مجلـــه‌ی علمـــی، پژوهشـــی دانشـگاه علـوم پزشـکی زنجـــان
دوره‌ی ۲٤, شمـــاره‌ی ۱۰٦, آذر و دی ۱۳۹۵, صفحات ۵۱ تا ٦۲

بررسی اثر فعالیت استقامتی بر میزان بیان ژن PGC-1 آلفا عضلات نعلی و بازکننده‌ی بلند انگشتان در موش‌های صحرایی نر بالغ

دکتر محمد فتحی[۱]

نویسنده‌ی مسوول: گروه تربیت‌بدنی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد fathi.m@lu.ac.ir

دریافت: ۹۴/۶/۱۴ پذیرش: ۹۴/۹/۲

چکیده

زمینه و هدف: *فعالیت استقامتی بر بیان ژن عضلات تاثیر می‌گذارد که این موضوع با بهبود کارآیی و عملکـرد آن همـراه اسـت. از طـرف دیگـر فاکتور رونویسی PGC-1 آلفا موجب افزایش بیوژنز میتوکندری‌های عضلات اسکلتی می‌شود. بنابراین هدف ایـن پـژوهش بررسـی تـاثیر یـک برنامه‌ی فعالیت استقامتی بر بیان ژن PGC-1 آلفا در عضلات اسکلتی تند و کند انقباض بود.*

روش بررسی: *برای این منظور ۱۴ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۲۰±۱۱۳ گرم تحت شرایط کنترل شده نگهداری و بعد از آشناسازی (۲۴±۲۳۱ گرم) به‌صورت تصادفی به دو گروه کنترل (۷ سر) و تجربی (۷ سر) تقسیم شدند. گروه تجربی یک برنامه (۳۰ متر در دقیقه، ۵۰ دقیقـه در هر جلسه، ۶ جلسه در هفته به مدت ۱۴ هفته) فعالیت استقامتی را روی تردمیل اجرا کرد. ۴۸ ساعت پس از پایان آخرین جلسه همراه با گروه کنترل بی‌هوش و تشریح شدند، سپس عضله‌ی نعلی و عضله‌ی بازکننده‌ی بلند انگشتان آن‌ها خارج شد. با اسـتفاده از روش Real time-PCR میزان بیان ژن PGC-1 آلفا اندازه‌گیری شد، در پایان با استفاده از آزمون آماری t داده‌ها ارزیابی و مقایسه شد.*

یافته‌ها: *نتایج نشان داد، ۱۴ هفته فعالیت استقامتی موجب افزایش بیان ژن PGC-1 آلفا در عضلات اسکلتی نعلـی و بازکننـده‌ی بلنـد انگـشتان می‌شود، به‌طوری که میانگین میزان بیان این ژن در عضله‌ی نعلی گروه تجربی بـه‌طـور معنـی‌داری (P=۰/۰۰۱) بیـشتر از گـروه کنتـرل بـود و همچنین میانگین میزان بیان آن در عضله‌ی بازکننده بلند انگشتان گروه تجربی نیز به‌طور معنی‌داری (P=۰/۰۰۶) بیشتر از گروه کنترل بود.*

نتیجه گیری: *فعالیت استقامتی بر بیان ژن PGC-1 آلفا عضلات تند انقباض و کند انقباض اثر یکسانی دارد اما به نظر می‌رسد شدت این اثـر در عضلات کند انقباض بیشتر است.*

واژگان کلیدی: ***ژن PGC-1 alpha ، فعالیت استقامتی، عضله‌ی نعلی، بازکننده‌ی بلند انگشتان***

مقدمه

در اثـر فعالیـت‌بـدنی سـازگاری‌هـایی در بـسیاری از سیـستم‌هـای فیزیولوژیـک بـدن (۲و ۱)، از جملـه عـضله‌ی اسکلتی رخ می‌دهد (۳)، که عملکرد آن‌ها را تحت تاثیر قـرار می‌دهد (۴). فعالیت استقامتی موجب فعال سازی سیگنال‌های سلولی می‌شود که سـازگاری عـضلات اسـکلتی را بـه‌عهـده دارند، سازگاری‌هایی مانند بهبود عملکرد مکانیکی، متابولیکی، عصبی و انقباضی عضله که همه‌ی این تغییـرات تحـت تـاثیر تنظیمات رونویسی و ترجمه‌ای ژن‌هایی هـستند کـه فـرآوری پروتئین‌ها را کنترل می‌کنند (۵). طـی فعالیـت‌هـای اسـتقامتی منابع انرژی عضلات بـا چـالش‌هـایی بـرای تـامین انـرژی و مقاومت در مقابل خستگی مواجه‌اند بنـابراین سـازگاری‌هـای متابولیکی که در اثر فعالیت‌های استقامتی در عضلات اسکلتی

۱- دکترای فیزیولوژی ورزشی، استادیار گروه تربیت بدنی، دانشکده‌ی علوم انسانی، دانشگاه لرستان، خرم آباد

رخ می‌دهد منجر به افزایش مقاومت آن‌ها در مقابل خستگی می‌شود (۶). بهبود استقامت عضلات اسکلتی با افزایش میزان چگالی میتوکندری و فعالیت آنزیمی آن ارتباط مستقیمی دارد، افزایش میزان میتوکندری‌ها در یک عضله را بیوژنز میتوکندریایی می‌نامند (۷). خود میتوکندری دارای DNA به طول ۱۶ کیلو جفت باز است که توانایی کدگذاری برای ۱۳ پروتئین را دارد که آن را mtDNA می‌نامند، هرچند این بخش کوچکی از پروتئین‌های مورد نیاز برای سنتز کامل میتوکندری است و مابقی آن‌ها توسط ژنوم هسته‌ی سلول کد می‌شوند، اما بیوژنز میتوکندری نیازمند هماهنگی ژنوم میتوکندری و ژنوم هسته و در نهایت تلفیق آن‌هاست (۷). فاکتورهای رونویسی زیادی در سازگاری‌های فیزیولوژی و متابولیکی و در نتیجه بیوژنز میتوکندری درگیرند، از جمله فاکتور تنفسی هسته‌ای (NRF-1)، c-JUN، c-fos و همچنین فاکتور رونویسی PGC-1 آلفا (Proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha) (۸). فاکتور PGC-1 به‌عنوان یک کواکتیویتور (Coactivator) در بیوژنز میتوکندریایی نقش مهمی را ایفا می‌کند (۹). PGC-1 آلفا متعلق به یک خانواده‌ی نسبتا بزرگ از گیرنده‌های هسته‌ای است که با طیف وسیعی از فاکتورهای رونویسی که در پاسخ‌های گوناگون بیولوژیکی درگیر است ارتباط دارد (۱۱و ۱۰). PGC-1 آلفا در حقیقت یک کواکتیویتور رونویسی است (۱۱). کواکتیویتور یک پروتئین یا مجموعه‌ای از پروتئین‌ها است که به وسیله‌ی اتصال به یک Activator یا فاکتور رونویسی که دارای ناحیه‌ی اتصالی به DNA است میزان بیان ژن را افزایش می‌دهد. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که اعضای خانواده‌ی PGC-1 در پاسخ به محرک‌های محیطی شامل گرما و فعالیت بدنی فعال می‌شوند و همچنین در حفظ هموستاز گلوکز، لیپید، انرژی و احتمالا در شرایط پاتوژنیک مانند چاقی، دیابت، تخریب نورونی و بیماری‌های قلبی نقش مهمی را به عهده دارند (۱۲). مشخص شده است که PGC-1 در تبدیل نوع تارها نیز نقش دارد و موجب تبدیل تارها از نوع تند به نوع کند می‌شود (۱۳و ۹) هر چند برخی از تحقیقات از نقش انقباضی و سازگاری آن در عضلات حمایت نمی‌کنند (۱۴). میزان بیان این فاکتور رونویسی با افزایش سن کاهش می‌یابد که ممکن است دلیلی برای کاهش بیوژنز میتوکندریایی ناشی از سن باشد (۱۵). اگرچه فعالیت بدنی موجب افزایش بیان آن در دوران پیری می‌شود و از کاهش بیوژنز میتوکندریایی ناشی از سن جلوگیری می‌کند (۱۵). پژوهش‌ها نشان داده‌اند که میزان بیان ایزوفرم‌های این ژن در پاسخ به یک جلسه فعالیت ورزشی در شدت‌های مختلف (کم، متوسط و شدید) حتی تا ۲۴ ساعت پس از آن به طور معنی‌داری افزایش می یابد (۱۶). در مطالعه‌ای دیگر مشخص شده که بعد از یک دوره‌ی طولانی مدت فعالیت استقامتی میزان بیان ژن PGC-1 آلفا عضله‌ی اسکلتی پای تمرین کرده نسبت به پای تمرین نکرده به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (۱۷). همچنین میزان بیان این ژن بعد از یک جلسه تمرین نیز تا ۶ ساعت همچنان در هر دو پا (تمرین کرده و نکرده) نسبت به قبل از تمرین و بلافاصله بعد از تمرین بالاست (۱۷). میزان بیان پروتئین PGC-1 در عضله‌ی اسکلتی نیز تحت تاثیر فعالیت‌های بدنی قرار می‌گیرد (۱۸). دیده شده که پروتئین و ژن PGC-1 در پاسخ به ۹۰ دقیقه تمرین استقامتی هم در زیر واحدهای سلولی یعنی میتوکندری و هم در هسته سلول عضله‌ی اسکلتی بلافاصله و سه ساعت پس از تمرین به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (۱۹).

افزایش میزان بیان (Overexpression) این ژن در عضله موجب سنتز شدید میتوکندری‌ها در این بافت می‌شود (۲۰). نکته‌ای که باید یادآوری کرد این است که علی‌رغم تاثیر این فاکتور بر ظرفیت‌های استقامتی از جمله Vo_2max، هنوز پژوهشی تاثیر فعالیت استقامتی شدید و بلند مدت بر میزان بیان این ژن در عضلات تند و کند انقباض را مقایسه و بررسی نکرده است، بنابراین هدف این پژوهش ارزیابی تاثیر

فعالیت استقامتی بر بیان ژن PGC-1 آلفا در عضلات تند (عضله‌ی بازکننده‌ی بلند انگشتان) و کند انقباض (عضله‌ی نعلی) است.

روش بررسی

پژوهش حاضر اثر یک برنامه‌ی استقامتی (۱۴ هفته‌ای) بر بیان ژن PGC-1 آلفا عضلات تند و کند انقباض را به روش تجربی ارزیابی کرد. ۲۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با ۵ هفته سن و وزن ۲۰±۱۱۳گرم از انستیتو پاستور تهیه شد (جدول ۳). همه‌ی آن‌ها در شرایط مناسب استاندارد (دسترسی آزاد به آب و غذای مخصوص موش صحرایی، چرخه‌ی روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت، میانگین دما ۳±۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد) در آزمایشگاه حیوانات تا رسیدن به سن بلوغ (۸ هفته) در ۴ قفس یکسان نگهداری شدند. سپس دوره‌ی آشناسازی (۲۴±۲۳۱ گرم) با تمرینات استقامتی آغاز شد که ۱۰ (۵ جلسه) روز برای آشنایی با دویدن روی تردمیل (۹ متر در دقیقه، ۵ دقیقه، ۴ روز در هفته) زمان صرف شد، سپس به‌صورت تصادفی به ۲ گروه (۱۰ سر به‌عنوان گروه کنترل و ۱۰سر دیگر به عنوان گروه تجربی) تقسیم شدند. از گروه تجربی، ۳ سر نتوانست برنامه‌ی تمرینی را به پایان برساند، بنابراین با توجه به روش نسبی اندازه‌گیری در تکنیک Real Time-PCR سه سر از گروه کنترل به‌صورت تصادفی کنار نهاده شد و تعداد نهایی به ۱۴ سر (۷ سر کنترل و ۷ سر تجربی) کاهش یافت.

برنامه‌ی تمرینی: با استفاده از منابع پیشین یک برنامه‌ی تمرین استقامتی برای موش‌ها طراحی شد (۲۲و۲۱). برنامه‌ی 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 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. به‌طور هفتگی مدت زمان بخش اصلی برنامه افزایش یافت؛ (در هفته ۱ تا ۳ هر روز ۲ دقیقه به‌مدت زمان اجرای بخش اصلی برنامه اضافه می‌شد) به‌طوری که در پایان روز ۲۳ مدت بخش اصلی برنامه به ۵۰ دقیقه رسید که با احتساب ۵ دقیقه گرم‌کردن و ۵ دقیقه سردکردن، 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 به‌طوری که در پایان هفته ششم سرعت به ۳۰ متر در دقیقه رسید. در نهایت در طی هفته‌های هفتم تا دهم به تدریج ۵ درجه شیب (ابتدای هر هفته تقریبا 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 به‌عنوان بخش سرد کردن)] تا پایان هفته‌ی چهاردهم حفظ شد. بخش اصلی این برنامه با حدود ۷۰ درصد VO_2max موش‌ها اجرا شد (۲۴و ۲۳). این برنامه (جدول ۱) بین ساعات ۵ تا ۷ بعد ازظهر هر روز اعمال می‌شد. بعد از پایان برنامه‌ی استقامتی و ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه‌ی تمرینی موش‌ها با ترکیبی از کتامین (۵۰ میلی‌گرم به ازای هرکیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) بی‌هوش شدند. بعد از بی‌هوشی کامل (به‌طوری که موش به تحریک اعمال شده پاسخ ندهد)، عضلات نعلی و بازکننده‌ی بلند انگشتان تحت شرایط استریل خارج شد. بافت‌های مورد نظر بلافاصله در میکروتیوب‌هایی با حجم ۱/۵ میلی‌لیتر با برچسب متناسب با بافت و موش جاسازی و وارد تانک نیتروژن شدند. بعد از اتمام تشریح و تا شروع هموژن بافت‌ها، همه‌ی آن‌ها در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. با استفاده از هاون و نیتروژن مایع بافت‌ها هموژن و در میکروتیوب‌هایی با حجم ۱/۵ میلی‌لیتر با برچسب مناسب نگهداری شدند. در زمان

ارایه‌ی برنامه تمرینی موش‌هایی که نمی‌توانستند دوره تمرینی را ادامه دهند کنار گذاشته شدند.

جدول ۱: برنامه فعالیت استقامتی

بخش / شاخص	گرم کردن	بدنه اصلی تمرین	سرد کردن	چگونگی تغییرات شاخص‌های سرعت، مدت و شیب طی ۱۴ هفته فعالیت استقامتی
زمان	۵ دقیقه	۵۰ دقیقه	۵ دقیقه	از ۱۲ دقیقه طی ۲۳ روز به ۵۰ دقیقه رسید
سرعت	۱۲ متر درثانیه	۳۰ متر در ثانیه	۹ متر درثانیه	از ۲۰ متر در دقیقه طی ۵ هفته به ۳۰ متر در دقیقه رسید
شیب	صفر	۵ درجه	صفر	به تدریج ۵ درجه شیب از هفته هفتم تا دهم اضافه شد

استخراج RNA از بافت: برای استخراج RNA از بافت‌های هموژن شده، به ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت داخل میکروتیوب، ۱ میلی‌لیتر ترایزول (Invitrogen) اضافه شد و پس از مخلوط کردن کامل (پیپتاژکردن) به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری (انکوبه) شد، سپس ۰/۲ میلی‌لیتر به آن کلروفرم سرد اضافه شد و پس از پیپتاژ (۱۵ ثانیه) حدود ۲ تا ۳ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد، در ادامه میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه 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 ۰/۵ میلی‌لیتر ایزوپروپانول سرد اضافه شد و بعد از هم زدن ملایم در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد باقی ماندند (Overnight). روز بعد میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه مجددا 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 ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد با ۷۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و در ادامه مایع رویی به دقت تخلیه شد و ۱۰ دقیقه فرصت داده شد تا باقی مانده 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 پیپتاژ صورت گرفت. در پایان غلظت و نسبت جذبی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (شرکت Eppendorff) ارزیابی شد که نسبت جذبی ۲٦۰/۲۸۰ نانومتر برای تمام نمونه‌ها بین ۱/٦ 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.

سنتز cDNA: برای رونویسی RNA به cDNA از کیت شرکت ترموساینتفیک (Scientific Thermo) 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 کارآیی (Efficiency) ژن رفرنس (*Housekeeping*) و ژن هدف (PGC-1 آلفا) برای هر عضله بررسی شود که این کار صورت گرفت و میزان کارآیی برای این دو ژن در بالاترین میزان خود یعنی ۱ بود. در ادامه‌ی ارزیابی بیان ژن از تکنیک Real Time PCR و دستگاه شرکت آپلاید بایوسیستم (Applied Biosystem) استفاده شد. سایبرگرین مسترمیکس (SYBR green master mix) استفاده شده در این مرحله متعلق به شرکت تاکارا با Cat # RR820L بود. طبق

دستورالعمل کیت و بررسی میزان کارآیی ژن رفرنس و هدف، برای یک نمونه ۱۰ لاندایی ترکیبی از مسترمیکس (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 به‌عنوان کنترل منفی برای تعیین آلودگی مسترمیکس (طبق دستورالعمل شرکت آپلاید بایوسیستم نباید CT آن کمتر از ۳۵ باشد) در نظر گرفته شد و کنترل داخلی ژن (*gapdh*) Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase، کنترل مثبت (گروه کنترل) و PGC-1 آلفا همزمان، در یک Run ارزیابی شد. نمونه‌ها به‌صورت دوتایی (Duplicate) ارزیابی شدند. بعد از به دست آوردن Cycle Threshold (CT) دوتایی برای هر نمونه میانگین آن‌ها محاسبه شد. لازم به ذکر است در برخی موارد نیاز بود که تست مجددا تکرار شود که در صورت نیاز تست تکرار می‌شد. بعد از انتقال اطلاعات به نرم‌افزار Excel طبق فرمول $2^{-\Delta\Delta C}$ میزان بیان ژن *PGC-1 آلفا* محاسبه شد (۲۵). مشخصات پرایمرهای استفاده شده در جدول ۲ آمده است. ژن رفرنس در این تحقیق ژن *gapdh* می‌باشد.

جدول ۲ مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش

genes		Sequence 5-3	NCBI Reference Sequence	Product size
gapdh	F	AACCCATCACCATCTTCCAG	NM_017008.4	74
	R	CACGACATACTCAGCACCAG		
pgc1α	F	TCAAAGACCCCAAAGGATGCG	NM_031347.1	287
	R	CATACTCTCTGCGGTATTCGTC		

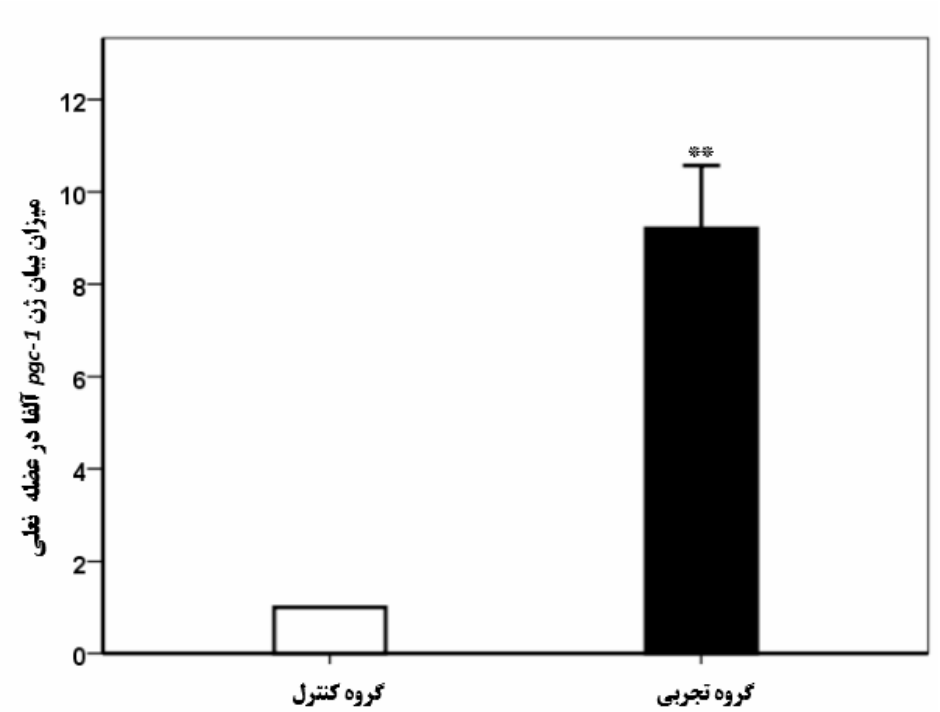
تجزیه و تحلیل داده‌ها: داده‌های به‌دست آمده از دستگاه Real Time PCR که به صورت CT بودند. با استفاده از نرم‌افزار Excel به ΔΔct تبدیل شدند و سپس با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta C}$ اعداد نهایی به‌دست آمد. با انتقال این اعداد به نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ ابتدا نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو-ویلک (Shapiro-Wilk) ارزیابی شد و مشخص شد که داده‌ها دارای توزیع طبیعی هستند. بعد از تعیین نرمال بودن، برای تعیین اختلاف میانگین گروه تجربی از گروه کنترل (که عدد ۱ بود) از آزمون t استفاده شد.

یافته‌ها

مقدار عدد t (۱۴/۷۱) نشان داد که بیان ژن PGC-1 آلفا در عضله نعلی در گروه تجربی پس از ۱۴ هفته فعالیت استقامتی ۹ برابر افزایش می‌یابد که این افزایش در مقایسه با گروه کنترل در سطح P=۰/۰۰۰۱ معنادار بود (شکل ۱). همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که میزان بیان ژن PGC-1 آلفا در عضله‌ی بازکننده‌ی بلند انگشتان پس از ۱۴ هفته فعالیت استقامتی نسبت به گروه کنترل افزایش یافت که این افزایش در سطح P=۰/۰۰۶ معنی‌دار بود به این معنی که میزان بیان ژن PGC-1 آلفا در گروه تجربی ۱/۷۵ برابر افزایش داشت (شکل۲).

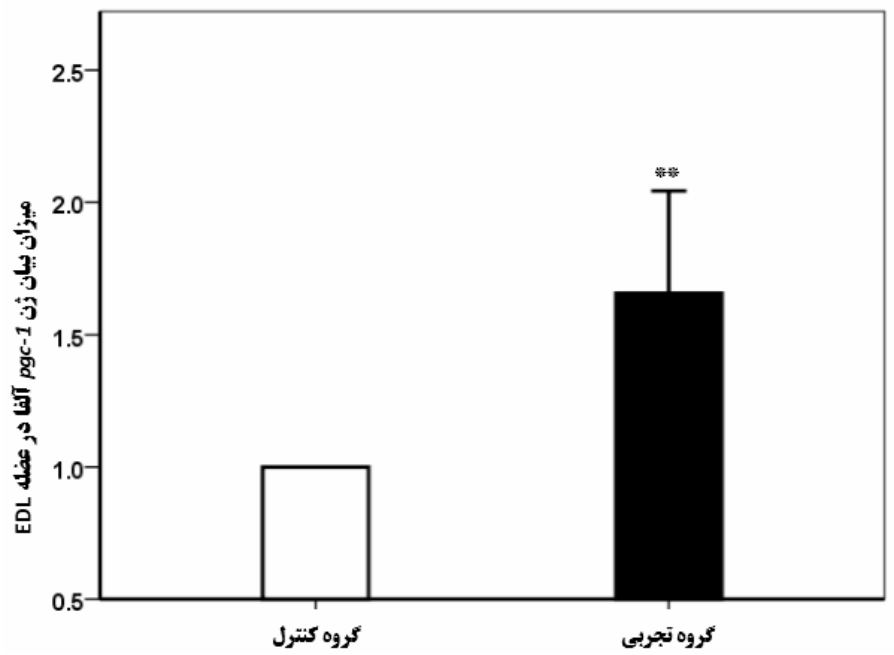
جدول ۳: مشخصات وزنی موش‌ها در ابتدا و انتهای دوره‌ی پژوهش

	گروه کنترل	**گروه تجربی**
وزن (گرم) موش‌ها قبل از آغاز دوره تمرینی	۲۲۱/۴±۸/۰۶	۲۲۰/۹±۴/۹۴
وزن (گرم) پایانی موش‌ها قبل از تشریح	۳۶۱/۲±۱۵/۵۶	۳۳۱/۲±۳۰



شکل ۱: تاثیر یک دوره فعالیت استقامتی بر بیان ژن PGC-1 آلفا عضله نعلی گروه کنترل و تجربی

= تفاوت میانگین گروه‌ها (تجربی و کنترل) P=۰/۰۰۱



شکل ۲: تاثیر یک دوره فعالیت استقامتی بر بیان ژن PGC-1 آلفا عضله بازکننده بلند انگشتان گروه کنترل و تجربی

= تفاوت میانگین گروه‌ها (تجربی و کنترل) در سطح P=۰/۰۰۶

بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که یک دوره فعالیت استقامتی بلند مدت به‌طور معنی‌داری موجب افزایش میزان بیان ژن PGC-1 آلفا در عضله‌ی کند انقباض یعنی عضله‌ی نعلی و عضله‌ی تند انقباض یعنی عضله‌ی بازکننده بلند انگشتان می‌شود، اما میزان بیان آن در عضله‌ی کند انقباض بیشتر از عضله‌ی تند انقباض بود. در این ارتباط مطالعاتی نیز انجام شده است که نتایج بیشتر آن‌ها با نتایج مقاله‌ی حاضر همخوانی دارد، به‌عنوان مثال آاوی و همکارانش (۲۰۱۰) در مطالعه‌ای گزارش کردند که ۴ هفته دویدن روی تردمیل با پروتکلی فزاینده موجب افزایش بیان ژن PGC-1 آلفا می‌شود ضمن این که گزارش شد بی‌تحرکی موجب کاهش بیان این ژن در بافت‌های فعال می‌شود، این تغییر بیان ژن با تغییرات بیان پروتئین نیز همخوانی داشت، به این معنی که میزان پروتئین PGC-1 آلفا نیز افزایش یافت (۲۶). در فعالیت‌های کوتاه مدت نیز تایید شد که میزان بیان این ژن در پاسخ به فعالیت‌های حاد نیز به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (۲۸و ۲۷, ۱۸). دیده شد حیواناتی که نقص در بیان ژن PGC-1 آلفا داشتند، تعداد میتوکندری‌ها، ظرفیت تنفسی عضلات کند انقباض، ظرفیت تمرین و همچنین شاخص مقاومت در مقابل خستگی کمتری داشتند (۲۹).

اما در توجیه یافته‌های این تحقیق باید گفت فاکتور رونویسی PGC-1 آلفا در فرآیندهای سلولی متعددی مانند سازگاری به تغییرات دما، اکسیداسیون اسید چرب، گلوکونئوژنز و همچنین بیوژنز میتوکندریایی درگیر است، این فرآیندها طی فعالیت‌های بدنی آغاز و با تداوم فعالیت استقامتی به اوج خود می‌رسند (۱۴). فعالیت‌های استقامتی همچنین موجب ایجاد استرس‌های متابولیکی شدید و اختلال انرژی می‌شود که در پایین دست خود فاکتور رونویسی AMPK (AMP-Activated Protein Kinase) را فعال می‌کند. این فاکتور یکی از فاکتور مهم درگیر در فرآیندهای متابولیکی در عضلات اسکلتی است (۳۱و ۳۰). افزایش فعالیت AMPK که در اثر چالش‌های متابولیکی رخ می‌دهد می‌تواند منجر به افزایش PGC-1 آلفا شود (۱۴). فعالیت‌های استقامتی موجب کاهش سطح ATP و افزایش کلسیم درون سلولی می‌شود که این عوامل باعث فعال‌سازی دو تا مسیر یعنی AMPK و CaMK می‌شود (۳۲) فعال‌سازی این دو مسیر منجر به فعال‌سازی رونویسی MEF2 و افزایش سنتز PGC-1 آلفا می‌شود که با تنظیم بیان پروتئین‌های انقباضی و آنزیمی (شرکت کننده در متابولیک) هم باعث افزایش ظرفیت کاری می‌شود و هم انرژی مورد نیاز را برای کار افزایش یافته عضله فراهم می‌آورند (۳۳). با افزایش فعالیت بدنی شدید و در نتیجه مصرف بیشتر ATP، نسبت AMP به ATP افزایش می‌یابد که موجب واماندگی در تولید انرژی می‌شود، که این پدیده آغازی است برای انطباق عضله با شرایط جدید و تلاش برای این انطباق نهایتا منجر به فعال‌سازی AMPK می‌شود (۳۳). تحقیقات نشان داده‌اند که AMPK موجب افزایش بیان ژن PGC-1 می‌شود که تحت تاثیر این روند میزان آن افزایش می‌یابد (۳۴). به نظر می‌رسد که فعالیت استقامتی موجب افزایش مصرف ATP می‌شود که کاهش میزان ATP موجب فعال سازی مسیر AMPK می‌شود در پایین دست این مسیر ژن PGC-1 قرار دارد که از این طریق میزان بیان ژن PGC-1 آلفا در عضله اسکلتی به خصوص نوع کند انقباض که احتمالا بیشتر تحت تاثیر فعالیت استقامتی قرار می‌گیرد افزایش می‌یابد. بنا به یافته پژوهش‌ها یکی از اعمال اصلی ژن PGC-1 آلفا بیوژنز میتوکندری‌ها و در نتیجه تامین آنزیم‌های اکسیداتیو است که این پدیده با افزایش پروتئین‌های انقباضی هم راستا است (۳۳). علاوه بر فاکتور رونویسی AMPK، فاکتور رونویسی MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) در عضلات اسکلتی هم می‌تواند منجر به فعال‌سازی PGC-1 آلفا شود (۳۵و ۱۴). تحقیقات نشان داده‌اند که در اثر فعالیت‌های

ورزشی فعال‌سازی MAPK بیشتر می‌شود (۳۴). یکی دیگر از دلایلی که به نظر می‌رسد منجر به افزایش بیان ژن PGC-1 آلفا می‌شود از طریق افزایش فعالیت MAPK باشد چیزی که تحقیقات نشان داده‌اند در اثر فعالیت بدنی افزایش می‌یابد. مشخص شده که MAPK به‌طور مستقیم فاکتورهای رونویسی بالا دستی PGC-1 مانند ATF2 و MEF2 را فعال می‌کند (۳۵)، که نتیجه نهایی افزایش بیان ژن PGC-1 است، چیزی که نتایج این تحقیق هم آن را تایید کرد.

اما در مورد تفاوت بیان ژن PGC-1 آلفا در عضلات نعلی و بازکننده‌ی بلند انگشتان باید اشاره داشت که میزان PGC-1 آلفا در بافت‌هایی که هوازی (عضله نعلی، قلب و ...) هستند به‌طور طبیعی بسیار بالا است (۲۰). پژوهش‌ها نشان داده‌اند که رونویسی وابسته به فعالیت ورزشی در ژن PGC-1 آلفا به فعالیت MEF2 و cAMP بستگی دارد که تحقیقات نشان داده‌اند بیان این دو فاکتور بر اثر فعالیت‌های استقامتی افزایش می‌یابد، همچنین مشخص شده هم mRNA فاکتور PGC-1 آلفا و هم پروتئین آن در عضلات اسکلتی کند انقباض، فیبرهای اکسیداتیو در مقایسه با تارهای گلیکولیتیک بیشتر بیان می‌شود (۱۳). احتمال دارد افزایش بیان آن در عضله‌ی نعلی ناشی از همین خصوصیت تارهای کند انقباض باشد. به‌این معنی که فارغ از تاثیر فعالیت بدنی میزان این فاکتور به‌طور ذاتی در تارهای کند انقباض بیشتر است بنابراین افزایش بیان آن در این تارها چیز عجیبی نیست. تحقیقات نشان داده‌اند که PGC-1 آلفا برای سازگاری استقامتی نیاز است اما برای تبدیل تارها ضروری نیست (۳۶). هرچند نمی‌توان افزایش بیان ژن را به منزله‌ی افزایش بیان پروتئین (واحد عملکردی) دانست اما به نظر می‌رسد فعالیت‌های استقامتی با افزایش بیان این ژن زمینه را برای سازگاری و انطباق بیشتر عضلات با شرایط جدید فراهم می‌آورد، زیرا این ژن در سازگاری‌های ایجاد شده توسط فعالیت بدنی نقش مهمی را ایفا می‌کند. در نهایت باید گفت که این پژوهش نتوانست میزان بیان پروتئین PGC-1 آلفا را اندازه‌گیری کند، بنابراین در تعمیم یافته‌های این پژوهش به بیان پروتئین باید جانب احتیاط را رعایت کرد. پیشنهاد می‌شود پژوهشی با همین پروتکل تمرینی صورت گیرد و میزان پروتئین این ژن را بعد از دوره‌ی تمرینی مشابه در هر دو عضله‌ی تند و کند انقباض ارزیابی کند. در پایان می‌توان نتیجه گرفت که فعالیت استقامتی موجب ایجاد تغییر در بیان ژن PGC-1 آلفا می‌شود، به این معنی که میزان بیان ژن PGC-1 آلفا در عضله‌ی کند انقباض و در عضله‌ی تند انقباض افزایش می‌یابد و به نظر می‌رسد تاثیر این اثر در عضلات کند انقباض بیشتر است.

References

1- Fathi M, Rahmani Nia F, Moradpoorian MR, Asgari M, Rezaee R. The relationship between maximum aerobic power and coronary heart disease risk factors. W J Sport Sci. 2009; 2: 01-6.

2- Gaeini A, Javidi M, Kordi M, Soleimani M, Fallahi A. The effect of 8 weeks of high intensity interval training on mir-29 gene family expression and cardiac hypertrophy of healthy male rats. *J Zanjan Univ Med Sci*. 2015; 23: 14-24.

3- Fathi M, Gharakhanluo R, Solimani M, Rajabi H, Rezai R. The study of timing series response of microRNA-1 expression to resistance exercise in slow and fast muscles of Wistar male rats. *J Sport Biomotor Sci*. 2013; 9: 5-15.

4- Fathi M, Gharakanlou R, Abroun S, Mokhtari-Dizaji M, Rezaei R. The evaluation of

cardiac changes following endurance training in male wistar rats. yafteh (in persian). 2014; 15: 112-23.

5- Russell AP, Lamon S, Boon H, et al. Regulation of miRNAs in human skeletal muscle following acute endurance exercise and short-term endurance training. *J Physiol.* 2013; 591: 4637-53.

6- Allen DG, Lamb GD, Westerblad H. Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiol Rev.* 2008; 88: 287-332.

7- Adhihetty PJ, Irrcher I, Joseph AM, Ljubicic V, Hood DA. Plasticity of skeletal muscle mitochondria in response to contractile activity. *Exp Physiol.* 2003; 88: 99-107.

8- Hood DA. Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985). 2001; 90: 1137-57.

9- Lira VA, Benton CR, Yan Z, Bonen A. PGC-1alpha regulation by exercise training and its influences on muscle function and insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010; 299: 145-61.

10- Liang H, Ward WF. PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. Adv Physiol Educ. 2006; 30: 145-51.

11- Puigserver P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev.* 2003; 24: 78-90.

12- Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab.* 2005; 1: 361-70.

13- Lin J, Wu H, Tarr PT, et al. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature.* 2002; 418: 797-801.

14- Yan Z. Exercise, PGC-1α, and metabolic adaptation in skeletal muscle. *Apply Physiol Nut Metab.* 2009; 34: 424-7.

15- Dillon LM, Rebelo AP, Moraes CT. The role of PGC-1 coactivators in aging skeletal muscle and heart. *IUBMB Life.* 2012; 64: 231-41.

16- Tadaishi M, Miura S, Kai Y, et al. Effect of exercise intensity and AICAR on isoform-specific expressions of murine skeletal muscle PGC-1alpha mRNA: a role of beta-adrenergic receptor activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011; 300: 341-9.

17- Pilegaard H, Saltin B, Neufer PD. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1alpha gene in human skeletal muscle. *J Physiol.* 2003; 546: 851-8.

18- Baar K, Wende AR, Jones TE, et al. Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB J.* 2002; 16: 1879-86.

19- Safdar A, Little JP, Stokl AJ, Hettinga BP, Akhtar M, Tarnopolsky MA. Exercise increases mitochondrial PGC-1alpha content and promotes nuclear-mitochondrial cross-talk to coordinate

mitochondrial biogenesis. *J Biol Chem.* 2011; 286: 10605-17.

20- Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM, Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest.* 2000; 106: 847-56.

21- Jin H, Yang R, Li W, et al. Effects of exercise training on cardiac function, gene expression, and apoptosis in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 279: 2994-3002.

22- 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: 39-44.

23- 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: 1301-10.

24- 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: 753-60.

25- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the $2^{-\delta\delta ct}$ method. methods. 2001; 25: 402-8.

26- Aoi W, Naito Y, Mizushima K, et al. The microRNA miR-696 regulates PGC-1 alpha in mouse skeletal muscle in response to physical activity. *Am J Physiol-Endoc M.* 2010; 298: 799-E806.

27- Goto M, Terada S, Kato M, et al. cDNA Cloning and mRNA analysis of PGC-1 in epitrochlearis muscle in swimming-exercised rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 274: 350-4.

28- Norrbom J, Sundberg CJ, Ameln H, Kraus WE, Jansson E, Gustafsson T. PGC-1alpha mRNA expression is influenced by metabolic perturbation in exercising human skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2004; 96: 189-94.

29- Leone TC, Lehman JJ, Finck BN, et al. PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol.* 2005; 3: 101-10.

30- McGee SL, Howlett KF, Starkie RL, Cameron-Smith D, Kemp BE, Hargreaves M. Exercise increases nuclear AMPK alpha2 in human skeletal muscle. *Diabetes.* 2003; 52: 926-8.

31- Steinberg GR, Kemp BE. AMPK in Health and disease. *Physiol Rev.* 2009; 89: 1025-78.

32- Richter EA, Ruderman NB. AMPK and the biochemistry of exercise: implications for human health and disease. *Biochem J.* 2009; 418: 261-75.

33- Czubryt MP, Olson EN. Balancing contractility and energy production: the role of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) in cardiac hypertrophy. *Recent Prog Horm Res.* 2004; 59: 105-24.

34- Terada S, Kawanaka K, Goto M, Shimokawa T, Tabata I. Effects of high-intensity intermittent swimming on PGC-1alpha protein expression in rat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*. 2005; 184: 59-65.

35- Akimoto T, Pohnert SC, Li P, et al. Exercise stimulates PGC-1alpha transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway. *J Biol Chem*. 2005; 280: 19587-93.

36- Akimoto T, Sorg BS, Yan Z. Real-time imaging of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha promoter activity in skeletal muscles of living mice. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004; 287: 790-6.

The Effect of Endurance Activity on *PGC-1 Alpha* Gene Expression in Soleus and Extensor Digitorum Longus Muscles of Adult Male Wistar Rats

Fathi M[1]

[1]Dept. of Physical Education, Faculty of Humanities, Lorestan University, Khorramabad, Iran

***Corresponding Author*:** Fathi M, Dept. of Physical Education, Faculty of Humanities, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

E-mail: fathi.m@lu.ac.ir

Received: 8 Aug 2015 **Accepted:** 28 Dec 2015

Background and Objective: Endurance activity affects muscle gene expression leading to the improvement of its function and effectiveness. Meanwhile, PGC-1 alpha transcription factor increases mitochondrial biogenesis in skeletal muscles. This study was designed to investigate the effect of an endurance activity program on PGC-1 alpha expression gene of fast and slow twitch muscles.

Materials and Methods: 14 male wistar rats weighing 113±20 grams under controlled conditions were housed after familiarization (231±24 grams) and then were randomly assigned to control (n=7) and treatment (n=7) groups. The treatment group performed an endurance activity program (30 m/min, 50 min, and 6 sessions per week for 14-weeks) on a motorized treadmill. 48 hours after the end of the last session, the rats in both groups were anesthetized and sacrificed and the soleus and extensor digitorum longus muscles were removed. Real time RT-PCR was used to determine expression levels of PGC-1 alpha gene. T-test was used to compare the results.

Results: 14 weeks of endurance activity increased PGC-1 *alpha* gene expression in extensor digitorum longus and soleus muscles. The rate of this gene expression in soleus muscle of treatment group was significantly higher (P=0.0001) in comparison to the control group and also in the treatment group extensor digitorum longus muscle was significantly more (P=0.006) than the control group.

Conclusion: Though endurance activity has similar effect on slow and fast twitch *PGC-1 alpha* gene expression, it seems that the intensity of this effect is higher in slow twitch muscle.

Keywords: PGC-1 alpha gene, Endurance activity, Soleus, Extensor digitorum longus