

## تأثیر ۱۴ هفته تمرین استقامتی بر بیان miR-499 بطن چپ رت‌های نر نژاد ویستار

محمد فتحی<sup>۱</sup>، سعید آبرون<sup>۲</sup>

۱. استادیار دانشگاه لرستان

۲. دانشیار دانشگاه تربیت مدرس\*

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۲/۲۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۶/۱۰

### چکیده

هدف این پژوهش، بررسی اثر تمرین استقامتی بر بیان miR-499 بطن چپ بود. بدین منظور، ۱۴ رت تحت شرایط کنترل شده (دما، چرخه روشنایی و تاریکی و دسترسی آزاد به آب و غذا) نگهداری گشته و بعد از آشناسازی با پروتکل تمرینی، به صورت تصادفی به دو گروه کنترل و تجربی تقسیم شدند. گروه تجربی یک برنامه استقامتی ۱۴ هفته‌ای را روی تردمیل اجرا کرد و سپس، ۴۸ ساعت پس از پایان آخرین جلسه تمرینی، بی‌هوش و تشریح شدند. سپس، قلب آن‌ها خارج گشته و بطن چپ جدا شد. میزان هایپرتروفی آن مشخص گردید و با استفاده از روش Real time-PCR، میزان بیان miR-499 در بطن چپ آن‌ها اندازه‌گیری شد. در پایان، با استفاده از آزمون آماری تی، اطلاعات به دست آمده ارزیابی شد. شاخص‌های ارزیابی هایپرتروفی نشان داد که نسبت وزن بطن چپ به وزن بدن گروه تجربی (۲/۳±۰/۱۸) در مقایسه با گروه کنترل (۲/۰۴۹±۰/۱۲)، بیشتر و در سطح  $P=0.05$  معنادار بود. همچنین، نسبت وزن بطن چپ به سطح رویه بدن در گروه تجربی (۰/۱۶۸±۰/۰۰۸) در مقایسه با گروه کنترل (۰/۱۵۳±۰/۰۰۶)، بیشتر و در سطح  $P=0.05$  معنادار بود. در نهایت، میانگین بیان miR-499 در گروه تمرین‌کرده بالاتر از گروه کنترل بود ( $P=0.004$ ). به نظر می‌رسد miR-499 بر هایپرتروفی ناشی از فعالیت استقامتی در قلب، به‌ویژه بطن چپ اثرگذار باشد.

واژگان کلیدی: miR-499، تمرینات استقامتی، قلب، بطن چپ

## مقدمه

بافت‌های عضلانی در پاسخ به محرک‌های گوناگون، دچار تجدید ساختار می‌شوند (۱). بافت قلب از این قاعده مستثنی نیست. از جمله محرک‌های تأثیرگذار بر بافت قلب، تحرک و بی‌تحرکی است که در پاسخ به این عوامل، قلب به ترتیب دچار هایپرتروفی و آتروفی می‌شود (۲،۳). نکته جالب‌تر این است که پاسخ قلب به نوع فعالیت تحمیل‌شده نیز اختصاصی است که نشان‌دهنده دقت و ظرافت پاسخ‌های سلولی - مولکولی به فعالیت‌های بدنی می‌باشد که درحقیقت، ساختار قلب را با مسئولیت‌های عملکردی آن هماهنگ می‌کند. درحالی‌که فعالیت‌های مقاومتی، منجر به افزایش ضخامت دیواره‌های قلب، بدون تأثیر قابل توجهی در حجم داخلی آن در مدل‌های انسانی و حیوانی می‌شود، فعالیت‌های استقامتی عمدتاً باعث افزایش حجم‌های داخلی و همچنین، افزایش دیواره‌های قلب می‌شود. هرچند، این افزایش در دیواره‌ها به اندازه‌ای نیست که در فعالیت‌های مقاومتی رخ می‌دهد (۴،۵)؛ اما این موضوع نشان می‌دهد که پاسخ و سازگاری قلب به محرک‌های گوناگون بسیار کارآمد است.

در سال‌های اخیر، RNAهای غیرکدی به نام microRNA (miRs) کشف شده‌اند که ۲۲ نوکلئوتید طول دارند و با مهار رونویسی و یا تخریب mRNA از بیان ژن جلوگیری می‌کنند (۶) و در تنظیم بیان ژن در سطح پس‌رونویسی نقش دارند (۷،۸)؛ به‌همین دلیل، نقش تنظیم دقیق پاسخ‌های بافتی را به آن‌ها نسبت داده‌اند (۹). این عناصر در بسیاری از فرایندهای سلولی دیگر درگیر هستند (۸). برخی از miRs تنها در بافت عضلانی بیان می‌شود؛ به‌همین دلیل آن‌ها را myomiR می‌نامند (۸). از جمله این myomiR، می‌توان به miR-1، miR-133، miR-206 و miR-499 اشاره کرد که در شماری از فرایندهای عضلانی درگیر هستند (۸)؛ به‌عنوان مثال؛ miR-133 در تکثیر و تمایز سلول‌ها در دوران جنینی قلب نقش دارد (۱۰) و با تنظیم فعالیت HDAC4<sup>۲</sup> (فاکتوری که موجب فشردگی کروماتین می‌شود) (۱۱)، Hand2 (فاکتور رونویسی که برای رشد قلب ضروری است) (۱۲) و فاکتور Irf5 (که رپلاریزاسیون قلب را تنظیم می‌کند) (۱۳)، به ترتیب تمایز سلول‌های قلب، رشد بطنی و هدایت‌پذیری قلب را تعدیل می‌کند (۸). به این ترتیب می‌توانند عملکرد قلب (مانند هدایت سیگنال‌های الکتریکی قلب، رشد، ساختار و انقباض عضله قلب) را تنظیم کنند. این عناصر در بیماری‌های قلبی نیز تأثیر دارند و حتی ممکن است با دست‌کاری آن‌ها بتوان به راه‌حل‌های درمانی دست یافت (۱۴). یکی دیگر

- 
1. Fine tuning
  2. Histone deacetylases 4
  3. Heart- and neural crest derivatives-expressed 2

از این myomiR موجود در اینترون ۱۹، ژن myh7b، miR-499 است (۱۵). بیان این دو به وسیله هورمون تری‌یدوتیرونین<sup>۱</sup> (T3) کنترل می‌شود (۱۶). در شرایط پاتولوژی قلب و همچنین ایسکمی، میزان بیان miR-499 کاهش می‌یابد (۱۷)؛ اما ناک‌دان کردن<sup>۲</sup> بیان درونزای miR-499 بر ساختار و عملکرد قلب تأثیرگذار است. miR-499، تقسیم میتوکندری‌ها در قلب را تسهیل می‌کند (۱۷) و می‌تواند در درمان نارسایی قلبی تأثیر مثبتی داشته باشد (۱۸).

از طرف دیگر، چند پژوهش که با رویکرد فعالیت بدنی به بیان miRs در بافت عضلانی پرداخته است نشان داده‌اند که فعالیت‌های بدنی (استقامتی و مقاومتی)، بر بیان miRs و myomiRs (حداقل در عضلات اسکلتی اثر می‌گذارند)؛ به‌عنوان مثال، مک کارتی<sup>۴</sup> و همکارانش (۲۰۰۷) نشان دادند که miR-1 و miR-133 در پاسخ به یک دوره اضافه‌بار عملکردی<sup>۵</sup> در عضلات نعلی و پلانترایس کاهش می‌یابد. در حالی که miR-206 به‌طور معناداری افزایش می‌یابد (۱۹). در پژوهشی دیگر گزارش شد که یک جلسه تمرین استقامتی، باعث افزایش بیان معنادار miR-1 و miR-108 عضلات تمرین‌کرده می‌شود (۲۰). در پژوهش‌های نیلسن<sup>۶</sup> (۲۰۱۰)، مک کارتی (۲۰۰۷) و درآموند<sup>۷</sup> (۲۰۰۸)، تأثیرپذیری miRs از فعالیت بدنی تأیید شده است (۱۹، ۲۱، ۲۲)؛ اما در ارتباط با بافت عضله قلب، تنها یک پژوهش توسط سوسی<sup>۸</sup> (۲۰۱۱) انجام شد که در آن دیده شد رت‌هایی که دو نوع پروتکل تمرین استقامتی کم‌شدت (۱۰ هفته شنا، پنج روز در هفته به‌مدت یک ساعت) و شدید (همان پروتکل کم‌شدت تا هفته هشتم، از هفته نهم به بعد دو جلسه در روز و از هفته دهم به بعد سه جلسه در روز تمرین نمودند) را اجرا کردند، میزان بیان miR-1 و miR-133 در عضله قلب آن‌ها در اثر هر دو شدت تمرین کاهش می‌یابد. هرچند، تفاوت معناداری در بیان miR-1 و miR-133 در شدت‌های متفاوت تمرینی مشاهده نشد (۲۳). فعالیت‌های بدنی بر بافت قلب و همچنین، بر بیان miRs اثر می‌گذارد و پژوهش‌ها نشان داده است که miR-499 در بافت قلب به‌طور عادی بیان می‌شود و میزان بیان آن بر هایپرتروفی قلب تأثیر می‌گذارد؛ اما تاکنون، پژوهشی بیان آن را به فعالیت‌های استقامتی (از عوامل هایپرتروفیک قلب) ارزیابی نکرده است؛ بنابراین، هدف این پژوهش، ارزیابی تأثیر فعالیت‌های استقامتی بر بیان miR-499 در بافت قلب است.

- 
1. myosin heavy chain 7b
  2. triiodothyronine
  3. Gene knockdown
  4. Mc Carthy
  5. Functional overload
  6. Nielsen
  7. Drummond
  8. Soci

## روش پژوهش

در این پژوهش، اثر ۱۴ هفته فعالیت استقامتی بر بیان miR-499 عضله قلب (بطن چپ) ارزیابی شد. بدین منظور، ۲۰ سر رت صحرائی نر نژاد ویستار با پنج هفته سن از انستیتو پاستور خریداری شد. برای همه آنها شرایط مناسب آزمایشگاهی (دسترسی آزاد به آب و غذای مخصوص رت، چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت و میانگین دما  $22 \pm 3$  درجه سانتی‌گراد) به صورت یکسان تا رسیدن به سن بلوغ در آزمایشگاه حیوانات فراهم شد. در این مدت، رت‌ها در چهار قفس یکسان نگهداری شدند. در پایان این مرحله، میانگین و انحراف استاندارد وزن آنها عبارت بود از  $231 \pm 24$  گرم. سپس، دوره آشناسازی با تمرینات استقامتی آغاز شد که این دوره، ۱۰ روز (پنج جلسه) برای آشنایی با دویدن روی تردمیل (نه متر در دقیقه، پنج دقیقه و چهار روز در هفته) صورت گرفت. در پایان جلسات آشناسازی، به صورت تصادفی به دو گروه (۱۰ سر به عنوان گروه شاهد و ۱۰ سر دیگر به عنوان گروه تمرینی) تقسیم شدند. از گروه تمرینی، سه سر نتوانستند پروتکل را به پایان برسانند؛ بنابراین، تعداد نهایی آنها به ۱۴ سر (هفت سر شاهد و هفت سر تجربی) کاهش یافت.

با استفاده از منابع پیشین، یک پروتکل تمرین استقامتی طراحی شد (۱۹،۲۰)؛ به طوری که منجر به هایپرتروفی قلب و بطن چپ ناشی از تمرینات استقامتی شود. پروتکل (۱۴ هفته، هفته‌ای شش روز) عبارت بود از دویدن روی تردمیل که سرعت، شیب و زمان آن قابل برنامه‌ریزی بود و در انتهای آن، یک شوکر برای جلوگیری از توقف رت‌ها تعبیه شده بود. هر جلسه با یک بخش پنج دقیقه‌ای با سرعت ۱۲ متر در دقیقه برای گرم کردن شروع می‌شد. در جلسه اول، بخش اصلی پروتکل ۱۲ دقیقه بود. به طور هفتگی مدت زمان بخش اصلی پروتکل افزایش یافت (در هفته اول تا سوم، هر روز دو دقیقه به مدت زمان اجرای بخش اصلی پروتکل اضافه می‌شد)؛ به طوری که در پایان روز ۲۳، مدت بخش اصلی پروتکل به ۵۰ دقیقه رسید که با احتساب پنج دقیقه گرم کردن و پنج دقیقه سرد کردن، مدت زمان کلی ۶۰ دقیقه بود. شدت تمرین با سرعت ۲۰ متر در دقیقه شروع شد. سپس، هر هفته دو 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 هفتم تا دهم به تدریج پنج درجه شیب (ابتدای هر هفته تقریباً ۱/۲ درجه شیب) نیز اضافه شد. این پروتکل (۶۰ دقیقه دویدن شامل پنج دقیقه گرم کردن با سرعت ۱۲ متر در دقیقه، ۵۰ دقیقه دویدن با سرعت ۳۰ متر در دقیقه با شیب پنج درجه به عنوان بخش اصلی پروتکل و در نهایت، پنج دقیقه دویدن با سرعت نه متر در دقیقه به عنوان بخش سرد کردن) تا پایان هفته چهاردهم حفظ شد. پروتکل بین ساعات پنج تا هفت بعد از ظهر هر روز اعمال می‌شد.

پژوهش‌های متعددی برای ارزیابی میزان هایپرتروفی قلب، از ارزیابی نسبت وزن بطن چپ به وزن کل قلب، وزن بدن (۲۴) و سطح رویه بدن استفاده کرده‌اند (۲۵)؛ بنابراین، برای تأیید میزان

هایپرتروفی در این پژوهش، از دو شاخص برای نسبی کردن وزن بطن چپ (نرمالایز) استفاده شده است. برای این کار، در حالت بی‌هوشی، وزن و طول بدن حیوان (از دهان تا ابتدای دم) برای محاسبه سطح رویه بدن<sup>۱</sup> (BSA) اندازه‌گیری شد (۲۶). سپس، قلب حیوان خارج گشت و بطن چپ از آن جدا شد که هر دوی آن‌ها (قلب و بطن) به‌طور جداگانه با دقتی تا چهار رقم اعشار با ترازوی دیجیتال (A&D ساخت کشور ژاپن) وزن شدند. BSA رت‌ها با استفاده از فرمول زیر برآورد شد. برای محاسبات موردنظر از برنامه اکسل استفاده شد.

$$BSA = 6.67 \times W^{0.7} \times [0.34 / (\sqrt[3]{W/L})]$$

W = وزن بدن (گرم)

L = طول بدن (سانتیمتر)

مجوز این پژوهش توسط کمیته اخلاق دفتر حمایت از طرح‌های پژوهشی دفتر ریاست جمهوری صادر شد (شماره طرح ۹۰۰۰۷۰۱۴). در زمان ارائه برنامه تمرینی، رت‌هایی که نمی‌توانستند دوره تمرینی را ادامه دهند کنار گذاشته شدند. در هنگام کشتن رت‌ها، 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). به‌طوری‌که رت‌ها کاملاً بی‌هوش گشته و به تحریک‌ها پاسخ ندادند. سپس، تشریح شدند.

برای استخراج RNA از بافت‌های هموزن شده (با استفاده از هاون چینی و نیتروژن مایع)، به ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت داخل میکروتیوب، یک میلی‌لیتر تریزول (اینویترژن)<sup>۲</sup> اضافه شد و پس از مخلوط کردن کامل (پیپتاژ کردن)، به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق نگهداری (انکوبه) شد. سپس، ۰/۲ میلی‌لیتر کلروفرم سرد به آن اضافه گشت و پس از پیپتاژ (۱۵ ثانیه)، حدود دو تا سه دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. در ادامه، میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد با ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ (شرکت اپندورف)<sup>۳</sup> شدند. سپس، مایع رویی به دقت برداشته شد و به یک میکروتیوب RNA ase 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 هم‌زدن ملایم در دمای ۲۰- باقی ماند (اورنایت)<sup>۴</sup>. روز بعد، میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد با دور ۱۲۰۰۰ مجدداً سانتریفیوژ شدند که در این مرحله، یک رسوب سفیدرنگ در ته اکثر میکروتیوب‌ها قابل مشاهده بود. مایع رویی به دقت با سمپلر شرکت اپندورف خارج شد و یک میلی‌لیتر اتانول خالص سرد به آن اضافه

1. Body Surface Area
2. Invitrogen
3. Eppendorff
4. Overnight

گردید و بعد از تکان دادن مختصر به مدت پنج دقیقه، در دمای چهار درجه با دور ۷۵۰۰ سانتریفیوژ شد و در ادامه، مایع رویی به دقت تخلیه گردید و ۱۰ دقیقه فرصت داده شد تا باقی مانده اتانول تبخیر شود و داخل میکروتیوب خشک گردد. بعد از این مرحله، ۵۰ لاند آب تزریقی به هر نمونه اضافه شد و چندبار به آرامی پیپتاژ صورت گرفت. در پایان، غلظت و نسبت جذبی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (شرکت اپندورف) ارزیابی شد که نسبت جذبی ۲۶۰/۲۸۰ 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٪ و نور UV) انجام می‌شد (البته، غیر از مرحله‌ای که نیاز بود میکروتیوب‌های حاوی مواد، سانتریفیوژ و یا ورتکس شوند). در طی تمامی مراحل، از دستکش لاتکس بدون پودر استفاده می‌شد و به محض نیاز به تعویض، دستکش‌ها تعویض می‌شدند. کیت‌ها دقیقاً قبل از استفاده، از یخچال با دمای ۲۰- خارج می‌شدند و بعد از استفاده، بلافاصله به داخل یخچال منتقل می‌شدند. تمام سمپلرها طبق زمان‌بندی‌های گروه، کالیبره شده بودند.

برای رونویسی RNA به cDNA، کیت سنتز cDNA شرکت اگزیکون<sup>۱</sup> (cat # 203300) استفاده شد و تمام مراحل مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گشت. ترموسایکلر مورد استفاده در این مرحله، متعلق به شرکت اپندورف بود.

برای ارزیابی بیان ژن، از تکنیک ریل تایم پی سی آر<sup>۲</sup> و دستگاه شرکت آپلاید بایوسیستم<sup>۳</sup> استفاده شد. سایبر گرین مستر میکس<sup>۴</sup> استفاده شده در این مرحله، متعلق به شرکت اگزیکون با Cat # 203450 بود. طبق دستورالعمل کیت، برای یک نمونه، ۱۰ لاندای ترکیبی از مستر میکس (پنج لاند)، پرایمر (یک لاند) و چهار لاند cDNA رقیق شده (یک به ۸۰) در نظر گرفته شد و میزان بیان miR-499 با استفاده از روش نسبی ارزیابی گردید. در هر رن<sup>۵</sup>، یک نمونه به عنوان کنترل منفی برای تعیین آلودگی مستر میکس (طبق دستورالعمل شرکت آپلاید بایوسیستم، نباید آستانه سیکل<sup>۶</sup> (CT) آن کمتر از ۳۵ باشد) در نظر گرفته شد و کنترل داخلی (U6)، کنترل مثبت (گروه کنترل) و miR-499 هم‌زمان در یک رن ارزیابی شد. نمونه‌ها به صورت دوتایی<sup>۷</sup> ارزیابی شدند. بعد از به دست آوردن CT دوتایی برای هر نمونه، میانگین آن‌ها محاسبه شد. لازم به ذکر است در برخی موارد نیاز بود که تست دوباره تکرار شود که در صورت نیاز این تکرار انجام می‌شد. در صورتی که CT پرتی مشاهده

1. Exiqon
2. Real Time PCR
3. Applied biosystem
4. SYBR green master mix
5. Run
6. Cycle threshold
7. Duplicate

می‌شد، همراه با نمونه کنترل آن، از پژوهش حذف می‌گردیدند. بعد از انتقال اطلاعات به نرم‌افزار اکسل، طبق فرمول  $2^{-\Delta\Delta ct}$  میزان بیان miR-499 محاسبه شد (۲۷). مشخصات پرایمرهای استفاده شده در جدول ۱ آمده است. پرایمرهای miR-499 و رفرنس<sup>۱</sup> U6، از شرکت اگزیکون تهیه شد. توالی miR-499 عبارت است از: UUAAGACUUGCAGUGAUGUUU

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش

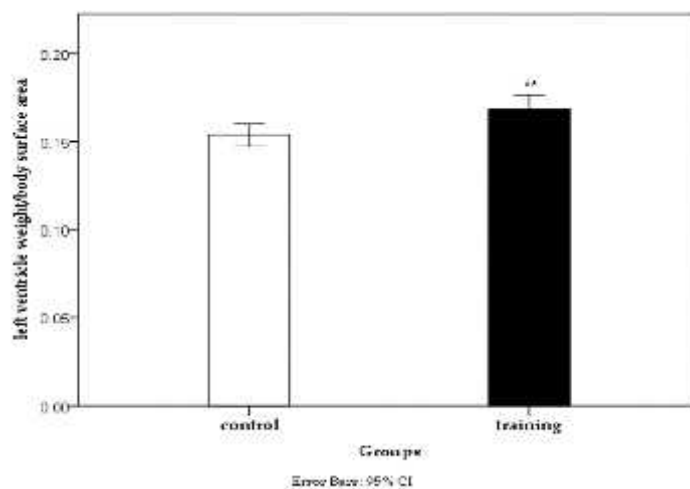
miR-499	204102, hsa-miR-499-5p, LNA <sup>TM</sup> PCR primer set, UniRTmiRCURY LNA <sup>TM</sup> Universal RT microRNA PCR, microRNA primer set, 200 rxns
U6	203907, U6 snRNA (hsa, mmu, rno) PCR primer set, UniRT. miRCURY LNA <sup>TM</sup> Universal RT microRNA PCR, reference gene primer set. NCBI Symbol U6snRNA, NCBI Accesion: x59362

داده‌های به دست آمده از دستگاه ریل تایم پی سی آر که به صورت CT (میانگین CT برای هر نمونه) بودند، با استفاده از نرم‌افزار اکسل به  $\Delta\Delta ct$  تبدیل شدند و سپس، با استفاده از فرمول  $2^{-\Delta\Delta ct}$  اعداد نهایی به دست آمد. با انتقال این اعداد به نرم‌افزار اس.پی.اس.اس، ابتدا طبیعی بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو - ویلکس ارزیابی گردید و مشخص شد که داده‌ها دارای توزیع طبیعی هستند. بعد از تعیین طبیعی بودن توزیع داده‌ها، برای تعیین اختلاف میانگین‌ها از آزمون تی تک‌نمونه‌ای استفاده شد.

## نتایج

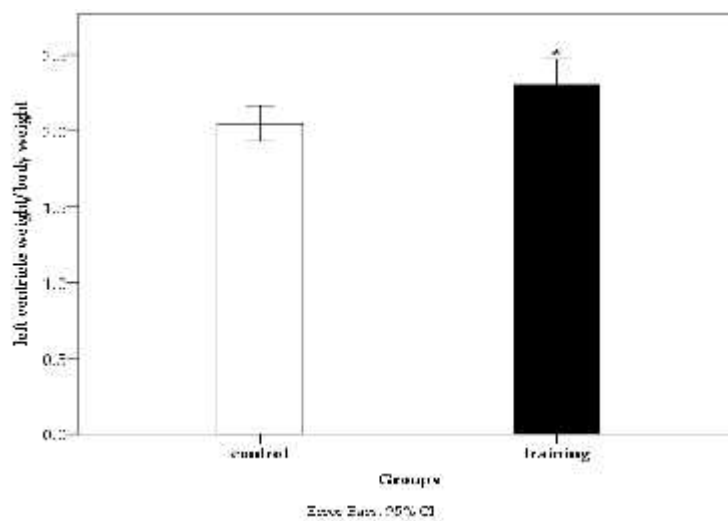
نتایج نشان داد در اثر ۱۴ هفته تمرین استقامتی، هایپرتروفی در بطن چپ رخ می‌دهد که این هایپرتروفی توسط ارزیابی نسبت وزن بطن چپ به وزن بدن و سطح رویه بدن تأیید شد که نمودار آن‌ها در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده است. شاخص‌های وزنی نشان داد که وزن قلب و بطن چپ جدا شده گروه تجربی، بیشتر از گروه کنترل است. این شاخص‌ها بیانگر این بود که بطن چپ رت‌های گروه تجربی، بزرگتر از گروه کنترل است. به این صورت که نسبت وزن بطن چپ به وزن بدن گروه تجربی  $(2/3 \pm 0/18)$  در مقایسه با گروه کنترل  $(2/049 \pm 0/12)$ ، بیشتر و در سطح  $P=0.05$  معنادار بود و نسبت وزن بطن چپ به BSA در گروه تجربی  $(0/168 \pm 0/08)$  در مقایسه با گروه کنترل  $(0/153 \pm 0/06)$ ، بیشتر و در سطح  $P=0.01$  معنادار بود. در نهایت، نتایج آزمون تی  $(t=146.5)$  نشان داد که میانگین بیان miR-499 بطن چپ گروه تجربی نسبت به گروه کنترل در اثر ۱۴ هفته تمرین استقامتی،  $1/38$  برابر افزایش می‌یابد که این افزایش در سطح  $P=0.004$  معنادار بود (شکل ۳).

### 1. Housekeeping



شکل ۱- نسبت وزن بطن چپ به سطح رویه بدن برای ارزیابی هایپرتروفی در گروه تمرین کرده (ستون سیاه) و گروه کنترل (ستون روشن)

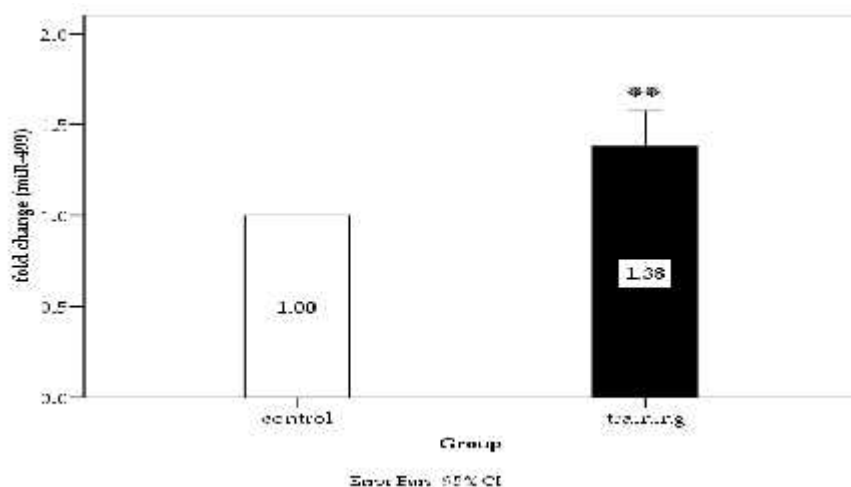
\*\* معناداری در سطح  $P = 0.01$



شکل ۲- میانگین نسبت‌های وزن بطن چپ به وزن بدن برای تایید هایپرتروفی بطن چپ ناشی از تمرین استقامتی در رت‌هایی گروه تمرینی (ستون سیاه) و گروه کنترل (ستون روشن)

\* معناداری در سطح  $P = 0.05$





شکل ۳- تأثیر یک دوره تمرین استقامتی بر بیان miR-499 عضله قلب در گروه کنترل و تجربی

\*\* تفاوت میانگین گروه‌ها (تجربی و کنترل) در سطح 0.01 P

### بحث و نتیجه‌گیری

برای اولین بار بود که مشخص شد فعالیت استقامتی موجب افزایش بیان miR-499 می‌شود که این افزایش بیان، با هایپرتروفی فیزیولوژیکی قلب همراه بود. miR-499 در اینترون ۱۹ ژن Myh7b (ایزوفرم کند انقباض زنجیره سنگین میوزین) قرار دارد و بیان آن‌ها در عضله قلب، بالا است که به موازات هم بیان می‌شوند (۱۵). در حالت عادی، miR-499 در قلب به مقدار زیادی بیان می‌شود؛ اما در شرایط پاتولوژی قلب و همچنین، در ناحیه‌ای از بافت قلب که دچار ایسکمی شده است، بیان miR-499 کاهش می‌یابد (۱۷). می‌دانیم که فعالیت استقامتی همانند شرایط پاتولوژیک، موجب افزایش هایپرتروفی قلب می‌شود (۳)؛ اما هایپرتروفی القاشده به وسیله فعالیت‌های بدنی، موجب افزایش کارایی قلب می‌شود (۲۸، ۲۹). در صورتی که در هایپرتروفی پاتولوژیک، عملکرد قلب کاهش می‌یابد (۲۴، ۳۰). در رت‌های ترانس ژنیک برای miR-499، ارزیابی برخی شاخص‌ها (مانند نسبت وزن قلب به وزن بدن، نسبت وزن قلب به سطح مقطع بدن، میزان کلاژن و ابعاد حفره قلب) نشان‌دهنده بهبود عملکرد قلب و تجدید ساختار آن بود (۱۵)؛ به این معنی که افزایش بیان miR-499، موجب بهبود عملکرد آن می‌شود. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که در هایپرتروفی پاتولوژیک و ایسکمی، میزان بیان miR-499 کاهش می‌یابد. بر این اساس، به نظر می‌رسد افزایش بیان miR-499 در اثر فعالیت‌های استقامتی - چیزی که در این پژوهش مشاهده شد - نشانه‌ای است بر نقش مثبت فعالیت

استقامتی بر بافت بطن چپ در حیوانات تمرین کرده. پژوهشی درمورد تعامل فعالیت‌های استقامتی و بیان miR-499 یافت نشد؛ اما دست‌کاری‌های ژنی مانند ناک‌دان کردن و بیان درون‌زای miR-499 موجب تجدید ساختار معیوب قلب، افزایش رسوب کلاژن، هایپرتروفی، بزرگ‌تر شدن ابعاد حفره قلب و همچنین، نقص در عملکرد قلب می‌شود. به‌علاوه، مشخص شد که miR-499 موجب تقسیم میتوکندری‌ها در قلب می‌شود (۱۷) و در تمایز سلول‌های آغازگر قلب، همراه با miR-1 مشارکت دارد (۳۱). به‌نظر می‌رسد miR-499 و فعالیت بدنی در خصوص تأثیرگذاری بر افزایش میتوکندری‌های بافت، با هم در تعامل هستند؛ زیرا مشخص شده است که فعالیت‌های استقامتی موجب افزایش تقسیم میتوکندری‌ها و در نتیجه، ازدیاد تعداد آن‌ها می‌شود (۳۲). miR-499 می‌تواند تأثیر مثبتی در درمان نارسایی قلبی داشته باشد (۱۸). البته، باید بین دست‌کاری ژنی و تأثیر فعالیت بدنی تفاوت قائل شد؛ زیرا، فعالیت‌های بدنی با دوره‌های استراحتی دنبال می‌شوند که فرصتی است برای بازسازی و تجدید ساختار سازگارانه بافت. می‌دانیم که miRs، در حقیقت سرکوب‌کننده‌های ژن هستند و از طریق اتصال به mRNA، موجب تخریب یا مهار ترجمه آن‌ها می‌شوند (۳۳، ۳۴). mRNA هدف miR ممکن است فاکتورهای فعال‌کننده رونویسی یا سرکوب‌کننده رونویسی باشند که این mRNA را ژن هدف<sup>۱</sup> می‌نامند. از ژن‌های هدف miR-499 می‌توان به ژن *Thrap1*<sup>۲</sup> اشاره کرد (۱۶).

فاکتور Pur، سرکوب‌کننده بیان  $\alpha$ MHC است. ناحیه غیرترجمه‌ای 3' Pur mRNA دارای یک جایگاه اتصالی برای miR-499 می‌باشد. به این معنی که این ژن توسط miR-499 مهار می‌شود (۳۵). مقادیر ایزوفرم  $\alpha$ MHC در زمان نارسایی قلبی و هایپرتروفی پاتولوژیکی کاهش می‌یابند؛ به طوری که تقریباً غیرقابل ردیابی هستند (۳۶). به‌نظر می‌رسد فعالیت بدنی از طریق افزایش بیان miR-499 موجب افزایش بیان  $\alpha$ MHC می‌شود. به این صورت که miR-499، ژن هدف خود یعنی Pur را سرکوب می‌کند. کاهش میزان Pur (سرکوب‌کننده بیان  $\alpha$ MHC) (۳۷) موجب افزایش بیان ژن  $\alpha$ MHC می‌شود که فرایندی است بر خلاف آنچه که در هایپرتروفی نوع پاتولوژیکی رخ می‌دهد (۴). فعالیت ATPase نوع  $\alpha$ MHC بیشتر است؛ به همین دلیل، سرعت کوتاه‌شدن سریع‌تری دارد و تعداد بیشتر این ایزوفرم در قلب، به معنی مقاومت سیستمیک کمتر و ظرفیت ذاتی بیشتر برای ایجاد جریان خون است (۳۸)؛ رویدادی که در اثر سازگاری قلب با فعالیت بدنی رخ می‌دهد و موجب کارایی قلب، به‌ویژه در بطن چپ می‌شود.

- 
1. Target gene
  2. Purine-rich element binding protein
  3. T3 receptor associated protein-1

از دیگر ژن‌های هدف miR-499 می‌توان به ژن thrap1 اشاره کرد که تعدیل‌کننده سیگنال هورمون تیروئید می‌باشد و در تنظیم پاسخ MHC و پاسخ برنامه ژن میوفیبریل به هایپرتیروئیدیسم نقش کلیدی بازی می‌کند (۱۶). این فاکتور، سرکوب‌کننده رونویسی MHC است (۳۹،۴۰). افزایش هورمون تیروئید باعث افزایش بیان MHC و کاهش MHC در عضله قلب می‌شود (۴۱). از آنجایی که این ژن در تنظیم متابولیسم قلب نقش مهمی را ایفا می‌کند (۴۲) و با توجه به تأثیر فعالیت‌های بدنی بر فرایندهای فیزیولوژیکی (۴۳-۴۵)، به نظر می‌رسد سیگنال‌های مرتبط با متابولیسم قلب در اثر چالش‌های متابولیک ناشی از تمرینات استقامتی فعال می‌شوند و ضمن افزایش بیان این ژن، موجب تعدیل بیان MHC و MHC می‌گردند. تأثیر miR-499 بر بیان ژن‌ها، با اندازه‌گیری میزان mRNA و پروتئین آن‌ها بهتر مشخص می‌شود؛ زیرا miR-499، حذف‌کننده بیان ژن و ترجمه (در سطح پروتئین) آن است. این پژوهش، میزان بیان ژن و پروتئین‌های اهداف miR-499 را اندازه‌گیری نکرده است؛ لذا، انجام پژوهشی که میزان mRNA و پروتئین ژن‌های موردنظر در اثر فعالیت‌های استقامتی را در بطن چپ اندازه‌گیری کند توصیه می‌شود؛ زیرا، دورنمای بهتری را از این موضوع ارائه می‌کند.

نتایج این پژوهش نشان داد که فعالیت‌های استقامتی موجب افزایش معنادار بیان miR-499 می‌شود. از آنجاکه عمده تأثیرات miRs پس از ترجمه مشخص می‌شود، احتمال دارد فعالیت بدنی با تأثیر بر بیان miR-499، میزان پروتئین فعال‌کننده‌ها و سرکوب‌کننده‌های رونویسی را تحت تأثیر قرار دهد و موجب تغییر در سطح پروتئین‌های ساختاری و در نتیجه، هایپرتروفی فیزیولوژیک و بهبود عملکرد قلب، به‌ویژه بطن چپ شود.

**پیام مقاله:** به عنوان پیام نهایی این پژوهش می‌توان گفت که احتمالاً بتوان با تغییر و دستکاری سطوح miR-499 در عضلات، هایپرتروفی را در این بافت‌ها ایجاد کرد، اما آیا این هایپرتروفی دقیقاً شبیه هایپرتروفی ناشی از فعالیت بدنی باشد یا نه؟ به پژوهش‌های بیشتری در این مورد نیاز است.

## تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از دفتر حمایت از طرح‌های پژوهشی ریاست جمهوری که منابع مالی این طرح را فراهم کرد تشکر می‌شود.

## منابع

- 1) Potthoff M J, Olson E N, Bassel-Duby R. Skeletal muscle remodeling. Current Opinion in Rheumatology. 2007; 19: 542-9.

- 2) Czubryt M P, Olson E N. Balancing contractility and energy production: the role of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) in cardiac hypertrophy. *Recent Prog Horm Res.* 2004; 59: 105-24.
- 3) Hill J A, Olson E N. Cardiac plasticity. *N Engl J Med.* 2008; 358(13): 1370-80.
- 4) Weiner R B, Baggish A L. Exercise-induced cardiac remodeling. *Progress in Cardiovascular Diseases.* 2012; 54(5): 380-6.
- 5) Pluim B M, Zwinderman A H, Van Der Laarse A, Van Der Wall E E. The athlete's heart: A meta-analysis of cardiac structure and function. *Circulation.* 2000; 101(3): 336-44.
- 6) Williams A H, Liu N, Van Rooij E, Olson E N. MicroRNA control of muscle development and disease. *Current Opinion in Cell Biology.* 2009; 21(3): 461-9.
- 7) Callis T E, Wang D Z. Taking microRNAs to heart. *Trends Mol Med.* 2008; 14(6): 254-60.
- 8) Van Rooij E, Liu N, Olson E N. MicroRNAs flex their muscles. *Trends in Genetics.* 2008; 24(4): 159-66.
- 9) Lee C T, Risom T, Strauss W M. Evolutionary conservation of microRNA regulatory circuits: An examination of microRNA gene complexity and conserved microRNA-target interactions through metazoan phylogeny. *DNA Cell Biol.* 2007; 26(4): 209-18.
- 10) Ivey K N, Muth A, Arnold J, King F W, Yeh R F, Fish J E, et al. MicroRNA regulation of cell lineages in mouse and human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2008; 2(3): 219-29.
- 11) Chen J F, Mandel E M, Thomson J M, Wu Q L, Callis T E, Hammond S M, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nature Genetics.* 2006; 38(2): 228-33.
- 12) Zhao Y, Srivastava D, Samal E. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardio genesis. *Nature.* 2005; 436(7048): 214-20.
- 13) Costantini D L, Arruda E P, Agarwal P, Kim K H, Zhu Y, Zhu W, et al. The homeodomain transcription factor *Irx5* establishes the mouse cardiac ventricular repolarization gradient. *Cell.* 2005; 123(2): 347-58.
- 14) Thum T, Galuppo P, Wolf C, Fiedler J, Kneitz S, Van Laake L W, et al. MicroRNAs in the human heart: A clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation.* 2007; 116(3): 258-67.
- 15) Shieh J T, Huang Y, Gilmore J, Srivastava D. Elevated miR-499 levels blunt the cardiac stress response. *PLoS One.* 2011; 6(5): 19481.
- 16) Van Rooij E, Quiat D, Johnson B A, Sutherland L B, Qi X, Richardson J A, et al. A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Dev Cell.* 2009; 17(5): 662-73.
- 17) Wang J X, Jiao J Q, Li Q, Long B, Wang K, Liu J P, et al. MiR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1. *Nat Med.* 2011; 17(1): 71-8.
- 18) Hosoda T, Zheng H, Cabral-da-Silva M, Sanada F, Ide-Iwata N, Ogórek B, et al. Human cardiac stem cell differentiation is regulated by a mircrine mechanism clinical perspective. *Circulation.* 2011; 123(12): 1287-96.
- 19) McCarthy J J, Esser K A. MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy. *Journal of Applied Physiology.* 2007; 102(1): 306-13.

- 20) Safdar A, Abadi A, Akhtar M, Hettinga B P, Tarnopolsky M A. MiRNA in the regulation of Skeletal muscle adaptation to acute endurance exercise in C57Bl/6J male mice. *PLoS One*. 2009; 4(5): 5610.
- 21) Drummond M J, McCarthy J, Fry C S, Esser K A, Rasmussen B. 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.
- 22) Nielsen S, Scheele C, Yanti C, Akerstrom T, Nielsen A R, Pedersen B K, et al. Muscle specific microRNAs are regulated by endurance exercise in human skeletal muscle. *J Physiol*. 2010; 588(Pt 20): 4029-37.
- 23) Soci U P, Fernandes T, Hashimoto N Y, Mota G F, Amadeu M A, Rosa K T, et al. MicroRNAs 29 are involved in the improvement of ventricular compliance promoted by aerobic exercise training in rats. *Physiol Genomics*. 2011; 43(11): 665-73.
- 24) Zhua S S, Mab J Z, Yong Y H, Niu J, Zhang J N. Left ventricular function in physiologic and pathologic hypertrophy in Sprague–Dawley rats. *Science & Sports*. 2008; 23: 299-305.
- 25) Seo J S, Lee S Y, Won K J, Kim D J, Sohn D S, Yang K M, et al. Relationship between normal heart size and body indices in Korean. *J Korean Med Sci*. 2000; 15(6): 641–646.
- 26) Farriol M, Rossell J, Schwar S. Body surface area in Sprague-Dawley rats. *J Anim Physiol a Anim Nutr*. 1997; 77: 61-5.
- 27) Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*. 2001; 25(4): 402-8.
- 28) Clerk A, Cullingford T E, Fuller S J, Giraldo A, Markou T, Pikkariainen S, et al. Signaling pathways mediating cardiac myocyte gene expression in physiological and stress responses. *J Cell Physiol*. 2007; 212(2): 311-22.
- 29) Seals D R, Hagberg J M, Spina R J, Rogers M A, Schechtman K B, Ehsani A A. Enhanced left ventricular performance in endurance trained older men. *Circulation*. 1994; 89(1): 198-205.
- 30) Pelliccia A, Maron M S, Maron B J. Assessment of left ventricular hypertrophy in a trained athlete: Differential diagnosis of physiologic athlete's heart from pathologic hypertrophy. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 2012; 54(5): 387-96.
- 31) Sluijter J P, Van Mil A, Van Vliet P, Metz C H, Liu J, Doevendans P A, et al. MicroRNA-1 and -499 regulate differentiation and proliferation in human-derived cardiomyocyte progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010; 30(4): 859-68.
- 32) Ljubicic V, Joseph A M, Saleem A, Uguccioni G, Collu-Marchese M, Lai R Y J, et al. Transcriptional and post-transcriptional regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle: Effects of exercise and aging. *Biochemical et Biophysical Acta (BBA) - General Subjects*. 2010; 1800(3): 223-34.
- 33) Cai Y, Yu X, Hu S, Yu J. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*. 2009; 7(4): 147-54.
- 34) Maragkakis M, Alexiou P, Papadopoulos G L, Reczko M, Dalamagas T, Giannopoulos G, et al. Accurate microRNA target prediction correlates with protein repression levels. *BMC Bioinformatics*. 2009; 10(1): 295.

- 35) Van Rooij E, Sutherland L B, Qi X, Richardson J A, Hill J, Olson E N. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science*. 2007; 316(5824): 575-9.
- 36) Miyata S, Minobe W, Bristow M R, Leinwand L A. Myosin heavy chain isoform expression in the failing and nonfailing human heart. *Circ Res*. 2000; 86(4): 386-90.
- 37) Gupta M, Sueblinvong V, Raman J, Jeevanandam V, Gupta M P. Single-stranded DNA-binding proteins PURalpha and PURbeta bind to a purine-rich negative regulatory element of the alpha-myosin heavy chain gene and control transcriptional and translational regulation of the gene expression. Implications in the repression of alpha-myosin heavy chain during heart failure. *J Biol Chem*. 2003; 278(45): 44935-48.
- 38) Barany M. ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *The Journal of General Physiology*. 1967; 50(6) Suppl: 197-218.
- 39) Morkin E. Control of cardiac myosin heavy chain gene expression. *Microscopy Research and Technique*. 2000; 50(6): 522-31.
- 40) Christensen T H, Prentice H, Gahlmann R, Kedes L. Regulation of the human cardiac/slow-twitch troponin C gene by multiple, cooperative, cell-type-specific, and MyoD-responsive elements. *Mol Cell Biol*. 1993; 13(11): 6752-65.
- 41) Gustafson T A, Markham B E, Morkin E. Effects of thyroid hormone on alpha-actin and myosin heavy chain gene expression in cardiac and skeletal muscles of the rat: Measurement of mRNA content using synthetic oligonucleotide probes. *Circ Res*. 1986; 59(2): 194-201.
- 42) Grueter C E, Van Rooij E, Johnson B A, DeLeon S M, Sutherland L B, Qi X, et al. A cardiac microRNA governs systemic energy homeostasis by regulation of MED13. *Cell*. 2012; 149(3): 671-83.
- ۴۳) فتحی محمد، قراخانلو رضا. تاثیر فعالیت استقامتی بر بیان ژن Hand2 بطن چپ رت‌های نر نژاد ویستار. نشریه فیزیولوژی ورزشی. ۱۳۹۴؛ ۷(۲۵): ۵۷-۶۸.
- ۴۴) فلاح‌محمدی ضیا، نظری حسین. تأثیر ۴ هفته تمرین پلیومتریک بر غلظت سرمی فاکتور نروتروفیک مشتق از مغز مردان فعال. نشریه فیزیولوژی ورزشی. ۱۳۹۲؛ ۵(۲۰): ۲۹-۳۸.
- ۴۵) منظمی امیرعباس، رجیبی حمید، قراخانلو رضا. تأثیر تمرین استقامتی بر بیان ژن‌های مبادله‌گر سدیم هیدروژن ۱ (NHE1) و هم انتقال‌دهنده سدیم بی کربنات ۱ (NBC1) در عضلات اسکلتی رت. نشریه فیزیولوژی ورزشی. ۱۳۹۳؛ ۶(۲۲): ۵۵-۶۸.

#### ارجاع دهی به روش ونکوور

فتحی محمد، آبرون سعید. تأثیر ۱۴ هفته تمرین استقامتی بر بیان miR-499 بطن چپ رت‌های نر نژاد ویستار. فیزیولوژی ورزشی. زمستان ۱۳۹۴؛ ۷(۲۸): ۷۲-۵۹.

## The effect of 14 weeks of endurance training on miR-499 expression of left ventricle in wistar male rat

M. Fathi<sup>1</sup>, S. Abroun<sup>2</sup>

1. Assistant Professor at Lorestan University
2. Associate Professor at Tarbiat Modares University \*

Received date: 2014/09/01

Accepted date: 2015/05/19

---

---

### Abstract

The aim of this study was to investigate the effect of endurance training on cardiac expression of miR-499, For this purpose, 14 rats under controlled conditions (temperature, light/dark (12:12) cycle, with ad Libitum access to food and water) were housed and after familiarization with protocol they were randomly assigned into control and Experimental groups. The experimental group performed 14 weeks endurance exercise on motorized treadmill, and then 48 hours after the end of the last session were anesthetized and sacrificed. The heart was removed and then left ventricle was dissected. Real time RT-PCR method was used to determine of expression levels of miR-449 in left ventricle and the obtained data were evaluated using one sample t-test. The hypertrophy evaluation indices showed that the ratio of left ventricle to the body weight in experimental group ( $2.3 \pm 0.18$ ) was significantly ( $P=0.05$ ) higher in compare control group ( $2.049 \pm 0.12$ ) and the ratio of left ventricle to body surface area in experimental group ( $0.168 \pm 0.008$ ) were significantly ( $P=0.01$ ) higher in compare with control group ( $0.153 \pm 0.006$ ). Finally, the mean of miR-499 expression of left ventricle in experimental group was significantly ( $P=0.004$ ) higher than control group. It seems miR-499 expression relate to endurance induce cardiac hypertrophy special in left ventricle.

**Keywords:** miR-499, Endurance training, Heart, Left ventricle

---

---

---

\* Corresponding author

E-mail: abroun@modares.ac.ir