitochondrial targeting nutrients. *Life Sciences*, 86(1-2), 39-44.
- Sweetman, D., Goljanek, K., Rathjen, T., Oustanina, S., Braun, T., Dalmay, T., & Munsterberg, A. (2008). Specific requirements of MRFs for the expression of muscle specific microRNAs, miR-1, miR-206 and miR-133. *Developmental Biology*, 321(2), 491-499.

- Talmadge, R. J. (2000). Myosin heavy chain isoform expression following reduced neuromuscular activity: potential regulatory mechanisms. *Muscle & Nerve*, 23(5), 661-679.
- Thum, T., Bauersachs, J. (2009). MicroRNAs in cardiac hypertrophy and failure. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 5(3-4), e279-e283.
- van Rooij, Eva, Liu, Ning, Olson, Eric N. (2008). MicroRNAs flex their muscles. *Trends in Genetics*, 24(4), 159-166.
- Williams, A. H., Liu, N., van Rooij, E., & Olson, E. N. (2009). MicroRNA control of muscle development and disease. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(3), 461-469.
- Wu, M., Falasca, M., Blough, E. R. (2011). Akt /protein kinase B in skeletal muscle physiology and pathology. *The Journal of Cellular Physiology*, 226(1), 29-36.
- Yin, H., Pasut, A., Soleimani, V. D., Bentzinger, C. F., Antoun, G., Thorn, S., Rudnicki, M. A. (2013). MicroRNA-133 controls brown adipose determination in skeletal muscle satellite cells by targeting Prdm16. *Cell Metabolism*, 17(2), 210-224.
- Yuan, J. S., Reed, A., Chen, F., Stewart, C. N., Jr. (2006). Statistical analysis of real-time PCR data. *Bioinformatics*, 7, 85.



## Abstract

**The effect of endurance training on of miR-133 and SRF gene expression in slow and fast twitch skeletal muscles of Wistar rats**Raziyeh Rezaei<sup>1</sup>, Saeed Shakeriyan<sup>2\*</sup>, Masoud Nikbakht<sup>2</sup>, Faranak Hadi<sup>3</sup>

1. Ph.D Student of Exercise Physiology, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
2. Associate Professor of Exercise Physiology, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
3. Assistant of Molecular Genetic, Lorestan university, Khoramabad, Iran.

**Background And Aim:** MicroRNA-133 and SRF is involved in various cellular processes, but the effect of endurance training on gene expression of this factors in fast and slow twitch muscles has still remained unclear. The aim of this study was to evaluate the effect of endurance training on miR-133 and SRF gene expression in fast and slow twitch muscles in male Wistar rats. **Materials and Methods:** In this study, 14 rats weighing 113±20 grams (5 weeks age) were housed under controlled conditions, after familiarization protocols they were randomly assigned into control (7 rats) and experimental (7 rats) groups. The experimental group performed 14 weeks, 6 session per week endurance training program (that gradually reached to 60 min and 30 m/min) on treadmill and 48 hours after the end of the last session, both groups were sacrificed. The soleus and EDL muscles were removed. The gene expression level of miR-133 and SRF were measured using real-time RT-PCR. Data were analysed by sample t-test. **Results:** After 14 weeks of endurance training the gene expression of miR-133 of fast twitch muscle (EDL) in experimental group significantly decreased ( $p=0.001$ ) than control group. But the miR-133 gene expression of slow twitch muscle (soleus) in experimental group was significantly increased ( $p=0.001$ ) than control group. Also miR-133 gene expression of EDL of experimental group was significantly decreased ( $p=0.001$ ) than soleus muscle of the same group; the rate of SRF gene expression of EDL of experimental group increased significantly ( $p=0.009$ ) but it did not effect on SRF gene expression in soleus. **Conclusion:** Endurance training induced differences in gene expression of miR-133 and SRF gene consistent to specification of fast and slow twitch muscles.

**Keywords:** Endurance training, Fast twitch muscle, Slow twitch muscle, SRF gene, miR-133 gene

*Journal of Practical Studies of Biosciences in Sport, vol. 6, no. 12, Fall & Winter 2018/2019*

*Received: Jan 4, 2017*

*Accepted: Apr 25, 2017*