

تأثیر ۱۴ هفته تمرین استقامتی بر بیان ژن هیستون داستیلاز ۴ بطن چپ موش‌های نر ویستار

محمد فتحی*^۱، رضا قراخانلو^۲، راضیه رضایی^۳

۱- استادیار دانشگاه لرستان

۲- دانشیار دانشگاه تربیت مدرس

۳- دانشجوی دکتری دانشگاه شهید چمران

*نشانی نویسنده مسئول: خرم آباد، دانشگاه لرستان، دانشکده علوم انسانی، گروه تربیت بدنی

Email: m_fathi723@yahoo.com

پذیرش: ۹۲/۱۲/۷

اصلاح: ۹۲/۹/۱۱

وصول: ۹۲/۸/۶

چکیده

مقدمه: فعالیت‌های استقامتی موجب هایپرتروفی قلب می‌شود ضمن اینکه هایپرتروفی قلب بر بیان ژن hdac4 تأثیر می‌گذارد هدف این پژوهش بررسی اثر تمرینات استقامتی بر بیان ژن hdac4 بطن چپ می‌باشد.

روش‌شناسی: بدین منظور ۱۴ موش (۱۱۳±۲۰ گرم) تحت شرایط کنترل شده (دما، چرخه روشنایی و تاریکی و دسترسی آزاد به آب و غذا) نگهداری و بعد از آشناسازی (۲۳۱±۲۴ گرم) به صورت تصادفی به دو گروه کنترل (۷ سر) و تجربی (۷ سر) تقسیم شدند. گروه تجربی یک برنامه (۳۰ متر در دقیقه، ۵۰ دقیقه در هر جلسه، ۶ جلسه در هفته به مدت ۱۴ هفته) استقامتی را روی تردمیل اجرا کرد و سپس ۴۸ ساعت پس از پایان آخرین جلسه تمرینی همراه با گروه کنترل بی‌هوش و تشریح شدند، سپس قلب و در ادامه بطن چپ آنها خارج و با استفاده از روش Real time-PCR میزان بیان ژن hdac4 بطن چپ آنها اندازه‌گیری شد، در پایان با استفاده از آماره t میانگین بیان ژن hdac4 گروه تجربی و کنترل ارزیابی و مقایسه شد.

یافته‌ها: شاخص‌های ارزیابی هایپرتروفی نشان داد که نسبت وزن بطن چپ به وزن بدن گروه تجربی (۲/۳) در مقایسه با گروه کنترل (۲/۰۴۹) بیشتر و در سطح P=۰/۰۵ معنی‌دار بود و نسبت وزن بطن چپ به سطح رویه بدن در گروه تجربی (۰/۱۶۸) در مقایسه با گروه کنترل (۰/۱۵۳) بیشتر و در سطح P=۰/۰۱ معنی‌دار بود. در نهایت میانگین بیان ژن hdac4 بطن چپ گروه تجربی به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود (P=۰/۰۰۲).

بحث و نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد اثر فعالیت‌های استقامتی بر هایپرتروفی بطن چپ با افزایش بیان ژن hdac4 همراه است و این افزایش احتمالاً از طریق فاکتورهای رونویسی صورت می‌گیرد که به پروموتور hdac4 متصل می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: ژن hdac4، تمرینات استقامتی، قلب، بطن چپ

مقدمه

کروماتین می‌شود و بیان ژن را سرکوب می‌کند (۲). از جمله این HDACs فاکتور HDAC4 است که جزو فاکتورهای رونویسی کلاس IIA می‌باشد و عمدتاً در هسته و سیتوپلاسم قرار دارد (۳). در اهمیت عملکرد HDAC4 باید گفت که نقش بسیار حیاتی در میوزنیک (عضلات اسکلتی و قلبی) دارد به طوری که تنظیم نامناسب فعالیت آن با هایپرتروفی قلب و

شایع‌ترین تغییرات اپی‌ژنتیک القاء‌شده به وسیله فعالیت‌های بدنی تعدیل‌های هیستونی، مانند متیلاسیون و استیلاسیون DNA است (۱) که این کار توسط هیستون‌اسیل ترانسفرازها (HATs) و هیستون‌داستیلازها (HDACs) صورت می‌گیرد. HDACs باعث فشرده‌شدن

مرگ ناگهانی همراه است (۴). HDAC4 از طریق دومنی که در پایانه C خود دارد می‌تواند گروه استیل اسیدآمینه هیستون در کروماتین‌ها را حذف کند (۵) و موجب فشردن کروماتین شود (۶)، همچنین HDAC4 رونویسی را از طریق دو تا دومن مستقل سرکوب می‌کند، نخست دومنی که متشکل است از قسمت ۲۰۸ در پایانه N و دوم دومنی که در قسمت داستیلاز قرار دارد، بعلاوه HDAC4 از طریق ناحیه‌ای کوچک در پایانه N خود با ایزوفرم C فاکتور افزایش دهنده میوسیت (MEF2C) در تعامل است (۵) و موجب سرکوب آن می‌شود (۷). Zhao و همکارانش (۲۰۰۱) نشان دادند که محل درون سلولی HDAC4 به وسیله فسفوریلاسیون‌های پی‌درپی تنظیم می‌شود، اولین رویداد به وسیله یک پروتئین کیناز شناسایی نشده کاتالیز می‌شود که موجب اتصال HDAC4 به پروتئین ۳-۳-۱۴ می‌شود و دومین رویداد شامل پروتئین کینازهای می‌شود که موجب تسریع خروج کمپلکس چپرون ۳-۳-۱۴ و HDAC4 از هسته می‌شود مانند پروتئین کیناز وابسته به کلسیم کالمودولین نوع ۴ (CaMKIV) (۸).

HDAC4 در عضله نعلی (عضله کند) در مقایسه با پهن جانی (عضله تند) نمی‌تواند تجمع یابد (۹). همچنین افزایش بیان HDAC کلاس II باعث می‌شود که بیان تارهای کند سرکوب شود (۹)، بنابراین HDACs کلاس II شکل‌گیری تارهای نوع کند و اکسیداتیو را سرکوب می‌کند که این سرکوب از طریق مهار فعالیت MEF2 (القائه کننده تارهای کند انقباض) صورت می‌گیرد زیرا دیده شده که بیان شکل فعال MEF2 در عضلات اسکلتی موش‌های ترانس ژنیک، موجب شکل‌گیری تارهای کند انقباض و افزایش استقامت آنها می‌شود و موش‌ها را قادر می‌سازد که تقریباً دو برابر بیشتر از هم‌تایان عادی خود بدونند (۱۰). بنابراین سرکوب انتخابی HDAC کلاس II در عضلات اسکلتی موجب فعال شدن فرآیندی می‌شود که به وسیله افزایش فعالیت MEF2 بهبود اجرای بدنی و مقاومت در برابر خستگی را به دنبال دارد (۹). مشخص شده که فعالیت‌های استقامتی موجب ارتقاء بافت قلب و به طبع آن عملکرد قلب می‌شود (۱۱) که بخشی از تاثیر فعالیت‌های استقامتی به صورت هایپرتروفی قلب نمود پیدا می‌کند (۱۲)، (۱۳). که در این نوع هایپرتروفی ابعاد داخلی قلب به طور متناسب با دیواره‌های قلب رشد می‌کند (۱۴) و فاکتورهای

رونویسی مانند پروتئین کیناز B (AKT) و فسفاتیدیل اینوزیتول ۳ کیناز (PI3K) درگیرند (۱۵). اما بین این نوع هایپرتروفی که آن را نوع فیزیولوژیک می‌نامند و نوع پاتولوژیک تفاوت وجود دارد که نوع اول موجب ارتقاء عملکرد قلب و نوع دیگر موجب کاهش عملکرد قلب می‌شود (۱۶). پژوهش‌ها نشان داده‌اند که در هایپرتروفی نوع پاتولوژیک قلب، برنامه بیان ژن جنینی قلب که با افزایش بیان تارهای نوع کند انقباض (تارهای نوع بتا) مشخص می‌شود فعال می‌شود (۱۷-۱۹) در صورتی که این موضوع در هایپرتروفی نوع فیزیولوژی رخ نمی‌دهد (۱۶). در این میان فاکتور سرکوب کننده HDAC4 بر هایپرتروفی قلب نیز تاثیرگذار است، به این صورت که فسفوریله شده آن به وسیله کیناز وابسته به کلسیم-کالمودولین (CaMKII) (القائه کننده میوزن) (۲۰) - به درون سیتوپلاسم رانده می‌شود و در نتیجه فرصتی است برای فعالیت MEF2 که منجر به رشد هایپرتروفیک قلب می‌شود (۲۱). هرچند محل درون سلولی HDAC4 به وسیله فسفوریلاسیون تنظیم می‌شود (۸) اما HDAC4 دارای یک جایگاه اتصالی برای CaMKII است که بر روی دیگر HDACs وجود ندارد، این یافته نشان داد که سیگنال‌های وابسته به کلسیم رشد قلب را تنظیم می‌کند (۲۱) و مشخص شده که فعالیت‌های استقامتی موجب افزایش بیان و افزایش فعالیت CaMKII می‌شود (۲۲)، یافته‌های پژوهشی نشان می‌دهد که ژن‌هایی زیادی در غیاب ژن *hdac4* در قلب افزایش می‌یابند این ژن‌ها عبارتند از؛ ژن‌های میوفیلامنت‌ها، ژن‌های که در انقباض قلب نقش دارند و همچنین ژن‌های تنظیم کننده هموستاز یون کلسیم (۴). این اطلاعات نشان می‌دهد که HDAC4 گروه‌هایی از ژن‌های ویژه که با عملکرد هایپرتروفی قلب مرتبطند را سرکوب می‌کند. حال پرسشی که مطرح است این است آیا فعالیت‌های استقامتی که موجب هایپرتروفی قلب می‌شود بر بیان ژن *hdac4* که در هایپرتروفی آن نقش موثری دارد تاثیر می‌گذارد؟ ضمن اینکه باید اذعان کرد که بیان ژن *hdac4* در عضله قلبی در اثر فعالیت‌های استقامتی کمتر مورد توجه قرار گرفته است بنابراین هدف این پژوهش بررسی تاثیر ۱۴ هفته تمرین استقامتی بر بیان ژن *hdac4* در عضله بطن چپ است.

روش شناسی

پژوهش حاضر اثر ۱۴ هفته فعالیت استقامتی را بر بیان ژن hdac4 عضله قلب را به روش تجربی ارزیابی کرد. بدین منظور ۲۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با ۵ هفته سن (113 ± 20 گرم) از انستیتو پاستور خریداری شد. برای همه آنها شرایط مناسب آزمایشگاهی (دسترسی آزاد به آب و غذا مخصوص موش، چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت، میانگین دما 22 ± 3 درجه سانتی گراد) به صورت یکسان در آزمایشگاه حیوانات تا رسیدن به سن بلوغ (۸ هفته) فراهم شد. در این مدت موش‌ها در ۴ قفس یکسان نگهداری شدند. در پایان این مرحله، میانگین و انحراف استاندارد وزن موش‌ها عبارت بود از 24 ± 231 گرم. سپس دوره آشناسازی موش‌ها با تمرینات استقامتی آغاز شد که این دوره ۱۰ (۵ جلسه) روزه برای آشنایی با دویدن روی تردمیل (۹ متر در دقیقه، ۵ دقیقه و ۴ روز در هفته) صورت گرفت. در پایان جلسات آشناسازی، موش‌ها به صورت تصادفی به ۲ گروه (۱۰ سر به عنوان گروه کنترل و ۱۰ سر دیگر به عنوان گروه تجربی) تقسیم شدند. از موش‌های گروه تجربی ۳ سر نتوانست برنامه را به پایان برسانند بنابراین تعداد نهایی موش‌ها به ۱۴ سر (۷ سر کنترل و ۷ سر تجربی) کاهش یافت.

برنامه تمرینی

با استفاده از منابع پیشین یک برنامه تمرین استقامتی برای موش‌ها طراحی شد (۲۳، ۲۴) به طوری که منجر به هایپرتروفی قلب و بطن چپ ناشی از تمرینات استقامتی شود. برنامه تمرینی (۱۴ هفته، هفته‌ای ۶ روز) گروه تجربی عبارت بود از: دویدن روی تردمیل که سرعت و شیب و زمان آن قابل برنامه‌ریزی بود و در انتهای آن یک شوکر برای جلوگیری از توقف موش‌ها تعبیه شده بود، هر جلسه با یک بخش ۵ دقیقه‌ای با سرعت ۱۲ متر در دقیقه برای گرم کردن شروع می‌شد. در جلسه اول، بخش اصلی برنامه ۱۲ دقیقه بود. به طور هفتگی مدت زمان بخش اصلی برنامه افزایش یافت؛ بدین صورت (در هفته ۱-۳ هر روز ۲ دقیقه به مدت زمان اجرای بخش اصلی برنامه اضافه می‌شد) به طوری که در پایان روز ۲۳ مدت بخش اصلی برنامه به ۵۰ دقیقه رسید که با احتساب ۵ دقیقه گرم کردن و ۵ دقیقه سرد کردن، مدت زمان کلی ۶۰ دقیقه بود. شدت تمرین با سرعت ۲۰ متر در دقیقه شروع شد. سپس

هر هفته ۲ متر بر دقیقه به سرعت اضافه شد به طوری که در پایان هفته ششم سرعت به ۳۰ متر در دقیقه رسید. در نهایت در طی هفته‌های ۷ تا ۱۰ به تدریج ۵ درجه شیب (ابتدای هر هفته تقریباً ۱/۲ درجه شیب) نیز اضافه شد. این برنامه [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 برنامه و در نهایت ۵ دقیقه دویدن با سرعت ۹ متر در دقیقه به عنوان بخش سرد کردن)] تا پایان هفته ۱۴ حفظ شد. بخش اصلی این برنامه با حدود ۷۰ درصد vo_{2max} موش‌ها اجرا شد (۲۶، ۲۵) این برنامه بین ساعات ۵ تا ۷ بعد از ظهر هر روز اعمال می‌شد.

در نهایت ۴۸ ساعت پس از پایان آخرین جلسه تمرینی موش‌ها با ترکیبی از کتامین (۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) بی‌هوش شدند. بعد از بی‌هوشی کامل (به طوری که موش به تحریک اعمال شده پاسخ ندهد)، قلب موش‌ها تحت شرایط استریل خارج و بطن چپ آنها توسط متخصص آناتومی جدا شد. بافت مورد نظر (بطن چپ) بلافاصله در میکروتیوب‌هایی با حجم ۱/۵ میلی‌لیتر با برچسب متناسب با بافت، موش و ساعت تشریح جاسازی و وارد تانک نیترژن شدند. بعد از اتمام تشریح و تا شروع هموژن بافت‌ها، همه آنها در دمای 80° - درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. با استفاده از هاون و نیترژن مایع بافت‌ها هموژن و در میکروتیوب‌هایی با حجم ۱.۵ میلی‌لیتر با برچسب مناسب نگهداری شدند.

ارزیابی هایپرتروفی بطن چپ

پژوهش‌های متعدد برای ارزیابی میزان هایپرتروفی قلب از ارزیابی نسبت وزن بطن چپ به وزن کل قلب، وزن بدن (۲۷) و سطح رویه بدن استفاده کرده‌اند (۲۸) بنابراین برای تایید میزان هایپرتروفی، در این پژوهش از دو شاخص برای نسبی کردن وزن بطن چپ (نرمال کردن) استفاده شد (جدول ۱). برای این کار، در حالت بی‌هوشی، وزن و طول بدن حیوان (از دهان تا ابتدای دم) برای محاسبه BSA اندازه‌گیری شد (۲۹). سپس قلب حیوان خارج و بطن چپ نیز جدا شد که هر دوی آنها (قلب و بطن) به طور جداگانه با دقتی تا ۴ رقم اعشار با ترازوی دیجیتال (A&D ساخت کشور ژاپن) وزن شدند. BSA موش‌ها با استفاده از فرمول زیر برآورد و برای محاسبات

مورد نظر از برنامه Excel استفاده شد.

$$BSA=6.67 \times W^{0.7} \times [0.34 / (W/L)]. \quad (29)$$

L = وزن بدن (گرم) W = طول بدن (سانتی متر)

ملاحظات اخلاقی

مجوز این پژوهش توسط کمیته اخلاق دفتر حمایت از طرح‌های پژوهشی دفتر ریاست جمهور صادر شد (شماره طرح ۹۰۰۳۷۲۴). در زمان ارائه برنامه تمرینی موش‌هایی که نمی‌توانستند دوره تمرینی را ادامه دهند کنار گذاشته شدند. در هنگام کشتن موش‌ها، مقدار مناسبی از کتامین و زایلازین تزریق شد [کتامین (۸۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن)] به طوری که موش‌ها کاملاً بی‌هوش شوند و به تحریک‌ها پاسخ ندهند، سپس تشریح شدند.

استخراج RNA از بافت

برای استخراج RNA از بافت‌های هموژن شده، به ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت داخل میکروتیوب، ۱ میلی‌لیتر تریزول (Invitrogen) اضافه شد و پس از مخلوط کردن کامل (پیتاژ کردن) به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری (انکوبه) شد، سپس ۲ میلی‌لیتر به آن کلروفرم سرد اضافه شد و پس از پیتاژ (۱۵ ثانیه) حدود ۲ تا ۳ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد، در ادامه میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ (شرکت eppendorff) شدند سپس مایع رویی به دقت برداشته شد و به یک میکروتیوب RNAase free انتقال داده شد (از این مرحله به بعد با سرسمپلر فیلتردار کار شد) سپس ۵/۵ میلی‌لیتر ایزوپروپانول سرد اضافه شد و بعد از هم زدن ملایم در دمای ۲۰- باقی ماندند (overnight). روز بعد میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۲۰۰۰ مجدداً سانتریفیوژ شدند که در این مرحله یک رسوب سفید رنگ در ته اکثر میکروتیوب‌ها قابل مشاهده بود. با سمپلر (شرکت eppendorff) مایع رویی با دقت خارج شد و ۱ میلی‌لیتر اتانول خالص سرد به آن اضافه شد و بعد از تکان دادن مختصر به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه با دور ۷۵۰۰ سانتریفیوژ شدند و در ادامه مایع رویی به دقت تخلیه شد و ۱۰ دقیقه فرصت داده شد تا باقی‌مانده اتانول تبخیر شود و داخل میکروتیوب خشک شود، بعد از این مرحله ۵۰ لاندا آب

تزریقی به هر نمونه اضافه شد و چند با به آرامی پیتاژ صورت گرفت. در پایان غلظت و نسبت جذبی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (شرکت eppendorff) ارزیابی شد که نسبت جذبی ۲۸۰/۲۶۰ نانومتر برای تمام نمونه‌ها بین ۱/۶ تا ۱/۸ بود. تمام مراحل کار زیر هودی که از قبل آماده شده بود (استریل شده با الکل ۷۵ درصد و نور UV) انجام می‌شد، غیر از مرحله‌ای که نیاز بود میکروتیوب‌های حاوی مواد، سانتریفیوژ و یا ورتکس شوند. در طی مراحل از دستکش لاتکس بدون پودر استفاده می‌شد و به محض نیاز به تعویض دستکش‌ها تعویض می‌شدند. کیت‌ها دقیقاً قبل از استفاده از یخچال ۲۰- خارج و بعد از استفاده به داخل یخچال منتقل می‌شدند. تمام سمپلرها طبق زمانبندی‌های گروه کالیبره شده بودند.

سنتز cDNA

برای رونویسی RNA به cDNA از کیت شرکت ترموساینترفیک با Cat # K1621 استفاده شد. و تمام مراحل مطابق دستورالعمل شرکت سازنده با استفاده از Random Hexamer انجام شد. ترموسایکلر مورد استفاده در این مرحله متعلق به شرکت eppendorff بود.

ارزیابی بیان ژن

قبل از ارزیابی نهایی بیان ژن طبق دستورالعمل تکنیک Real Time PCR نیاز بود که میزان کارایی ژن رفرنس (*gapdh*) و ژن هدف (*hdac4*) بررسی شود، که این کار صورت گرفت میزان کارایی برای این دو ژن در بالاترین میزان خود یعنی ۱ بود. در ادامه ارزیابی بیان ژن از تکنیک Real Time PCR و دستگاه شرکت آپلاید بایوسستم استفاده شد. سایرگرین مسترمیکس استفاده شده در این مرحله متعلق به شرکت تاکارا با Cat # RR820L بود. طبق دستورالعمل کیت و بررسی میزان کارایی ژن رفرنس و هدف، برای یک نمونه ۱۰ لاندايي ترکیبی از master mix (۵ لاندا) پرایمر (۱ لاندا)، cDNA (۱ لاندا) و آب مقطر (۳ لاندا) در نظر گرفته شد و میزان بیان ژن با استفاده از روش نسبی ارزیابی شد. در هر Run (۴۰ سیکلی) یک نمونه به عنوان کنترل منفی برای تعیین آلودگی master mix (طبق دستورالعمل شرکت آپلاید بایوسستم نباید CT آن کمتر از ۳۵ باشد) در نظر گرفته شد. و کنترل داخلی (*gapdh*)، کنترل مثبت (گروه کنترل) و *hdac4* همزمان (در یک Run) ارزیابی شد. نمونه‌ها به صورت دوتایی

طبق فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ميزان بيان *hdac4* محاسبه شد (۳۰).
 مشخصات پرايمرهاي استفاده شده در جدول ۱ آمده است. ژن
 رفرنس در اين پژوهش ژن *gapdh* مي باشد.

ارزيابي شدند. بعد از به دست آوردن CT دوتايي براي هر
 نمونه ميانگين آنها محاسبه شد. لازم به ذکر است در برخي
 موارد نياز بود که test مجدداً تکرار شود که در صورت نياز
 تست تکرار می شد. بعد از انتقال اطلاعات به نرم افزار Excel

جدول ۱. مشخصات پرايمرهاي مورد استفاده در پژوهش

name	Sequence 5-3	NCBI Reference Sequence	Product size
<i>gapdh</i>	F AACCCATCACCATCTTCCAG	NM_017008.4	74
	R CACGACATACTCAGCACCAG		
<i>hdac4</i>	F AACCTAACCTGAAATTACGGTC	NM_053449.1	137
	R ACATGCGGAGTCTGTAACATC		

بدن تايد شد که نمودار آنها در شکل ۲ و ۳ نشان داده شده
 است. شاخص هاي وزني نشان داد که وزن بدن گروه تجربي
 کمتر (غير معني دار) از گروه کنترل بود. همچنين وزن قلب و
 بطن چپ جدا شده گروه تجربي بيشتر از گروه کنترل است.
 اين شاخص ها نشان می دهد که بطن چپ موش ها گروه تجربي
 بزرگتر از گروه کنترل است به اين صورت که نسبت وزن بطن
 چپ به وزن بدن گروه تجربي (۲/۳) در مقايسه با گروه کنترل
 (۲/۰۴۹) بيشتر و در سطح $P=0/05$ معني دار بود، و نسبت وزن
 بطن چپ به BSA در گروه تجربي (۰/۱۶۸) در مقايسه با
 گروه کنترل (۰/۱۵۳) بيشتر و در سطح $P=0/01$ معني دار بود.
 و در نهايت نتايج آزمون t ($t=5/196$) نشان داد که ميانگين بيان
 ژن *hdac4* قلب گروه تجربي نسبت به گروه کنترل در اثر ۱۴
 هفته تمرين استقامتي ۱۳۴/۵ برابر افزايش می يابد که اين
 افزايش در سطح $P=0/005$ معني دار بود. (شکل ۳)

تجزيه و تحليل داده ها

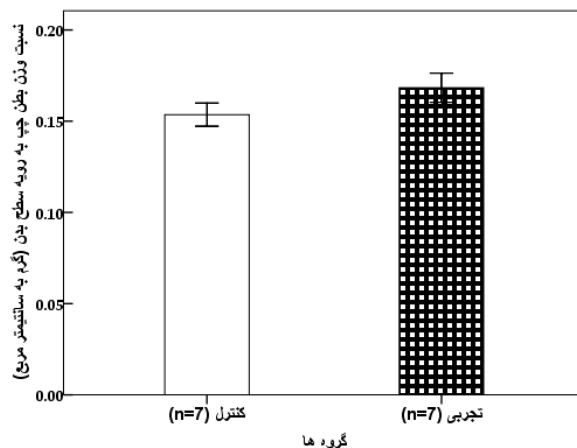
داده هاي به دست آمده از دستگاه Real Time PCR
 که به صورت CT (ميانگين CT براي هر نمونه) بودند. با
 استفاده از نرم افزار Excel به $\Delta\Delta Ct$ تبديل شدند و سپس با
 استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ اعداد نهايي به دست آمد. با انتقال
 اين اعداد به نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ ابتدا نرمال بودن توزيع
 داده ها با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk ارزيابي شد و
 مشخص شد که داده ها داراي توزيع طبيعي هستند. بعد از
 تعيين نرمال بودن، براي تعيين اختلاف ميانگين گروه تجربي از
 گروه کنترل (که عدد ۱ بود) از آزمون t تک نمونه استفاده شد.

نتايج

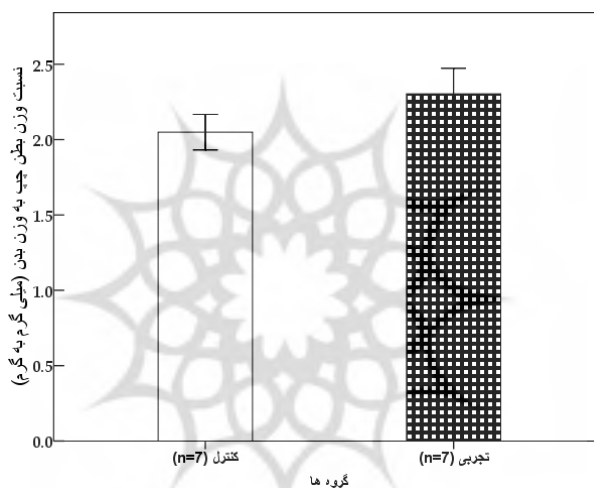
نتايج نشان داد، در اثر ۱۴ هفته تمرين استقامتي
 هايپرتروفي در بطن چپ رخ می دهد (۳۱) که اين هايپرتروفي
 توسط ارزيابي نسبت وزن بطن چپ به وزن بدن و سطح رويه

جدول ۲. توصيف شاخص هاي ارزيابي کننده هايپرتروفي بطن چپ

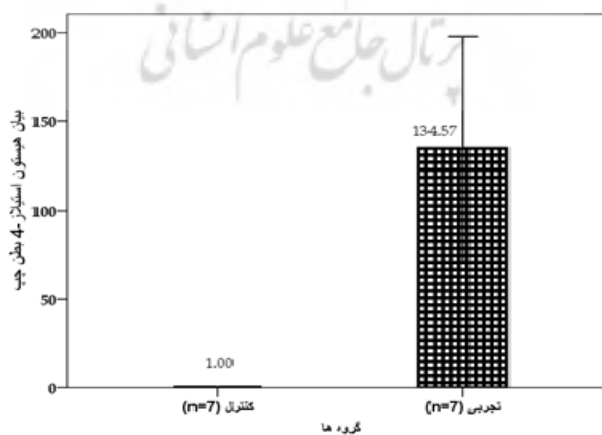
نسبت وزن		BSA		وزن		شاخص ها
بطن چپ به BSA	بطن چپ به وزن بدن	(سانتي متر مربع)	بطن چپ (گرم)	قلب (گرم)	بدن (گرم)	گروه
$\bar{X}\pm SD$	$\bar{X}\pm SD$	$\bar{X}\pm SD$	$\bar{X}\pm SD$	$\bar{X}\pm SD$	$\bar{X}\pm SD$	
$0/153\pm 0/0068$	$2/049\pm 0/127$	$481/85\pm 20$	$0/734\pm 0/045$	$1/15\pm 0/096$	$361\pm 16/8$	کنترل (n=7)
$0/168\pm 0/0086$	$2/3\pm 0/183$	$451/19\pm 22/72$	$0/759\pm 0/049$	$1/24\pm 0/06$	$331\pm 33/4$	تجربي (n=7)



شکل ۱. در ارزیابی هایپرتروفی نتایج نشان داد که نسبت وزن بطن چپ به سطح رویه بدن در موش‌هایی که تمرین استقامتی داشتند بالاتر و در سطح $P=0/01$ معنی‌داری بود



شکل ۲. نتایج نشان داد که میانگین نسبت وزن بطن چپ به وزن بدن در موش‌هایی که تمرین استقامتی داشتند بیشتر از گروه کنترل است که در سطح $P=0/05$ معنی‌دار بود و تاییدی است بر هایپرتروفی ناشی از تمرین استقامتی.



شکل ۳. تاثیر یک دوره تمرین استقامتی بر بیان ژن *hdac4* عضله قلب در گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل که نشان می‌دهد میانگین بیان این ژن در گروه تجربی نسبت به گروه کنترل تقریباً ۱۳۴ برابر افزایش داشت که در سطح $P=0/01$ معنی‌دار بود.

بحث و نتیجه گیری

در این پژوهش دیده شد که در اثر فعالیت‌های استقامتی بطن چپ دچار هایپرتروفی می‌شود که این شاخص به وسیله ارزیابی نسبت وزن بطن چپ به وزن بدن و سطح رویه بدن مشخص شد برای اولین بار بود که تغییرات ناشی از فعالیت استقامتی در بیان ژن *hdac4* در سطح بافت قلب (بطن چپ) اندازه‌گیری می‌شد که نتایج این پژوهش نشان داد میانگین بیان ژن *hdac4* گروه تجربی حدود ۱۳۴ برابر بیشتر از گروه کنترل است که این تغییر در بیان ژن با هایپرتروفی معنی‌داری بطن چپ همراه بود، باید اذعان داشت تاکنون پژوهشی که تاثیر فعالیت‌های بدنی را بر بیان ژن *hdac4* قلب اندازه‌گیری کرده باشد صورت نگرفته است. اما مشخص شده است که ژن‌هایی زیادی توسط HDAC4 در قلب مانند میوفیلامنت‌ها، ژن‌های انقباضی قلب و همچنین ژن‌های که مسئول کادکردن پروتئین‌های هموستازکننده یون کلسیم هستند یعنی تمامی عناصری که با هایپرتروفی قلب درگیرند، کنترل می‌شود (۴) همچنین بیشتر فاکتورهایی که بیان ژن زنجیره سنگین میوزین (MHC) قلب را کنترل می‌کنند با HAT و HDACs در ارتباطند، مشخص شده سرکوب ژن *hdacs* کلاس II موجب افزایش بیان ژن تارهای نوع کند در عضلات نعلی و پلانتریس می‌شود اما تاثیری بر بیان ژن تارهای نوع تند نداشت (۹). فعالیت بدنی به خصوص نوع استقامتی موجب هایپرتروفی نوع فیزیولوژیکی قلب می‌شود (۳۲، ۳۳) و رشد قلب در پاسخ به فعالیت‌های استقامتی حدود ۴۰ تا ۶۰ درصد است و هنوز دیده نشده که این رشد با عواقب نامطلوبی همراه باشد (۳۴). به نظر می‌رسد که رشد هایپرتروفی فیزیولوژیکی قلب با فعال‌سازی مسیر AKT و PI3K در ارتباط است (۳۵)، که یون کلسیم در فعال‌سازی این مسیرهای سیگنالینگ درگیر است (۱۵) احتمال دارد که فعالیت استقامتی موجب ریزش کلسیم به درون سلول‌های قلب شود و در نتیجه با فعال‌سازی مسیرهای سیگنالینگ موجب افزایش بیان ژن *hdac4* شود. اما در سطح رونویسی مشخص شده که جایگاه اتصال برای فاکتورهای رونویسی SP1 و SP3 در پروموتور ژن *hdac4* وجود دارد و بیان ژن *hdac4* به وسیله SP1 و SP3 کنترل می‌شود، به این معنی که فاکتورهای رونویسی SP1 و SP3 موجب افزایش بیان این ژن می‌شود در صورتی که

سرکوب این فاکتورهای رونویسی موجب کاهش بیان ژن *hdac4* می‌شود (۳۷). دیده شده هم فعالیت‌های انقباضی (۳۸) و هم افزایش کلسیم درون‌سلولی (۳۹) موجب افزایش بیان SP1 می‌شود، احتمال دارد فعالیت‌های استقامتی هم از طریق انقباض عضلانی و هم از طریق افزایش غلظت کلسیم درون سلولی موجب افزایش فاکتور رونویسی SP1 می‌شود و این فاکتور با اتصال به پروموتور ژن *hdac4* موجب افزایش رونویس این ژن شود. برخی یافته‌ها نشان می‌دهد که HDAC4 در حقیقت رابط بین فعالیت‌های عصبی با ماشین رونویسی عضلانی در عضلات اسکلتی است (۴۰) هرچند نتیجه ارائه شده در عضلات اسکلتی رخ داده بود اما از آنجایی که عضله قلب تحت تاثیر سیستم عصبی قرار دارد احتمالاً فعالیت‌های استقامتی از طریق افزایش فعالیت‌های عصبی موجب افزایش بیان این ژن در عضله قلب می‌شود.

پژوهشی یافت نشد که تغییرات ژن *hdac4* عضله قلب را در پی تمرینات استقامتی بررسی کند، اما برخی پژوهش‌ها پاسخ این ژن به فعالیت‌های بدنی در عضلات اسکلتی را بررسی کرده‌اند به عنوان نمونه درآموند (۲۰۰۸) نشان داد که میزان بیان پروتئین HDAC4 در عضلات اسکلتی بر اثر یک جلسه تمرین در مردان جوان و مسن به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد (۴۱) دلیل این تناقض احتمالاً ریشه در نوع عضله و یا گونه آزمودنی دارد. نکته دیگر که باید به آن اشاره کرد این است که چالش‌های متابولیکی در اثر فعالیت‌های استقامتی در قلب موجب فعال‌سازی مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با مسیرهای متابولیک می‌شود. از جمله عناصر مهم پاسخ‌گو به این چالش‌ها، فاکتور AMPK است (۴۲) که بسیاری از فرآیندهای قلبی مانند تنظیم عملکرد میتوکندریایی و خصوصیات الکتروفیزیولوژی قلب را تنظیم می‌کند (۴۳)، دیده شده که فعالیت‌های استقامتی موجب افزایش بیان زیرواحدهای AMPK در قلب (۴۴) و فعال‌سازی آن‌ها می‌شود (۴۵) همچنین AMPK موجب فسفوریله و خروج HDAC4 از هسته سلول‌ها کبد می‌شود (۴۶) هرچند ارتباط این دو در قلب به خوبی مشخص نشده است اما امکان دارد فاکتور رونویسی AMPK و ژن سرکوب کننده رونویسی ژن *hdac4* در قلب با هم در ارتباط باشند.

به طور خلاصه نتیجه این پژوهش نشان داد که فعالیت

پس‌روئوسی این ژن بعد از فعالیت‌های استقامتی را در بطن چپ بررسی کند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دفتر حمایت از طرح‌های پژوهشی ریاست جمهور انجام شد.

استقامتی به مدت ۱۴ هفته موجب افزایش بیان ژن *hdac4* در بافت بطن چپ می‌شود. به نظر می‌رسد اثر فعالیت‌های استقامتی بر هایپرتروفی بطن چپ با افزایش بیان ژن *hdac4* همراه است و این افزایش احتمالاً از طریق فاکتورهای رونویسی صورت می‌گیرد که به پروموتور *hdac4* متصل می‌شوند و موجب افزایش بیان این ژن می‌شود. اما باید اشاره کرد که این پژوهش نتوانست میزان پروتئین این ژن را اندازه‌گیری کند، بنابراین پژوهشی پیشنهاد می‌شود که تغییرات

منابع

1. Eccleston A, Cesari F, Skipper M. Transcription and epigenetics. *Nature*. 2013;502(7472):461.
2. Feng J, Fouse S, Fan G. Epigenetic regulation of neural gene expression and neuronal function. *Pediatr Res*. 2007;61(5):58-63.
3. Dressel U, Bailey PJ, Wang SC, Downes M, Evans RM, Muscat GE. A dynamic role for HDAC7 in MEF2-mediated muscle differentiation. *J Biol Chem*. 2001;276(20):17007-13.
4. Kehat I, Accornero F, Aronow BJ, Molkenin JD. Modulation of chromatin position and gene expression by HDAC4 interaction with nucleoporins. *J Cell Biol*. 2011;193(1):21-9.
5. Wang AH, Bertos NR, Vezmar M, Pelletier N, Crosato M, Heng HH, et al. HDAC4, a human histone deacetylase related to yeast HDA1, is a transcriptional corepressor. *Mol Cell Biol*. 1999;19(11):7816-27.
6. Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*. 1997;389(6649):349-52.
7. Miska EA, Karlsson C, Langley E, Nielsen SJ, Pines J, Kouzarides T. HDAC4 deacetylase associates with and represses the MEF2 transcription factor. *EMBO J*. 1999;18(18):5099-107.
8. Zhao X, Ito A, Kane CD, Liao TS, Bolger TA, Lemrow SM, et al. The modular nature of histone deacetylase HDAC4 confers phosphorylation-dependent intracellular trafficking. *J Biol Chem*. 2001;276(37):35042-8.
9. 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):2459-67.
10. Potthoff MJ, Olson EN. MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Development*. 2007;134(23):4131-40.
11. Lavie CJ, Milani RV. Cardiac rehabilitation, exercise training, and anxiety. *J Am Coll Cardiol*. 2010;56(20):1681-2.
12. Medeiros A, Oliveira EM, Gianolla R, Casarini DE, Negrao CE, Brum PC. Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37(12):1909-17.
13. Haykowsky MJ, Dressendorfer R, Taylor D, Mandic S, Humen D. Resistance training and cardiac hypertrophy: unravelling the training effect. *Sports Med*. 2002;32(13):837-49.
14. Berry JM, Naseem RH, Rothermel BA, Hill JA. Models of cardiac hypertrophy and transition to heart failure. *Drug Discovery Today: Disease Models*. 2007;4(4).
15. O'Neill BT, Kim J, Wende AR, Theobald HA, Tuinei J, Buchanan J, et al. A conserved role for phosphatidylinositol 3-kinase but not Akt signaling in mitochondrial adaptations that accompany physiological cardiac hypertrophy. *Cell Metab*. 2007;6(4):294-306.
16. Florescu M, Vinereanu A. How to differentiate athlete's heart from pathological cardiac hypertrophy. *Maedica A Journal of Clinical Medicine*. 2006;1:19-26.
17. Razeghi P, Young ME, Alcorn JL, Moravec CS, Frazier OH, Taegtmeyer H. Metabolic gene expression in fetal and failing human heart. *Circulation*. 2001;104(24):2923-31.
18. Frey N, Katus HA, Olson EN, Hill JA. Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation*. 2004;109(13):1580-9.
19. Gupta MP. Factors controlling cardiac myosin-isoform shift during hypertrophy and heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2007;43(4):388-403.

20. Lu J, McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN. Regulation of skeletal myogenesis by association of the MEF2 transcription factor with class II histone deacetylases. *Mol Cell*. 2000;6(2):233-44.
21. Backs J, Song K, Bezprozvannaya S, Chang S, Olson EN. CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest*. 2006;116(7):1853-64.
22. Rose AJ, Frosig C, Kiens B, Wojtaszewski JFP, Richter EA. Effect of endurance exercise training on Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II expression and signalling in skeletal muscle of humans. *The Journal of Physiology*. 2007;583(2):785-95.
23. Jin H, Yang R, Li W, Lu H, Ryan AM, Ogasawara AK, et al. Effects of exercise training on cardiac function, gene expression, and apoptosis in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279(6):H2994-3002.
24. 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 mitochondrial targeting nutrients. *Life Sci*. 2010;86(1-2):39-44.
25. Wisloff U, Helgerud J, Kemi OJ, Ellingsen O. Intensity-controlled treadmill running in rats: VO_{2 max} and cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280(3):H1301-10.
26. Hoydal MA, Wisloff U, Kemi OJ, Ellingsen O. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2007;14(6):753-60.
27. Zhua SS, Mab JZ, Yong YH, Niu J, Zhang JN. Left ventricular function in physiologic and pathologic hypertrophy in Sprague-Dawley rats. *Science & Sports*. 2008;23 299-305.
28. Seo JS, Lee SY, Won KJ, Kim DJ, Sohn DS, Yang KM, et al. Relationship between normal heart size and body indices in Korean. *J Korean Med Sci* 2000;15(6):641-6.
29. Farriol M, Rossell J, Schwar S. Body surface area in Sprague-Dawley rats. *J Anim Physiol a Anim Nutr*. 1997; 77 61-5.
30. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
31. Fathi M, Gharakanlou R, Abroun S, Mokhtari-Dizaji M, Rezaei R. Considerations in the evaluation of cardiac changes following endurance training in male Wistar rats. *yafteh*. 2013;15:112-23 (in Persian).
32. Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res*. 2003;92(2):139-50.
33. Eltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2001;344(23):1750-57.
34. Wang Y, Wisloff U, Kemi OJ. Animal models in the study of exercise-induced cardiac hypertrophy. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. 2010;59(5):633-44.
35. Fagard R. Athlete's heart. *Heart*. 2003;89(12):1455-61.
36. DeBosch B, Treskov I, Lupu TS, Weinheimer C, Kovacs A, Courtois M, et al. Akt1 is required for physiological cardiac growth. *Circulation*. 2006;113(17):2097-104.
37. Liu F, Pore N, Kim M, Voong KR, Dowling M, Maity A, et al. Regulation of histone deacetylase 4 expression by the SP family of transcription factors. *Mol Biol Cell*. 2006;17(2):585-97.
38. Connor MK, Irrcher I, Hood DA. Contractile activity-induced transcriptional activation of cytochrome C involves Sp1 and is proportional to mitochondrial ATP synthesis in C2C12 muscle cells. *J Biol Chem*. 2001;276(19):15898-904.
39. Freyssenet D, Irrcher I, Connor MK, Di Carlo M, Hood DA. Calcium-regulated changes in mitochondrial phenotype in skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;286(5): 1053-61.
40. Cohen TJ, Waddell DS, Barrientos T, Lu Z, Feng G, Cox GA, et al. The histone deacetylase HDAC4 connects neural activity to muscle transcriptional reprogramming. *J Biol Chem*. 2007;282(46):33752-9.
41. Drummond MJ, McCarthy JJ, Fry CS, Esser KA, Rasmussen BB. Aging differentially affects human skeletal muscle microRNA expression at rest and after an anabolic stimulus of resistance exercise and essential amino acids. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;295(6): 1333-40.
42. Hardie DG, Carling D. The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *European journal of biochemistry / FEBS*. 1997;246(2):259-73.
43. Zaha VG, Young LH. AMP-activated protein kinase regulation and biological actions in the heart. *Circ Res*. 2012;111(6):800-14.
44. Musi N, Hirshman MF, Arad M, Xing Y, Fujii N, Pomerleau J, et al. Functional role of AMP-activated protein kinase in the heart during exercise. *FEBS Lett*. 2005;579(10):2045-50.

45. Coven DL, Hu X, Cong L, Bergeron R, Shulman GI, Hardie DG, et al. Physiological role of AMP-activated protein kinase in the heart: graded activation during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;285(3): 629-36.
46. Mihaylova MM, Vasquez DS, Ravnskjaer K, Denechaud PD, Yu RT, Alvarez JG, et al. Class IIa histone deacetylases are hormone-activated regulators of FOXO and mammalian glucose homeostasis. *Cell.* 2011;145(4):607-21.



The Effect of 14-Week Endurance Training on Left Ventricle HDAC4 Gene Expression of Wistar Male Rat

Fathi M^{*1}, Gharakanlou R², Rezaei R³

1. Lorestan University

2. Tarbiat Modares University

3. PhD student Shahid Chamran University

Received: 28/10/2013

Revised: 02/12/2013

Accepted: 26/02/2014

*Correspondence:

Physical Education
Department, Humanity Faculty,
Lorestan University,
Khorramabad, Iran

E-mail:

m_fathi723@yahoo.com

Abstract

Background; Endurance training induce cardiac hypertrophy, also the cardiac hypertrophy effect on hdac4 gene expression in cardiac muscle, Therefore the aim of this study was to investigate the effect of endurance training on cardiac expression of hdac4 gene.

Material and Methods; for this purpose, 14 rats (113±20 gram) under controlled conditions (temperature, light/dark (12:12) cycle, with ad Libitum access to food and water) were housed. after familiarization (231±24) there were randomly divided into control (n=7) and Experimental (n=7) groups, the experimental group performed a training program (30 m/min, 50 min, 6 session per week for 14-weeks) on motorized treadmill, and then 48 hours after the end of the last session with control group were anesthetized as sacrificed, then the left ventricle of the heart was removed. Real time RT-PCR method was used to determine of expression levels of hdac4 gene, finally, to compare of control and experimental groups mean, t-test was use.

Results; the hypertrophy evaluation indexes showed that the ratio of left ventricle weight of experimental group (2.3) was significantly (P=0.05) more than control group (2.049) and the left ventricle weight to body surface area was significantly (p=0.01) more in experimental group (0.168) than control group (0.153). Finally the mean of left ventricle *hdac4* gene expression was significantly (P=.002) higher in experimental group than control group.

Conclusion; It seems the effect of endurance training on left ventricle accompany with increase of hdac4 gene expression and this increase induce by transcription factors that attached to hdac4 gene promoter and it increase hdac4 gene expression.

Keyword: *hdac4* gene, endurance training, heart, left ventricle