فیزیولوژی ورزشی دوره ۱۲، شماره ۴۷، پاییز ۱۳۹۹. صص ۱۶۸-۱۴۷

مقالهٔ پژوهشی

بررسی تأثیر شش هفته تمرین تناوبی شدید بر میزان بیان ژن پروتئین‌های HDAC4/5، Dch2 و مایوژنین عضلهٔ پلانتاریس رت‌های پیر نر نژاد ویستار

رضا قراخانلو[1]، مهدیه ملانوری شمسی[2]، زهره مظاهری[3]، میثم غلامعلی[4]

۱. استاد فیزیولوژی ورزشی، دانشکدهٔ علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران (نویسندهٔ مسئول)
۲. دانشیار فیزیولوژی ورزشی، دانشکدهٔ علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳. استادیار آناتومی و تشریح، دانشکدهٔ علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۴. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشکدهٔ علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۱۴

چکیده

علل نوروژنیک یکی از مهم‌ترین علل آتروفی عضلانی وابسته به سن در پدیدهٔ سارکوپنیاست؛ باوجوداین، هنوز نقش بسیاری از عوامل مؤثر احتمالی همچون انواع تمرین‌های ورزشی، به‌ویژه تمرین تناوبی شدید بر فاکتورهای مسیر آبشارگونهٔ آتروفی نوروژنیک کاملاً مبهم است؛ بنابراین، هدف از انجام‌دادن این پژوهش تعیین تأثیر یک دوره تمرین تناوبی شدید بر میزان بیان ژن پروتئین‌های HDAC4/5، Dch2 و مایوژنین عضلهٔ پلانتاریس رت‌های پیر نر نژاد ویستار بود. ۲۸ سر رت نر نژاد ویستار به‌طور تصادفی به چهار گروه شامل بالغ تمرین، بالغ کنترل، پیر تمرین و پیر کنترل تقسیم‌بندی شدند. گروه‌های تمرین به‌مدت شش هفته و هر هفته پنج جلسه تمرین تناوبی شدید را اجرا کردند. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسهٔ تمرینی، حیوانات قربانی شدند و عضلهٔ پلانتاریس استخراج شد. میزان بیان ژن پروتئین‌های HDAC4/5، Dch2 و مایوژنین با استفاده از روش Real Time PCR سنجیده شد. برای تعیین معناداربودن تفاوت بین گروه‌ها از تحلیل واریانس دوطرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. سطح معناداری نیز $P \leq 0.05$ درنظر گرفته شد. نتایج این پژوهش نشان داد که متعاقب شش هفته تمرین HIT، در عضلهٔ پلانتاریس رت‌های پیر نر نژاد ویستار میزان بیان ژن‌های HDAC4، HDAC5 و مایوژنین به‌طور معناداری کاهش یافت. میزان بیان ژن Dch2 نیز افزایش معناداری در مقایسه با گروه کنترل بالغ داشت. براساس نتایج این پژوهش، به‌نظر می‌رسد احتمالاً تمرین‌های تناوبی شدید می‌توانند تا حدود بسیار زیادی موجب سرکوب آتروفی نوروژنیک در دوران سالمندی شوند.

واژگان کلیدی: پیری، آتروفی نوروژنیک، HDAC4/5 ، Dch2، مایوژنین، تمرین تناوبی شدید.

1. Email: Ghara_re@modares.ac.ir
2. Email: Molanouri_m@moadares.ac.ir
3. Email: Mazaheri_z@modares.ac.ir
4. Email: M.Gholamali1987@gmail.com

مقدمه

مطالعات بسیاری نشان می‌دهند که سالمندی همراه با کاهش تعداد تارهای عضلانی، آتروفی تارهای باقی‌مانده، افزایش در تراکم بافت‌های غیرانقباضی و متعاقب آن، کاهش در توده و عملکرد عضلات اسکلتی است؛ فرایندی که به آن «سارکوپنیا» گفته می‌شود (۲، ۱). شواهد بسیاری نشان می‌دهند که یکی از علل اصلی ایجادکنندهٔ سارکوپنیا، ازدست‌رفتن نورون‌های حرکتی است که تارهای عضلانی را عصب‌دهی می‌کنند. ازدست‌رفتن نورون‌های حرکتی (به‌ویژه در تارهای تند)، برای اولین بار در پژوهشی که به تغییرات در مورفولوژی صفحهٔ انتهایی پیوندگاه عصبی-عضلانی[1] (NMJ) در دوران سالمندی پرداخته بود، نشان داده شد. مطالعات گوناگون علل و ابعاد متفاوتی را در آتروفی ناشی از کاهش موتونورون‌های واحدهای حرکتی تند انقباض ناشی از افزایش سن بررسی و تبیین کرده‌اند، اما براساس بررسی‌هایی که به‌تازگی شده است، مهم‌ترین علت آتروفی در این تارها در پیری را می‌توان معکوس‌شدن مسیرهای سیگنالینگ درون‌سلولی مسئول هایپرتروفی در شرایط کاهش و قطع عصب‌دهی (کاهش موترونورون‌ها)، در مقایسه با شرایط عصب‌دهی نرمال دانست (۴، ۳)؛ به‌طوری‌که به‌نظر می‌رسد با کاهش و قطع عصب‌دهی تارهای تند انقباض ناشی از پیری، مهم‌ترین مسیر سیگنالینگ مسئول هایپرتروفی یعنی HDAC4/5[2]-Dch2[3]-Myogenin روندی معکوس در پیش می‌گیرد و موجب ایجاد آتروفی و تحلیل تارهای تند انقباض (آتروفی نوروژنیک) و درنهایت، کاهش تعداد و سطح مقطع این سلول‌ها و متعاقب آن، ایجاد پدیدهٔ سارکوپنیا می‌شود؛ بدین صورت که روند معکوس این مسیر سیگنالینگ از طریق افزایش بیان و میزان پروتئین‌های آتروفیک MuRF1[4] و آتروژین-۱[5] موجب شروع و تشدید آتروفی عضلانی می‌شود (۵، ۳).

از طرفی، مایوژنین یک فاکتور نسخه‌برداری bHLH[6] و بسیار ضروری در روند توسعهٔ عضلانی است (۶، ۴). مطالعات نشان داده‌اند که میزان بیان این فاکتور از عضلهٔ اسکلتی بعد از تولد کاهش چشمگیری می‌یابد (۶)، اما در پاسخ به کاهش و قطع عصب سلول‌های عضلانی روندی افزایشی در پیش خواهد گرفت و موجب افزایش بیان گیرنده‌های استیل کولین، برخی از اجزای سیناپس عصب و عضله و درنهایت لیگازهای یوبیکیوتین E3 مختص عضله یعنی MuRF1 (که Trim63[7] نیز نامیده

1. Neuromuscular Junction (NMJ)
2. Histone Deacetylase 4/5 (HDAC4/5)
3. Dachshund2 (Dch2)
4. Muscle Ring-Finger Protein-1 (MuRF1)
5. Atrogin-1
6. Basic Helix-Loop-Helix (bHLH)
7. Tripartite Motif Containing 63 (Trim63)

می‌شود) و آتروژین-یک (که MAFbx[1] یا Fbxo نیز نامیده می‌شود) خواهد شد (۷). مطالعات بیوشیمیایی نشان داده‌اند که مایوژنین با اتصال به مناطق تسریع‌کنندهٔ این لیگازها موجب ایجاد روند آتروفی عضلانی در شرایطی همچون پیری می‌شود که عصب‌دهی سلول عضلانی ضعیف یا قطع شده است (۸، ۷). ازسوی‌دیگر، نشان داده شده است که در همین شرایط داستیلازهای هیستون (HDACs) چهار و پنج، موجب تنظیم افزایشی بیان مایوژنین از طریق افزایش بیان Dch2 می‌شوند (۹). Dch2 در شرایط عصب‌دهی طبیعی موجب ممانعت از بیان مایوژنین می‌شود، اما در شرایطی که عصب‌دهی سلول عضلانی دچار کاهش یا قطع‌شدگی شده باشد (همچون شرایطی که در پیری و افزایش سن برای سلول عضلانی به‌وجود می‌آید)، موجب تنظیم افزایشی مایوژنین می‌شود (۱۰)؛ بدین صورت که Dach2 با اتصال به منطقهٔ تسریع‌کنندهٔ MEF3 [2] مایوژنین که حاوی پروتئین‌های Six/Eay است، موجب تسریع در روند افزایشی بیان مایوژنین می‌شود (۱۱، ۱۰).

بنابراین به‌نظر می‌رسد مهم‌ترین مسیر سیگنالینگ مسئول آتروفی نوروژنیک در تارهای تند انقباض که در شرایطی همچون سالمندی طبیعی (۱۲) یا سالمندی همراه با اختلالات فیزیولوژیک در سیستم عصب‌دهی تارهای عضلانی که موجب کاهش یا قطع‌شدگی عصب‌دهی این نوع از سلول‌های عضلانی می‌شود (۱۳)، مسیر سیگنالینگ HDAC4/5-Dch2-Moyogenin است (۱۱، ۳)؛ به‌طوری‌که نشان داده شده است در سالمندی طبیعی یا سالمندی همراه با اختلالات پاتولوژیک در سیستم عصب‌دهی تارهای عضلانی، آتروفی نوروژنیک ناشی از تغییرات در مسیر آبشارگونهٔ HDAC4/5-Dch2-Moyogenin یکی از علل اولیه و اصلی آتروفی انواع تارهای عضلانی و به‌ویژه تارهای عضلانی تندانقباض است (۱۴، ۱۲). در همین راستا، چن[3] و همکاران (۱۵) نشان دادند که در موش‌های بالغ که توانایی بیان ژن مایوژنین در آن‌ها سلب شده بود، در مقایسه با گروه کنترل، هیچ‌گونه تنظیم افزایشی در میزان لیگازهای یوبیکیوتین E3 و آتروژین-یک وجود نداشت و این موش‌ها به آتروفی نوروژنیک در مقایسه با گروه کنترل بسیار مقاوم‌تر بودند.

ازسوی‌دیگر، مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که فعالیت‌ها و تمرین‌های ورزشی می‌توانند یک مکانیسم محافظتی غیرتهاجمی و غیرفارماکولوژیک را در برابر بیماری‌ها و ناتوانی‌های عصبی-عضلانی ایجاد کنند که بر حفظ عملکرد و ساختار سیناپس و عضلات اسکلتی تأثیر بسزایی دارند (۱۷، ۱۶، ۱۱)، اما با وجود اهمیت بسیار زیاد فعالیت بدنی و تمرین‌های ورزشی در این مقوله، پژوهش‌های انگشت‌شماری در زمینهٔ تأثیر انواع فعالیت و تمرین‌های ورزشی بر میزان بیومارکرها و نشانگان مسیرهای آبشارگونهٔ برخی از اختلالات عصبی-عضلانی همچون آتروفی نوروژنیک، سارکوپنیا و کاچکسیا در افراد سالمند

1. Muscle Atrophy F-box (MAFbx)
2. Myocyte Enhancer Factor-3 (MEF3)
3. Chen

انجام شده‌اند؛ ازاین‌رو، هنوز مکانیسم دقیق تأثیرداشتن یا تأثیرنداشتن انواع فعالیت بدنی و تمرین‌های ورزشی بر بسیاری از این اختلالات (به‌ویژه در سلول‌های تندانقباض که درمعرض بیشترین میزان تحلیل و آتروفی هستند)، کاملاً روشن و مشخص نیست (۱۵، ۱۱).

در همین راستا، بوم-چول[1] و همکاران (۱۸) نشان دادند متعاقب شش هفته تمرین ورزشی شامل دویدن روی تردمیل با سرعت ۲۰ متر بر دقیقه و با شیب صفر و به‌مدت ۳۰ دقیقه که به‌طور تصاعدی افزایش می‌یافت، قطر تارهای نوع دوم عضلهٔ نعلی در موش‌های Sprague-Dawley که قطع عصب شده بودند، در مقایسه با گروهی که قطع عصب شده بودند اما غیرفعال بودند، افزایش معناداری یافت؛ هرچند به‌دلیل ارزیابی‌نشدن و اندازه‌گیری‌نشدن بیومارکرهای مرتبط، مکانیسم و علت این افزایش در پژوهش چول و همکاران بدون پاسخ ماند. مک‌فارسن[2] و همکاران (۷) نیز نشان دادند متعاقب تمرین‌های تحریک الکتریکی، میزان بیان ژن مایوژنین و ژن‌های آتروفی (آتروژین-یک و MuRF-1) در عضلهٔ EDL[3] دچار کاهش شد. در پژوهش آن‌ها به‌منظور بدون عصب‌کردن، یک تکهٔ کوچک از عصب سیاتیک از نقطهٔ میانی ران موش‌ها برش داده شد.

با وجود مطالبی که دربارهٔ نقش و تأثیر فعالیت و تمرین‌های ورزشی بر میزان برخی از عوامل سیگنالینگ درگیر در آتروفی عضلانی در افراد سالمند بیان شد، هنوز نقش برخی از انواع فعالیت‌ها و تمرین‌های ورزشی همچون تمرین‌های شدید ورزشی که به‌نظر می‌رسد می‌توانند در جلوگیری از آتروفی عضلانی نوروژنیک (به‌ویژه در تارهای تند انقباض) نقش داشته باشد (۱۹)، در مهم‌ترین بیومارکرهای مسیرهای سیگنالینگ که در روند شروع و توسعهٔ آتروفی نوروژنیک -که بر سارکوپنیا و سپس کاچکسیا مقدم است- کاملاً ناشناخته است. ازسوی‌دیگر، به‌نظر می‌رسد لازمهٔ فراخوانی و به‌کارگیری تارهای عضلانی تندانقباض، استفاده از یک محرک تمرینی با شدت زیاد است (۲۰)؛ به‌طوری‌که در بسیاری از پژوهش‌های بنیادین که به‌منظور اعمال تغییرات ساختاری و بیولوژیک در تارهای تندانقباض طراحی شده‌اند، از شدت‌های رو به افزایش فعالیت و تمرین ورزشی استفاده شده است (۲۱-۲۳)؛ ازاین‌رو، به‌نظر می‌رسد اعمال یک محرک تمرینی با شدت زیاد می‌تواند بر بیومارکرهای مختلف مسیر آبشارگونهٔ آتروفی نوروژنیک در عضلات تندانقباض تأثیرگذار باشد (۲۴). یک نوع از این تمرین‌ها، تمرین‌های تناوبی شدید[4] (HIT) است که می‌تواند بیشترین میزان فراخوانی و به‌کارگیری را در تارهای عضلانی تندانقباض ایجاد کند (۲۶، ۲۵، ۲۱)؛ هرچند نوع و میزان اثرگذاری این نوع تمرین‌های ورزشی بر میزان مهم‌ترین مارکرهای بیوشیمیایی مسیر سیگنالینگ آبشاری

1. Bum-Chul
2. Macpherson
3. Extensor Digitorum Longus (EDL)
4. Heavy Interval Intensive Training (HIT)

مسئول آتروفی نوروژنیک در سلول‌های عضلانی تندانقباض کاملاً ناشناخته، مبهم و بدون پاسخ است؛ بنابراین، با توجه به این شکاف بزرگ پژوهش، این پژوهش با هدف تعیین تأثیر یک دوره تمرین تناوبی شدید بر میزان بیان ژن پروتئین‌های مایوژنین، HDAC4/5، Dch2 تارهای تندانقباض رت‌های پیر نر نژاد ویستار انجام شد.

روش پژوهش

پژوهش حاضر از نوع توسعه‌ای و روش تجربی است. در این پژوهش، ۲۸ سر رت نر صحرایی نژاد ویستار (تهیه‌شده از انیستیتو واکسن‌سازی رازی) مطالعه شدند. ۱۴ رت چهار تا شش ماهه با میانگین وزنی ۲۵ ± ۲۵۷ گرم به‌عنوان گروه بالغ بودند و ۱۴ رت ۲۴ تا ۲۶ ماهه با میانگین وزنی ۳۲ ± ۳۷۵ گرم به‌عنوان گروه پیر بودند. رت‌های هر دو گروه پیر و بالغ به‌صورت تصادفی در دو گروه تمرین (تعداد = هفت) و بدون تمرین (تعداد = هفت) قرار گرفتند. رت‌های پیر از دو سال پیش از شروع پژوهش، پس از خریداری از انستیتو رازی در آزمایشگاه حیوانات دانشکدهٔ پزشکی دانشگاه تربیت مدرس طبق شرایط استاندارد نگهداری شدند تا به سن مدنظر برای پژوهش برسند. در مدت دورهٔ اجرای برنامهٔ تمرینی دو رت صحرایی از گروه تمرین بالغ و یک رت صحرایی از گروه تمرین پیر از مطالعه خارج شدند و در انتها پنج سر رت صحرایی از هر گروه برای انجام‌شدن آزمایش‌های سلولی و مولکولی و هیستوشیمیایی قربانی شدند.

رت‌ها در آزمایشگاه حیوانات دانشکدهٔ پزشکی دانشگاه تربیت مدرس در اتاقی به ابعاد ۱/۶۰ در ۲/۲۰ متر در شرایط کنترل‌شدهٔ نور (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، شروع روشنایی ۷ صبح و شروع خاموشی ۷ عصر)، دما (۳ ± ۲۲ سانتی‌گراد) و رطوبت حدود ۴۵ درصد نگهداری شدند. تمامی اصول اخلاقی پژوهش براساس اصول و قوانین کمیتهٔ اخلاق در پژوهش روی حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه تربیت مدرس تهران رعایت شد. سه سر رت در قفس‌هایی از جنس پلاستیکی با درب توری و به ابعاد ۲۵ × ۲۷ × ۴۳ به‌گونه‌ای نگهداری شدند که آزادانه به آب و غذای استاندارد (پلت) دسترسی داشته باشند. غذای فشردهٔ رت (پلت) دارای موادی مانند کنجالهٔ سویا، ذرت، سبوس گندم، پودر ماهی، محتوی پروتئین خالص (۲۲ درصد)، چربی (دو درصد)، فیبر (۳/۳ درصد) و مقادیر کافی ویتامین‌ها، کلرید سدیم، کربنات کلسیم و فسفات کلسیم تهیه‌شده از شرکت پارس‌دانهٔ کرمانشاه بود. پس از یک هفته آشناسازی و سازگاری حیوانات با محیط جدید، رت‌ها به‌طور تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند: گروه بالغ تمرین (چهار تا شش ماهه) و گروه پیر تمرین (۲۴ تا ۲۶ ماهه) هرکدام شامل هفت سر رت ویستار بودند که به‌مدت شش هفته و هر هفته پنج جلسه تمرین تناوبی شدید انجام دادند و ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسهٔ تمرینی قربانی شدند. طول دورهٔ تمرین با توجه به

تأثیرگذارتربودن تمرین چهارهفته‌ای در مقایسه با تمرین دوهفته‌ای (۲۷) و کمتربودن ظرفیت سازگاری در پیری (۲۹، ۲۸) شش هفته درنظر گرفته شد. در ابتدا رت‌ها با استفاده از ترکیب زایلازین و کتامین بیهوش شدند و سپس عضلهٔ پلانتاریس استخراج شد و عضلهٔ پای راست در فرمالین ۱۰ درصد برای برش‌زدن و آزمایش‌های ایمونوهیستوشیمیایی قرار داده شد و عضلهٔ پای چپ بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد شد و سپس تا انجام‌شدن آزمایش‌های مولکولی در فریزر ۸۰c- منجمد و نگهداری شد. همچنین گروهای بالغ و پیر بدون تمرین، هرکدام شامل هفت سر رت ویستار چهار تا شش ماهه بودند که هیچ‌گونه فعالیت ورزشی انجام نمی‌دادند و هم‌زمان با گروه اول قربانی شدند و همهٔ مراحل و آزمایش‌ها مطابق با دیگر گروه‌ها روی آن‌ها انجام شد.

در ابتدای پژوهش موش‌ها به‌منظور کاهش استرس و همچنین آشنایی با دویدن روی تردمیل، در یک برنامهٔ تمرینی به‌مدت دو هفته با سرعت ۱۰ تا ۱۸ متر در دقیقه و مدت زمان ۱۰ دقیقه شرکت کردند. سپس ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسهٔ آشناسازی، آزمون ورزشی فزاینده تا مرز خستگی را اجرا کردند که با سرعت ده متر بر دقیقه شروع شد و به‌ازای هر سه دقیقه، سه متر بر سرعت آن افزوده می‌شد (۳۰). زمان رسیدن به خستگی با توانایی‌نداشتن موش‌ها در دویدن روی تردمیل با وجود ایجاد محرک‌های مختلف مشخص می‌شد. پس از مشخص‌شدن سرعت حداکثر، موش‌ها در یک برنامهٔ تمرینی شش‌هفته‌ای شرکت کردند (۳۰). تمرین تناوبی شدید براساس سرعت حداکثر به‌دست‌آمده طراحی شد و به‌مدت شش هفته و پنج جلسه در هفته بر گروه‌های تمرینی اعمال شد. در ابتدا تمرین تناوبی با شدتی برابر با ۸۰ درصد حداکثر سرعت آزمون وامانده‌ساز شروع شد و در هفتهٔ دوم نیز همین شدت حفظ شد. در هفتهٔ سوم، شدت تمرین به ۹۰ درصد حداکثر سرعت افزایش یافت و در سه هفتهٔ پایانی در شدت ۱۰۰ درصد سرعت حداکثر ادامه یافت. هر تناوب شامل دو دقیقه فعالیت با فواصل استراحتی فعال دو دقیقه‌ای همراه بود. شدت فعالیت در تناوب‌های آهسته بین ۶۰- ۵۰ درصد حداکثر سرعت آزمون وامانده‌ساز درنظر گرفته شد. هفتهٔ اول شامل پنج مرحلهٔ تمرینی بود که در سه هفتهٔ پایانی به هشت مرحله رسید. همچنین در پایان هفته‌های دوم و چهارم آزمون وامانده‌ساز دوباره انجام شد و سرعت دویدن روی تردمیل براساس مقادیر جدید آزمون تعیین شد.

برای استخراج RNA و سنتز cDNA حدود ۵۰ میلی‌گرم بافت عضله به‌صورت جداگانه برای استخراج total RNA به نسبت یک به ۱۰ در QIAzol Lysis Reagent هموژن شد. به‌منظور برداشتن اجزای پروتئینی، محصول حاصل در چهار ^{0} ۴ سانتیگراد، ۱۰دقیقه، ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس به نسبت یک به ۰/۵ با کلروفرم مخلوط شد و به‌مدت ۱۵ ثانیه به‌شدت تکان داده شد. محصول در چهار ^{0}۴ سانتیگراد، ۱۵ دقیقه، ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و بخش معدنی و آبی از هم جدا شد. بخش محتوی RNA برداشته شد، با نسبت یک به ۰/۵ با ایزوپروپانول مخلوط شد، به مدت

۱۰ دقیقه در دمای اتاق رها شد و سپس در چهار ^{0}۴ سانتیگراد، ۱۰دقیقه، ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. Pellet حاوی RNA در اتانول شست‌وشو و در Lµ20 آب RNAS-Free شد. غلظت RNA سنجیده شد (Eppendorff, Germany) و نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ به‌عنوان تخلیص مطلوب تعریف شد. سنتز cDNA با استفاده از gµ1 از RNA و با استفاده از Random hexamer primer و آنزیم transcriptase Mmulv Reverse انجام شد.

برای اندازه‌گیری سطوح بیان ژن‌های HDAC4/5, Dch2 و myog از روش کمّی ریل-تایم پی سی آر[1] با استفاده از Primix syber green II استفاده شد (Applied Biosystems, USA). مخلوط واکنش در حجم نهایی Lµ20 و هر واکنش به‌صورت duplicate صورت پذیرفت. طراحی پرایمرها براساس اطلاعات ژن‌های مدنظر در بانک ژنی NBCI و توسط شرکت ماکرو ژن[2] انجام شد. توالی پرایمر ژن HDAC(5’TGTCACCGCCAGATGT)،ژنHDAC5(5’GCAGAGGTTGAATGTGAGCA3’) (TTTG3’)، ژنDch2(5’CAGCAAGAAAAGAAGGAACTAC3’) و ژن مایوژنین (5’CCAGTACATTGAGCACCTAC3’) تعیین شد. ضمن اینکه از GAPDH به‌عنوان ژن کنترل استفاده شد. برنامهٔ دمایی استفاده‌شده در ریل-تایم پی سی آر شامل ۹۵ به‌مدت ۱۰ دقیقه، ۹۵ به‌مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ به‌مدت یک دقیقه (تکرار ۴۰ سیکل) بود. میزان بیان ژن‌های مدنظر نیز با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ اندازه‌گیری شد.

تمامی داده‌ها براساس میانگین ± انحراف استاندارد توصیف شدند. برای تعیین طبیعی‌بودن توزیع داده‌ها از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف استفاده شد و به‌منظور بررسی همسان‌بودن واریانس‌ها آزمون لون[3] به‌کار برده شد. برای تعیین معنادار بودن تفاوت بین گروه‌ها از تحلیل واریانس دوطرفه و آزمون تعقیبی توکی[4] استفاده شد. همچنین برای بررسی میزان همبستگی بین متغیرها از آزمون همبستگی پیرسون[5] استفاده شد. سطح معناداری نیز $P \leq 0.05$ درنظر گرفته شد. همهٔ بررسی‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار اس.پی.اس.اس.[6] نسخهٔ ۲۰ انجام شد.

1. Real time-PCR
2. Macrogen Inc, Seoul, Korea
3. Leven
4. Tukey
5. Pierson
6. SPSS

نتایج

تغییرات تودۀ بدنی در قبل و بعد از تمرین در جدول‌های شماره‌های یک تا چهار نشان داده شده است. در شروع مطالعه رت‌های پیر وزن بیشتری در مقایسه با گروه‌های بالغ داشتند و به لحاظ آماری این تفاوت معنادار بود (P=0.001). علاوه‌براین، تفاوت معناداری بین تودۀ بدنی اولیۀ گروه بالغ کنترل با گروه بالغ تمرین (P=0.654) و همچنین گروه پیر کنترل با گروه پیر تمرین (P=0.307) مشاهده نشد. در پایان شش هفته، وزن هر دو گروه‌های بالغ در مقایسه با وزن آن‌ها در شروع آزمون به‌طور معناداری افزایش یافته بود (P=0.001)، اما وزن گروه‌های پیر کنترل و پیر تمرین به‌ترتیب کاهش و افزایش یافت؛ هر چند به لحاظ آماری این تغییرات معنادار نبود (به‌ترتیب P=0.645؛ P=0.843). علاوه‌براین، مقایسۀ بین‌گروهی وزن نهایی رت‌ها نشان داد وزن گروه بالغ تمرین به‌طور معناداری از وزن گروه بالغ کنترل بیشتر بود (P=0.021). علاوه‌براین، تمرین تناوبی شدید بر تودۀ بدنی رت‌های پیر اثر معناداری داشت (P=0.001).

جدول۱- مقادیر تغییرات توده بدنی در گروه‌های پژوهش

Table 1- Body Composition Indicators in the Research Groups

گروه Group	پیش‌آزمون Pre-Test	پس‌آزمون Post-Test	مقدار پی P Value	
			درون‌گروهی	بین‌گروهی
بالغ کنترل Adult Control Group	314.15±17.63	370.23±18.52	0.001	0.021
بالغ تمرین Adult Training Group	299.82±10.54	347.03±17.15	0.001	
پیر کنترل Old Control Group	386.02±9.55	379.52±23.71	0.645	0.001
پیر تمرین Old Training Group	407.23±11.51	409.98±22	0.834	

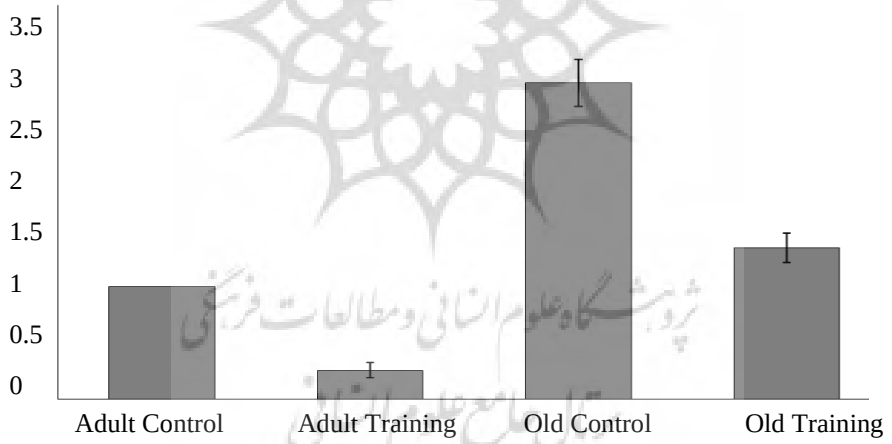
پیش از شروع برنام تمرینی و در پایان هفته‌های دوم و چهارم، به‌منظور تعیین سرعت دویدن رت‌ها روی تردمیل، آزمون سرعت حداکثر براساس روش اشاره‌شده در بخش روش پژوهش انجام شد. نتایج سرعت حداکثر به‌دست‌آمده در گروه‌های پژوهش به‌طور میانگین در جدول شمارۀ دو گزارش شده است.

جدول ۲- نتایج سرعت حداکثر در گروه‌های پژوهش

Table 2- Results of the Maximum Speed in the Research Groups

گروه Group	سرعت حداکثر (متر در دقیقه) Maximum Speed		
	پیش از دورهٔ تمرینی Before of the Training Period	پایان هفتهٔ دوم End of the Week 2	پایان هفتهٔ چهارم End of Week 4
بالغ Adult	32	36	41
پیر Aged	26	29	33

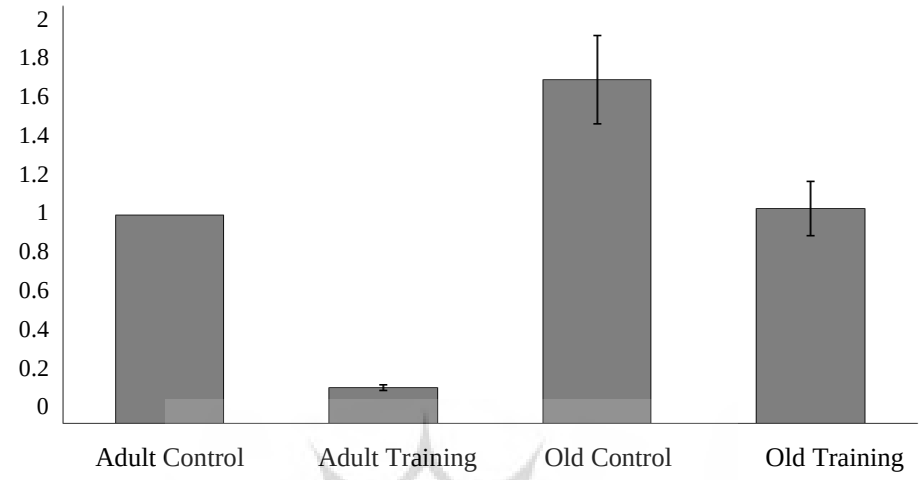
نتایج این پژوهش نشان داد که میزان بیان ژن HDAC4 در عضلهٔ پلانتاریس رت‌های پیر به‌طور معناداری از رت‌های بالغ بیشتر است. اما شش هفته تمرین تناوبی شدید به‌طور معناداری بیان آن را در عضلهٔ پلانتاریس هر دوگروه رت‌های بالغ ($P = 0.001$) و پیر نر نژاد ویستار ($P = 0.001$) کاهش داده است (شکل شمارهٔ یک).



شکل۱- تغییرات میزان بیان ژن HDAC4 در گروه های مختلف

Figure 1- Changes of the HDAC4 Gene Expression in the Research Groups

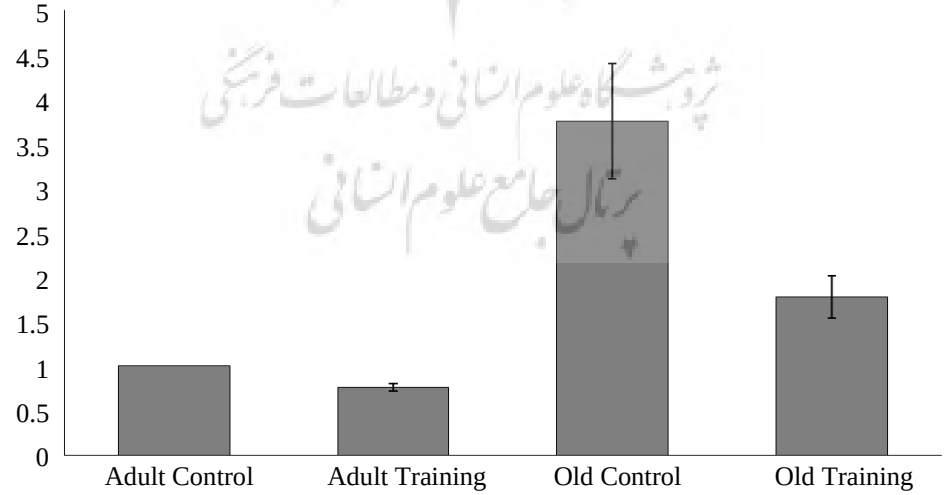
نتایج این پژوهش نشان داد میزان بیان ژن HDAC5 به‌طور معناداری در عضلهٔ پلانتاریس رت‌های پیر از رت‌های بالغ بیشتر است ($P = 0.001$)، اما شش هفته تمرین تناوبی شدید به‌طور معناداری بیان آن را در عضلهٔ پلانتاریس هر دو گروه رت‌های بالغ ($P = 0.001$) و پیر نر نژاد ویستار ($P = 0.001$) کاهش داده است و این کاهش در گروه‌های پیر بیشتر از بالغ بود (شکل شمارهٔ دو).



شکل ۲- تغییرات میزان بیان ژن HDAC5 در گروه های مختلف

Figure 2- Changes of the HDAC5 Gene Expression in the Research Groups

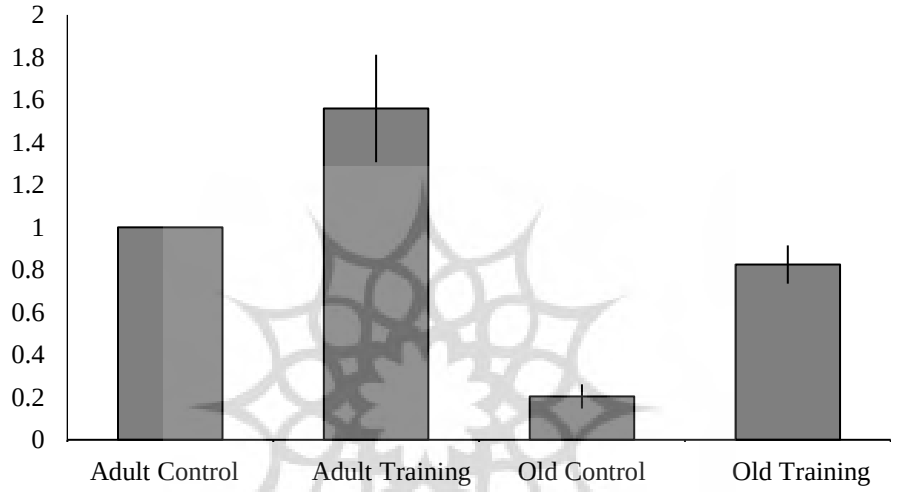
همان‌طورکه در شکل شمارهٔ سه نشان داده شده است، میزان بیان ژن Dach2 به‌طور معناداری در عضلهٔ پلانتاریس رت‌های پیر در مقایسه با رت‌های بالغ بیشتر است (P = 0.001)، اما شش هفته تمرین تناوبی شدید به‌طور معناداری بیان آن را در عضلهٔ پلانتاریس رت‌های پیر نر نژاد ویستار کاهش داده است (P = 0.001). هـمچنین شش هـفته تمـرین تناوبی شدید بیان این ژن را در گروه‌های بالغ به‌طور غیرمعناداری کاهش داده است (P = 0.098) (شکل شمارهٔ سه).



شکل ۳- تغییرات میزان بیان ژن Dch2 در گروه های مختلف

Figure 3- Changes of the Dch2 Gene Expression in the Research Groups

همان‌طورکه در شکل شمارهٔ چهار نشان داده شده است، میزان بیان ژن مایوژنین به‌طور معناداری در عضلهٔ پلانتاریس رت‌های پیر در مقایسه با رت‌های بالغ کاهش یافته است (P = 0.001)، اما شش هفته تمرین تناوبی شدید به‌طور معناداری بیان آن را در عضلهٔ پلانتاریس هر دو گروه رت‌های بالغ (P = 0.007) و پیر نر نژاد (P = 0.016) ویستار افزایش داده است (شکل شمارهٔ چهار).



شکل ۴- تغییرات میزان بیان ژن مایوژنین در گروه های مختلف

Figure 4- Changes of the Myogenin Gene Expression in the Research Groups

بحث و نتیجه‌گیری

این پژوهش با هدف بررسی تأثیر یک دوره تمرین HIT بر میزان بیان HDAC4/5، Dch2 و مایوژنین در عضلهٔ پلانتاریس رت‌های پیر نر نژاد ویستار انجام شد. نتایج نشان داد که میزان بیان HDAC4 و HDAC5 در عضلهٔ پلانتاریس رت‌های پیر گروه کنترل در مقایسه با رت‌های بالغ به‌طور معناداری بیشتر است. به‌نظر می‌رسد اختلال در رهایش کلسیم از جایگاه‌های درون‌سلولی یکی از مهم‌ترین علل احتمالی افزایش میزان بیان HDAC4 و HDAC5 در سلول‌های عضلانی متناسب با افزایش سن است (وضعیتی که در آن عصب‌دهی تارهای عضلانی به‌دلیل افزایش سن دچار نقص، کاهش یا انسداد می‌شود) (۳۱). ازسوی‌دیگر، مسیرهای سیگنالینگی که به رهایش کلسیم درون‌سلولی و متعاقب آن انقباض درون‌سلولی به‌شدت حساس هستند (PI3K و AKT) فعال می‌شوند (۳۲). در پروموتر ژن HDAC4 و HDAC5 جایگاه‌هایی اتصالی وجود دارند (SP1 و SP3) که در سطح رونویسی به‌شدت به برخی از فاکتورهای رونویسی همچون AKT و PI3K حساس‌اند (۳۳). درواقع، SP1 و SP3 از

اصلی‌ترین تنظیم‌کننده‌های نهایی میزان بیان HDAC4 و HDAC5 هستند؛ یعنی تنظیم افزایشی SP1 و SP3 موجب افزایش بیان HDAC4 و HDAC5 می‌شود و سرکوب بیان SP1 و SP3 موجب کاهش شدید بیان HDAC4 و HDAC5 خواهد شد (۳۴، ۱۱)؛ ازاین‌رو، احتمالاً یکی از مهم‌ترین علل زیادبودن میزان بیان HDAC4 و HDAC5 در عضلهٔ پلانتاریس رت‌های کنترل پیر در مقایسه با رت‌های بالغ، ناشی از سرازیرشدن نامناسب کلسیم به درون سلول از جایگاه‌های درون‌سلولی، اختلال در عملکرد مسیرهای سیگنالینگ مرتبط و درنهایت تنظیم افزایشی SP1 و SP3 باشد (۱۱).

نتایج این پژوهش نشان داد یک دورهٔ شش‌هفته‌ای تمرین HIT موجب کاهش معناداری در میزان بیان ژن پروتئین‌های HDAC4 و HDAC5 در عضلهٔ پلانتاریس رت‌های پیر و بالغ نر نژاد ویستار می‌شود. این یافته با نتایج پژوهش پوتوف[1] و همکاران (۳۵) همسوست. آن‌ها روند و تغییرات کاهنده در میزان بیان ژن پروتئین‌های HDAC4 و HDAC5 را در عضلهٔ پهن جانبی سفید[2] موش‌های تراریخته متعاقب یک فعالیت تک‌جلسه‌ای استقامتی گزارش کرده‌اند. همچنین این یافته با نتایج پژوهش دراموند[3] و همکاران (۳۶) که کاهش میزان برخی از اعضای HDACs همچون HDAC4 را متعاقب یک محرک آنابولیک (ترکیب تمرین مقاومتی و مصرف یک محلول ورزشی غنی‌شده با ۲۰ گرم آمینو اسید لوسین) در مردان جوان و سالمند گزارش کرده اند، همسوست، اما با نتایج پژوهش ماهونی[4] و همکاران (۳۷) و مک‌گی[5] و همکاران (۳۸) همخوانی ندارد که احتمالاً دلیل آن در پروتکل تمرینی و ویژگی‌های فیزیولوژیک آزمودنی‌های پژوهش‌های ماهونی و همکاران و مک‌گی و همکاران در مقایسه با پژوهش حاضر است؛ زیرا، این پژوهشگران در پژوهش‌های خود از فعالیت حاد استقامتی با شدت متوسط به بالا به‌عنوان پروتکل و آزمودنی‌های بالغ (انسان) استفاده کردند. نشان داده شده است که فعالیت استقامتی در شرایط عصب‌دهی نرمال تارهای عضلانی، موجب شروع و تسریع استیلاسیون هیستون سه مستقر در پایانه‌های لیزینی ۹، ۴ و ۳۶ می‌شود. استیلاسیون هیستون سه در فرایندهای شروع و امتداد نسخه‌برداری فاکتورهای اپی‌ژنیکی HDAC4، HDAC5 و همچنین بسته‌بندی DNA نقشی حیاتی دارد (۳۱). ازسوی‌دیگر، فعالیت استقامتی به‌واسطهٔ تغییرات بیوشمیایی کاملاً ناشناخته‌ای که در سطح سلولی در میزان بیان، نوع فعالیت و جابه‌جایی مولکولی کلسیم سیتوپلاسمی به‌وجود می‌آورد، موجب تغییرات جایگاهی درون‌سلولی HDAC4 و HDAC5 می‌شود (۵). این عوامل موجب افزایش میزان بیان و فعالیت فاکتورهای اپی‌ژنیکی HDAC4 و

1. Potthoff
2. White Vastus Lateralis
3. Drummond
4. Mahoney
5. Mcgee

HDAC5 در شرایط عصب‌دهی عادی تارهای عضلانی می‌شوند (۳). همچنین یکی دیگر از علل افزایش میزان بیان و فعالیت HDAC4 و HDAC5 متعاقب فعالیت و تمرین‌های استقامتی می‌توان به افزایش میزان بیان و فعالیت فاکتورهای کینازی مسئول افزایش فسفوریلاسیون HDAC4 و HDAC5 یعنی AMPK و CaMKII نسبت داد (۳۹). نشان داده شده است که افزایش میزان بیان و فعالیت AMPK و CaMKII متعاقب فعالیت‌ها و تمرین‌های استقامتی از طریق یک مکانیسم کاملاً ناشناخته موجب جابه‌جایی هسته‌ای-سیتوپلاسمیکی HDAC4 و HDAC5 و درنهایت افزایش میزان بیان و فعالیت آن‌ها می‌شود (۴۰). همچنین در این پژوهش نشان داده شد که میزان کاهش HDAC5 در عضلهٔ پلانتاریس رت‌های بالغ در مقایسه با رت‌های پیر، بیشتر بود. احتمالاً این موضوع ناشی از تأثیر شدید محرک تمرینی اعمال‌شده دراین پژوهش و کمتربودن نسبی میزان پایه (گروه کنترل) در بیان HDAC5 در عضلهٔ پلانتاریس رت‌های بالغ در مقایسه با رت‌های پیر است.

با توجه به نبود پیشینهٔ پژوهشی دربارهٔ تأثیر فعالیت HIT بر میزان بیان فاکتورهای اپی‌ژنیک درگیر در آتروفی نوروژنیک تارهای تند انقباض یعنی HDAC4 و HDAC5 در شرایط سالمندی و پیری، علل یا مکانیسم‌های احتمالی تغییرات ناشی از فعالیت‌ها و تمرین‌ها HIT در این شرایط کاملاً مبهم، گنگ و ناشناخته است، اما نشان داده شده است که میزان بیان و فعالیت HDAC4 و HDAC5 به‌شدت تحت‌تأثیر عصب‌دهی سلول عضلانی است؛ بدین‌صورت‌که در شرایطی همچون سالمندی که میزان عصب‌دهی سلول عضلانی دچار کاهش، نقص یا انسداد کامل می‌شود، این فاکتورهای اپی‌ژنیکی فعال می‌شوند و از طریق سرکوب بیان میزان بیان و فعالیت Dch2 به افزایش مایوژنین و متعاقب آن افزایش لیگازهای یوبیکیوتین E3 (آتروژین-یک و MuRF-1) و درنهایت آتروفی نوروژنیک سلول عضلانی منجر می‌شوند (۳). مکانیسم دقیق این فعل و انفعالات فیزیولوژیک مشخص نشده است، اما نشان داده شده است که این عملکرد بیولوژیک HDAC4 و HDAC5 از طریق برقراری یک پل ارتباطی بین دیپلاریزاسیون سلول عضلانی و بیان هدفمند برخی از ژن‌ها صورت می‌گیرد (۴۱). ازسوی‌دیگر، نشان داده شده است که ایجاد این پل ارتباطی به‌واسطهٔ خروج HDAC4 و HDAC5 از هستهٔ سلول عضلانی به‌دلیل تغییرات یون کلسیم (۴۲) و ایجاد انقباض عضلانی در سطح سلولی (۴۱) است؛ ازاین‌رو، به‌نظر می‌رسد یکی از مهم‌ترین عواملی که می‌تواند میزان بیان و فعالیت HDAC4 و HDAC5 را در تارهای عضلانی تندانقباض در دورانی همچون سالمندی که عصب‌دهی سلول عضلانی دچار کاهش، نقص یا انسداد کامل می‌شود تحت‌تأثیر قرار دهد، انقباض عضلانی در سطح سلولی باشد؛ به‌طوری‌که به‌نظر می‌رسد انقباض در سطح سلول عضلانی از یک سو موجب افزایش TKA به‌عنوان مهم‌ترین بازدارندهٔ بیان، تولید و فعالیت HDAC4 و HDAC5 می‌شود و از سوی دیگر با سرایزکردن کلسیم از جایگاه‌های درون‌سلولی به درون سلول عصلانی موجب افزایش یون‌های دی

سولفید[1] و سولفرافان[2] (به‌عنوان مهم‌ترین بازدارنده‌های یونی درون‌سلولی بیان، تولید و فعالیت HDAC4 و HDAC5) خواهد شد. همان‌طورکه بیان شد، فرایند کلی استیلاسیون هیستونی از طریق تعادل بین رخدادهای هیستون داستیلاز و هیستون ترانسفراز برقرار می‌شود. به‌نظر می‌رسد فعالیت HIT با ماهیت التهاب‌زایی که دارد (۴۳)، از طریق یک مکانیسم کاملاً ناشناخته و به‌واسطهٔ افزایش فاکتورنکروزی توموری- α (TNF-α) موجب سرکوب بیان HDAC4 و HDAC5 و درنهایت سوق این تعادل به‌سمت هیستون داستیلازها می‌شود (۴۴)؛ هر چند تاکنون پژوهشی که به‌طور مستقیم در آن به این چالش پژوهشی و جزئیات آن در افراد سالمند یا گونه‌های حیوانی پیر پرداخته شده باشد، انجام نشده است و در تحقیقات معدود انجام‌شده در این زمینه تأثیر برخی از مدل‌های فعالیت و تمرین‌های ورزشی بر میزان بیان فاکتورهای اپی‌ژنیک HDACs با استفاده از فناوری‌هایی همچون «ارائه الیگونوکلئوتید»[3] بررسی شده است (۴۵، ۳۸).

نتایج این پژوهش نشان داد میزان بیان Dch2 در عضلهٔ پلانتاریس رت‌های پیر در گروه کنترل در مقایسه با همتایان بالغشان، بیشتر است. احتمالاً دلیل این موضوع ناشی از میزان بیان بسیار بیشتر فاکتورها و عوامل بالادستی (HDAC4 و HDAC5) تنظیم‌کنندهٔ میزان بیان، تولید و فعالیت Dch2 در رت‌های پیر در مقایسه با رت‌های بالغ به‌دلیل کاهش، نقص یا انسداد احتمالی عصب‌دهی تارهای عضلانی ناشی از افزایش سن است (۴۵). همچنین همین موضوع می‌تواند یکی از علل کاهش غیرمعنادار میزان بیان Dch2 در عضلهٔ پلانتاریس رت‌های بالغ در مقایسه با رت‌های پیر متعاقب تمرین تناوبی شدید در این پژوهش باشد؛ بدین صورت که در رت‌های بالغ که فرایند عصب‌دهی تارهای عضلانی به‌صورت فرایندی کاملاً طبیعی است؛ درنتیجه میزان بیان، تولید و فعالیت عوامل تنظیم‌کنندهٔ فاکتور Dch2 (به‌منظور انجام‌دادن فعل و انفعالات بیوشیمیایی محول‌شده به این فاکتور)، همیشه در سطحی بهینه و مطلوب باید باقی بماند (۴۵)؛ ازاین‌رو فاکتور مذکور، در این پژوهش مقاومتی فیزیولوژیک در مقابل کاهش ناشی از محرک‌های متفاوت (۱۱) ازجمله تمرین تناوبی شدید دارد. در همین راستا نتایج این پژوهش نشان داد یک دورهٔ شش‌هفته‌ای تمرین HIT موجب کاهش در میزان بیان ژن Dch2 در عضلهٔ پلانتاریس رت‌های پیر (به‌طور معنادار) و بالغ نر نژاد ویستار (به‌طور غیرمعنادار) می‌شود. این یافته با نتایج پژوهش تانگ[4] و همکاران (۱۱) همسوست. آن‌ها نشان دادند متعاقب ۱۵ روز قطع عصب سلول‌های عضلانی عضلهٔ TA (ایجاد شرایط فیزیولوژیک درست مانند فرایند پیری و سالمندی)، میزان بیان و فعالیت Dch2 به‌شدت کاهش یافت، اما پس از عصب‌دهی

1. Disulfide
2. Sulforaphane
3. Oligonucleotide Arrays
4. Tang

مجدد به‌واسطهٔ فعالیت انقباضی در سطح سلول عضلانی، میزان بیان و فعالیت Dch2 به‌طور معناداری افزایش یافت. هرچند علل و مکانیسم دقیق این تغییرات Dch2 ناشی از عصب‌دهی سلول عضلانی عضلهٔ TA کاملاً مبهم، گنگ و بدون پاسخ ماند، در این پژوهش تانگ و همکاران (۱۱) نشان داده شد که فعالیت انقباضی در سلول عضلانی حاوی فعالیت الکتریکی (GFP^+) به‌همراه تزریق ۷/۵ میکروگرم pCS2EGFP پلاسمیدی به درون عضلهٔ TA موجب کاهش معنادار در میزان بیان Dch2 می‌شود.

براساس مطالعات، یکی از مهم‌ترین عواملی که می‌تواند بر بیان، تولید و فعالیت Dch2 و بسیاری از فاکتورهای اپی‌ژنیکی درون‌سلولی در شرایط عصب‌دهی نرمال و غیرطبیعی تأثیر بگذارد، فرایند همودایمریزاسیون[1] است (۴۶). در همین راستا نشان داده شده است از مهم‌ترین عواملی که می‌تواند در سلول عضلانی این فرایند را به‌شدت تحت‌تأثیر قرار دهد، سازگاری‌های ناشی از فعالیت ورزشی سنگین و کوتاه‌مدت همچون تمرین‌های HIT است (۴۸، ۴۷). ازسوی‌دیگر، مطالعات مولکولی نشان داده‌اند که سازگاری ناشی از همودایمرازسیون موجب کاهش میزان بیان، تولید و فعالیت پروتئین‌های خانوادهٔ Ski/Sno می‌شود (۴۹، ۴۶). در همین راستا نشان داده شده است که با توجه به شباهت ساختاری بسیار فراوان بین پایانه‌های C و N این پروتئین‌ها با دومین N (Dachbox-N) و دومین C (Dachbox-C) فاکتور اپی‌ژنیکی Dch2، تغییرات درون‌سلولی این خانواده تحت‌تأثیر مکانیسمی کاملاً ناشناخته به Dch2 منتقل می‌شود؛ به‌طوری‌که افزایش یا کاهش میزان بیان، تولید و فعالیت پروتئین‌های اعضای خانوادهٔ Ski/Sno به‌شدت و به‌طور مستقیم بر میزان بیان، تولید و فعالیت Dch2 تأثیر می‌گذارد (۵۰، ۴۹)؛ ازاین‌رو، به‌نظر می‌رسد یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های احتمالی کاهش میزان بیان Dch2 متعاقب تمرین‌های HIT در این پژوهش، ناشی از سازگاری در فرایند همودامرازیسیون سلولی و متعاقب آن کاهش میزان بیان، تولید و فعالیت پروتئین‌های Ski/Sno است (۴۶)؛ هرچند برای تبیین دقیق‌تر انجام‌شدن پژوهشی لازم است که ضمن ارزیابی دقیق فرایند همودامرازیسیون سلولی، میزان پروتئین‌های Ski/Sno را اندازه‌گیری کند.

ازسوی‌دیگر، یکی از مهم‌ترین یافته‌های این پژوهش این بود که میزان بیان مایوژنین در عضلهٔ تیبیالیس در رت‌های پیر در مقایسه با رت‌های بالغ کمتر است. احتمالاً به دلیل اینکه در رت‌های بالغ که عصب‌دهی تارهای عضلانی فرایندی طبیعی دارد، مایوژنین (به‌عنوان یکی از مهم‌ترین اعضای خانوادهٔ فاکتورهای تنظیم‌کنندهٔ مایوژنیک[2]) نقش عمده‌ای در ایجاد تعادل مثبت در فرایندهای تکثیر و تمایزیافتگی تارهای عضلانی و مقابلهٔ بیولوژیک با فاکتورهایی آتروفی عضلانی همچون مایواستاتین دارد. اما هم‌زمان با افزایش سن و هم‌زمان با کاهش، نقص و انسداد عصب‌دهی سلول های عضلانی،

1. Homodimerization
2. Myogenic Regulatory Factors (MRFs)

میزان بیان مایوژنین (به‌واسطهٔ یک مکانیسم جبرانی کاملاً ناشناخته) به‌دلیل کاهش عملکرد کاملاً متناقض آن در دوران پیری (یعنی تحریک و تسریع افزایش میزان بیان فاکتورهای آتروفیکی شامل آتروژین-یک و MuRF-1) کاهش می‌یابد.

نتایج این پژوهش نشان داد که شش هفته تمرین تناوبی شدید موجب کاهش معنادار در میزان بیان مایوژنین عضلهٔ پلانتاریس هر دو گروه رت‌های پیر و بالغ نر نژاد ویستار شد. این یافته با نتایج پژوهش مک‌فارسن[1] و همکاران (۷) همسوست. آن‌ها نشان دادند متعاقب تمرین‌های تحریک الکتریکی، میزان بیان ژن مایوژنین و ژن‌های آتروفی (آتروژین-یک و MuRF-1) در عضلهٔ EDL دچار کاهش شد. در پژوهش آن‌ها به‌منظور بدون عصب‌کردن، یک تکهٔ کوچک از عصب سیاتیک درست از نقطهٔ میانی ران موش‌ها برش داده شده بود، اما یافتهٔ پژوهش حاضر مبنی‌بر تأثیر تمرین‌های HIT بر میزان بیان مایوژنین در سلول‌های تندانقباض موش‌های پیر نر نژاد ویستار با یافتهٔ پژوهش سوتئا[2] و همکاران (۵۱) هم‌راستا نیست. آن‌ها نشان دادند متعاقب چهار هفته، تمرین‌های مقاومتی کنترل‌شده موجب افزایش معناداری در میزان بیان ژن و پروتئین مایوژنین در افراد سالمند شدند. در پژوهش سوئتا و همکاران بعد از چهار هفته تمرین مقاومتی کنترل‌شده، آزمودنی‌ها به‌مدت دو هفته در شرایط کاملاً کنترل‌شده تحت بی‌تحرکی[3] قرار گرفتند. در این دوران میزان ژن و پروتئین مایوژنین در آزمودنی‌های سالمند به‌شدت کاهش یافت. سپس دوباره آزمودنی‌ها به‌مدت چهار هفته در همان تمرین‌های کنترل‌شدهٔ مقاومتی قرار گرفتند، اما با وجود افزایش در میزان بیان و پروتئین مایوژنین، این افزایش چشمگیر و معنادار نبود.

به‌نظر می‌رسد تغییرات در میزان بیان، تولید و فعالیت مایوژنین در شرایط کاهش، نقص و انسداد کامل عصب‌دهی سلول عضلانی، بیشتر تحت‌تأثیر تعدیلات عوامل بالادستی است. در همین راستا، ژانگ[4] و همکاران (۵۲) نشان دادند تمایزیافتگی نهایی سلول‌های عضلانی به‌واسطهٔ فعالیت نسخه-برداری مایوژنین تنظیم می‌شود. ازسوی‌دیگر، این پژوهشگران نشان دادند فعالیت نسخه‌برداری مایوژنین از طریق پروتئین‌های خانوادهٔ Ski/Sno و به‌واسطهٔ تعدیلاتی که توسط کمپلکس‌های Six1 و Eya3 صورت می‌گیرد، تنظیم می‌شود. اعضای خانوادهٔ Ski/Sno (شامل Ski SnoN , Fussel-15, Fussel-18, Corl) در تعامل مستقیم با ساختار DNA نیستند. این عوامل از طریق پایانه‌های بیوشیمیایی خاص خود یعنی v-Ski و c-Ski موجب ایجاد تعدیلات در بیان ژن‌های خاصی از عضلهٔ اسکلتی می‌شوند. در همین راستا نشان داده شده است که در شرایط عصب‌دهی طبیعی و نرمال سلول

1. Macpherson
2. Suetta
3. Immobilization
4. Zhang

های عضلانی در موش‌های ترنس ژنیک، بیش‌بیانی v-Ski و c-Ski به هایپرتروفی در تارهای عصلانی تندانقباض نوع IIb منجر می‌شود (۵۲). ازسوی‌دیگر، در یک پژوهش نشان داده شد موش‌هایی که قدرت بیان پروتئین‌های خانوادۀ Ski/Sno از سلول‌های عضلانی آن‌ها سلب شده بود، کاهش شدیدی را در میزان حجم تمام انواع تارهای عضلانی تجربه کردند (۵۳). همان‌طورکه در مطالب قبلی ذکر شد، با توجه به شباهت ساختاری بسیار فراوان بین پایانه‌های C و N این پروتئین‌ها با دومین N (Dachbox-N) و دومین C (Dachbox-C) فاکتور اپی‌ژنیکی Dch2، تغییرات درون‌سلولی این خانواده تحت‌تأثیر یک مکانیسم کاملاً ناشناخته به Dch2 منتقل می‌شود؛ به‌طوری‌که افزایش یا کاهش میزان بیان، تولید و فعالیت پروتئین‌های اعضای خانوادۀ Ski/Sno به‌شدت و به‌طور مستقیم بر میزان بیان، تولید و فعالیت Dch2 تأثیر می‌گذارد (۵۰، ۴۹)؛ ازاین‌رو، به‌نظر می‌رسد یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های احتمالی کاهش میزان مایوژنین در این پژوهش، ناشی از افزایش میزان بیان، تولید و فعالیت پروتئین‌های اعضای خانوادۀ Ski/Sno و متعاقب آن، افزایش میزان بیان، تولید و فعالیت Dch2 است؛ البته به‌منظور بررسی دقیق‌تر انجام‌دادن پژوهش‌های ریزبینانه‌تر نیاز است.

پیام مقاله: نتایج این پژوهش نشان داد که میزان بیان ژن‌های HDAC4/5، Dch2 و مایوژنین در عضلۀ پلانتاریس هر دو گروه موش‌های بالغ و پیر نر نژاد ویستار متعاقب یک دوره از تمرین‌های HIT، کاهش معنادار یافت؛ ازاین‌رو، به‌نظر می‌رسد این نوع تمرین‌ها می‌توانند از طریق تأثیرات مثبت بر مهم‌ترین فاکتورهای مسیر سیگنالینگ درگیر در آتروفی نوروژنیک، موجب جلوگیری از این اختلال عصبی-عضلانی و بسیاری از شرایط پاتولوژیکی وابسته به آن همچون کاچکسیا شوند؛ هر چند برای بررسی این موضوع به انجام‌دادن پژوهش‌های بیشتری نیاز است.

پژوهشگاه علوم انسانی و مطالعات فرهنگی
پرتال جامع علوم انسانی

تشکر و قدردانی

از زحمات تمامی دوستان و همکارانی که در تمامی مراحل اجرای پژوهش ما را یاری کردند، تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع

1. Rowan SL, Rygiel K, Purves-Smith FM, Solbak NM, Turnbull DM, Hepple RT. Denervation causes fiber atrophy and myosin heavy chain co-expression in senescent skeletal muscle. PLoS One. 2012;7(1):29082.
2. Aagaard P, Suetta C, Caserotti P, Magnusson SP, Kjær M. Role of the nervous system in sarcopenia and muscle atrophy with aging: Strength training as a countermeasure. Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports. 2010;20(1):49-64.

3. Moresi V, Williams AH, Meadows E, Flynn JM, Potthoff MJ, McAnally J, et al. Myogenin and class II HDACs control neurogenic muscle atrophy by inducing E3 ubiquitin ligases. Cell. 2010;143(1):35-45.
4. Moresi V, Marroncelli N, Coletti D, Adamo S. Regulation of skeletal muscle development and homeostasis by gene imprinting, histone acetylation and microRNA. Biochim Biophys Acta. 2015;1849(3):309-16.
5. Bassett SA, Barnett MP. The role of dietary histone deacetylases (HDACs) inhibitors in health and disease. Nutrients. 2014;6(10):4273-301.
6. Ferry A, Joanne P, Hadj-Said W, Vignaud A, Lilienbaum A, Hourde C, et al. Advances in the understanding of skeletal muscle weakness in murine models of diseases affecting nerve-evoked muscle activity, motor neurons, synapses and myofibers. Neuromuscul Disord. 2014;24(11):960-72.
7. Macpherson PC, Wang X, Goldman D. Myogenin regulates denervation-dependent muscle atrophy in mouse soleus muscle. J Cell Biochem. 2011;112(8):2149-59.
8. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. Science. 2001;294(5547):1704-8.
9. 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.
10. Tang H, Macpherson P, Marvin M, Meadows E, Klein WH, Yang XJ, et al. A histone deacetylase 4/myogenin positive feedback loop coordinates denervation-dependent gene induction and suppression. Mol Biol Cell. 2009;20(4):1120-31.
11. Tang H, Goldman D. Activity-dependent gene regulation in skeletal muscle is mediated by a histone deacetylase (HDAC)-Dach2-myogenin signal transduction cascade. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103(45):16977-8.
12. Krutki P, Ciechanowicz-Kowalczyk I, Lochynski D, Celichowski J. Effect of aging on properties of motor unit action potentials in the rat medial gastrocnemius muscle. J Electromyogr Kinesiol. 2013;23(5):1150-7.
13. Kamen G. Aging, resistance training, and motor unit discharge behavior. Can J Appl Physiol. 2005;30(3):341-51.
14. Deschenes MR. Motor unit and neuromuscular junction remodeling with aging. Curr Aging Sci. 2011;4(3):209-20.
15. Chen L, Huang HW, Gu SH, Xu L, Gu YD, Xu JG. The study of myogenin expression in denervated human skeletal muscles. J Int Med Res. 2011;39(2):378-87.
16. Kelly NA, Hammond KG, Bickel CS, Windham ST, Tuggle SC, Bamman MM. Effects of aging and Parkinson's disease on motor unit remodeling: influence of resistance exercise training. J Appl Physiol. 2018;124(4):888-98.
17. Kallio J, Sogaard K, Avela J, Komi PV, Selanne H, Linnamo V. Motor unit discharge rate in dynamic movements of the aging soleus. Front Hum Neurosci. 2014;8:773.
18. Bum-Chul Y, Byong-Kyu Y, Myoun-Hwa L. Exrcise effetcs on the atrophy denervated muscles in rat. Kautpt. 2000;7(3):34-48.
19. Mueller SM, Aguayo D, Zuercher M, Fleischmann O, Boutellier U, Auer M, et al. High-intensity interval training with vibration as rest intervals attenuates fiber atrophy and prevents decreases in anaerobic performance. PLoS One. 2015;10(2):0116764.

20. 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. 1996;81(6):2658-65.
21. Seene T, Umnova M, Kaasik P. Morphological peculiarities of neuromuscular junctions among different fiber types: Effect of exercise. Eur J Transl Myol. 2017;27(3):6708.
22. Fyfe JJ, Bishop DJ, Stepto NK. Interference between concurrent resistance and endurance exercise: Molecular bases and the role of individual training variables. Sports Med. 2014;44(6):743-62.
23. Coffey VG, Hawley JA. The molecular bases of training adaptation. Sports Med. 2007;37(9):737-63.
24. McGee SL. Exercise and MEF2-HDAC interactions. Appl Physiol Nutr Metab. 2007;32(5):852-6.
25. Matsubara M, Tohara H, Hara K, Shinozaki H, Yamazaki Y, Susa C, et al. High-speed jaw-opening exercise in training suprahyoid fast-twitch muscle fibers. Clin Interv Aging. 2018;13:125-31.
26. Karimian J, Khazaei M, Shekarchizadeh P. Effect of resistance training on capillary density around slow and fast twitch muscle fibers in diabetic and normal rats. Asian J Sports Med. 2015;6(4):24040.
27. English AW, Cucoranu D, Mulligan A, Sabatier M. Treadmill training enhances axon regeneration in injured mouse peripheral nerves without increased loss of topographic specificity. J Comp Neurol. 2009;517(2):245-55.
28. Gillon A, Sheard P. Elderly mouse skeletal muscle fibres have a diminished capacity to upregulate NCAM production in response to denervation. Biogerontology. 2015;16(6):811-23.
29. Deschenes MR, Roby MA, Glass EK. Aging influences adaptations of the neuromuscular junction to endurance training. Neuroscience. 2011;190:56-66.
30. Thomas C, Bishop D, Moore-Morris T, Mercier J. Effects of high-intensity training on MCT1, MCT4, and NBC expressions in rat skeletal muscles: Influence of chronic metabolic alkalosis. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 2007;293(4):916-22.
31. 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.
32. Wang AH, Kruhlak MJ, Wu J, Bertos NR, Vezmar M, Posner BI, et al. Regulation of histone deacetylase 4 by binding of 14-3-3 proteins. Mol Cell Biol. 2000;20(18):6904-12.
33. Walsh ME, Bhattacharya A, Sataranatarajan K, Qaisar R, Sloane L, Rahman MM, et al. The histone deacetylase inhibitor butyrate improves metabolism and reduces muscle atrophy during aging. Aging Cell. 2015;14(6):957-70.
34. Perera N ,Hergovich A. The promise of using histone deacetylase inhibitors in combination treatment against breast cancer and other solid tumors. Chin Clin Oncol. 2017;6(1):1-3.
35. 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.

36. 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.
37. Mahoney DJ, Parise G, Melov S, Safdar A, Tarnopolsky MA. Analysis of global mRNA expression in human skeletal muscle during recovery from endurance exercise. FASEB J. 2005;19(11):1498-500.
38. McGee SL, Fairlie E, Garnham AP, Hargreaves M. Exercise-induced histone modifications in human skeletal muscle. J Physiol. 2009 Dec 15;587(Pt 24):5951-8.
39. Yoshihara T, Machida S, Kurosaka Y, Kakigi R, Sugiura T, Naito H. Immobilization induces nuclear accumulation of HDAC4 in rat skeletal muscle. J Physiol Sci. 2016;66(4):337-43.
40. Kachhap SK, Rosmus N, Collis SJ, Kortenhorst MS, Wissing MD, Hedayati M, et al. Downregulation of homologous recombination DNA repair genes by HDAC inhibition in prostate cancer is mediated through the E2F1 transcription factor. PLoS One. 2010;5(6):11208.
41. Yoshihara T, Kakigi R, Tsuzuki T, Shuo-Wen C, Natsume T, Takamine Y, et al. Physical inactivity-induced histone modification in the rat soleus muscle. Med Sci Sports Exerc. 2016;48(5 Suppl 1):580.
42. Walsh ME, Van Remmen H. Emerging roles for histone deacetylases in age-related muscle atrophy. Nutr Healthy Aging. 2016;4(1):17-30.
43. Kaspar F, Jelinek HF, Perkins S, Al-Aubaidy HA, deJong B, Butkowski E. Acute-phase inflammatory response to single-bout hiit and endurance training: A comparative study. Mediators Inflamm. 2016;2016:5474837.
44. Vashisht Gopal YN, Arora TS, Van Dyke MW. Tumour necrosis factor-alpha depletes histone deacetylase 1 protein through IKK2. EMBO Rep. 2006;7(3):291-6.
45. Saleem A, Safdar A. Exercise-induced histone acetylation-playing tag with the genome. J Physiol. 2010;588(Pt 6):905-6.
46. Hammond KL, Hanson IM, Brown AG, Lettice LA, Hill RE. Mammalian and Drosophila dachshund genes are related to the Ski proto-oncogene and are expressed in eye and limb. Mech Dev. 1998;74(1-2):121-31.
47. Karthikraja V, Suresh A, Lulu S, Kangueane U, Kangueane P. Types of interfaces for homodimer folding and binding. Bioinformation. 2009;4(3):101-11.
48. Schwartz TU, Schmidt D, Brohawn SG, Blobel G. Homodimerization of the G protein SRbeta in the nucleotide-free state involves proline cis/trans isomerization in the switch II region. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103(18):6823-8.
49. Kim SS, Zhang RG, Braunstein SE, Joachimiak A, Cvekl A, Hegde RS. Structure of the retinal determination protein Dachshund reveals a DNA binding motif. Structure. 2002;10(6):787-95.
50. Tavsanli BC, Ostrin EJ, Burgess HK, Middlebrooks BW, Pham TA, Mardon G. Structure-function analysis of the Drosophila retinal determination protein Dachshund. Dev Biol. 2004;272(1):231-47.
51. Suetta C, Frandsen U, Mackey AL, Jensen L, Hvid LG, Bayer ML, et al. Ageing is associated with diminished muscle re-growth and myogenic precursor cell expansion early after immobility-induced atrophy in human skeletal muscle. J Physiol. 2013;591(15):3789-804.

52. Cartee GD, Hepple RT, Bamman MM, Zierath JR. Exercise promotes healthy aging of skeletal muscle. Cell Metab. 2016;23(6):1034-47.
53. Kasper AM, Turner DC, Martin NRW, Sharples AP. Mimicking exercise in three-dimensional bioengineered skeletal muscle to investigate cellular and molecular mechanisms of physiological adaptation. J Cell Physiol. 2018;233(3):1985-98.

ارجاع‌دهی

قراخانلو رضا، ملانوری شمسی مهدیه، مظاهری زهره، غلامعلی میثم. بررسی تأثیر شش هفته تمرین تناوبی شدید بر میزان بیان ژن پروتئین‌های HDAC4/5، Dch2 و مایوژنین عضلهٔ پلانتاریس رت‌های پیر نر نژاد ویستار. فیزیولوژی ورزشی. پاییز ۱۳۹۹؛ ۱۲(۴۷): ۶۸ـ۱۴۷. شناسهٔ دیجیتال: 10.22089/spj.2019.6588.1828

Gharakhanlou R, Molanouri Shamsi M, Mazaheri Z, Gholamali M. Investigation of the Effects of 6 Weeks High Interval Intensive Training Period on the Expression of the HDAC4, HDAC5, Dch2 and Myogenin Gens in the Plantaris Muscle of the Aged Male Wistar Rats. Sport Physiology. Fall 2020; 12(47): 15-32. (In Persian). DOI: 10.22089/spj.2019.6588.1828

پژوهشگاه علوم انسانی و مطالعات فرهنگی
پرتال جامع علوم انسانی

Investigation of the Effects of 6 Weeks High Interval Intensive Training Period on the Expression of the HDAC4, HDAC5, Dch2 and Myogenin Gens in the Plantaris Muscle of the Aged Male Wistar Rats

R. Gharakhanlou[1], M. Molanouri Shamsi[2], Z. Mazaheri[3], M. Gholamali[4]

1. Professor of Exercise Physiology, Factually of Humane Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran (Corresponding Author)
2. Associate Professor of Exercise Physiology, Factually of Humane Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3. Assistant Professor of Anatomical Sciences, Department of Medical Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
4. Ph.D. Student in Exercise Physiology, Factually of Humane Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received: 2018/10/30 **Accepted: 2019/02/03**

Abstract

One the major reason of the age-related muscular atrophy, Sarcopenia, is neurogenic atrophy. Despite this issue, the effects of some pathway which have probability effect, such as: kind of training methods, especially high interval intensive training, on the main factors of the neurogenic cascades is not yet clear. Therefore, the aim of this study was to investigate the effects of high interval intensive training period on the expression of the HDAC4, HDAC5, Dch2 and Myogenin gens in the plantaris muscle of the aged male Wistar rats. 28 male Wistar rats randomly assigned in to four groups (N=7, adult control, N=7, adult training, N=7, aged control, N=7, aged training). The training group performed HIT 5 times per week for 6 weeks. 48 hours after the end of the last session of training with control group were anesthetized and sacrificed. Then the plantaris muscle was removed. Real time PCR method was used to determine the gene expression levels of HDAC4, HDAC5, Dch2 and Myogenin. For the statical analyses two-way ANOVA and Tukey were used. The statical significant assumed $P \leq 0.05$. The results of this study have been shown that HDAC4, HDAC5 and Myogenin significantly decreased. The amount of the Dch2 increased significantly compared to young control group. According to the results of this study, it seems high interval intensive training suppress the neurogenic atrophy in the orders adult.

Keywords: Aging, Neurogenic Atrophy, HDAC4/5, Dch2, Myogenin, High Interval Intensive Training.

1. Email: ghara_re@modares.ac.ir
2. Email: molanouri_m@moadares.ac.ir
3. Email: mazaheri_z@modares.ac.ir
4. Email: m.Gholamali1987@gmail.com