

تأثیر فعالیت استقامتی بر بیان ژن *myh6* و تغییرات ساختاری و عملکردی بطن چپ

محمد فتحی

گروه تربیت بدنی، دانشگاه
لرستان، خرم آباد، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: فعالیت استقامتی، موجب تجدید ساختار قلب می شود. همچنین ژن *myh6* تحت تأثیر تجدید ساختار قلب قرار دارد. این مطالعه با هدف تعیین اثر فعالیت استقامتی بر بیان ژن *myh6* قلب انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ۱۴ موش صحرایی (وزن 24 ± 231 گرم)، بعد از آشناسازی با تمرینات استقامتی، به صورت تصادفی به دو گروه کنترل و تجربی (هر کدام ۷ سر) تقسیم شدند. گروه تجربی یک برنامه استقامتی (۳۰ متر در دقیقه، ۵۰ دقیقه در هر جلسه، ۶ جلسه در هفته و به مدت ۱۴ هفته) روی تردمیل اجرا کرد. حیوانات ۴۸ ساعت پس از پایان آخرین جلسه تمرینی، همراه با گروه کنترل بیهوش و تشریح شدند، سپس قلب و در ادامه، بطن چپ آنها خارج گردید. از روش های Real time-PCR و سونوگرافی به ترتیب برای ارزیابی میزان بیان ژن *myh6* و تغییرات ساختاری بطن چپ استفاده شد. داده ها به کمک آزمون آماری تی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها: در این مطالعه فعالیت استقامتی به طور معنی داری نسبت وزن قلب به سطح رویه بدن ($p=0/002$) را افزایش داد، همچنین قطر پایان دیاستولی ($p=0/008$) در گروه تجربی نسبت به گروه کنترل افزایش نشان داد. نتایج، افزایش ۱۲۴ برابری و معنی دار ($p=0/011$) بیان ژن *myh6* گروه تجربی را نسبت به گروه کنترل نشان داد.

نتیجه گیری: طبق نتایج این مطالعه، فعالیت استقامتی همسو با تغییرات ساختاری و عملکردی در بطن چپ، تغییراتی را در سطح ژن ایجاد می کند و از این طریق قدرت انقباض پذیری قلب را افزایش می دهد.

کلید واژه ها: میوزین زنجیره سنگین؛ فعالیت؛ قلب؛ بطن های قلب.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

محمد فتحی، گروه تربیت بدنی،
دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

fathi.m@lu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۱/۸

تاریخ پذیرش: ۹۴/۳/۲

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Fathi M. The effect of endurance exercise on *myh6* Gene expression and structural and functional changes of left ventricular.
Qom Univ Med Sci J 2016;9(11):22-32. [Full Text in Persian]

مقدمه

سیستم‌های فیزیولوژیکی بدن نسبت به محرک‌های گوناگون سازگار هستند (۱، ۲)، که از جمله می‌توان به فعالیت‌های بدنی، به‌خصوص فعالیت استقامتی اشاره کرد که بر بسیاری از جنبه‌های فیزیولوژیکی بدن (۳) مانند عضلات اسکلتی (۴) و قلبی در سطح پروتئین و ژن تأثیرگذار است (۵)، به‌طوری‌که هم ساختار قلب و هم عملکرد آن را تحت شعاع قرار می‌دهد (۶). در ورزشکاران استقامتی، ظرفیت کاری در زمان فعالیت به‌وسیله افزایش پیش‌بار به‌طور مثبت تحت تأثیر قرار می‌گیرد (۷). همچنین در پی فعالیت استقامتی، بافت قلب علاوه بر سازگاری‌های ساختاری، سازگاری‌های ژنی را نیز تجربه می‌کند (۸)، و بدین‌ترتیب مسیرهای متعدد سیگنالینگ بر اثر فعالیت استقامتی در سلول‌های قلب نیز تحت تأثیر قرار می‌گیرند (۹، ۱۰)، که منتج به تغییر بیان ژن می‌شوند. یکی از این ژن‌ها که در سازگاری قلب به فعالیت‌های استقامتی نقش ارزنده‌ای دارد ژن *myh6* (*myosin, heavy chain 6, (alpha)*) بوده که کدکننده پروتئین زنجیره سنگین میوزین نوع آلفا می‌باشد (۸). میوزین‌ها خانواده‌ای از پروتئین‌های وابسته به ATP هستند که در انقباض عضله اسکلتی و قلبی، نقش اصلی را ایفا می‌کنند (۱۱). حضور آنزیم ATPase در این زنجیره پروتئینی، سرعت انقباض آنها را کنترل می‌کند، به‌طوری‌که میزان فعالیت ATPase نوع آلفا، ۲-۳ برابر فعالیت ATPase نوع بتا می‌باشد (۱۲، ۱۳)، به‌همین دلیل این ایزوفرم‌ها دارای سرعت انقباضی متفاوتی هستند (۱۱). مطالعات نشان داده‌اند سرعت انقباض عضله قلب با ظرفیت هیدرولیز ATP میوزین مرتبط بوده و در حیوانات کوچک که "سرعت کوتاه‌شدن" (Shortening Velocity) عضله قلب بسیار بالا می‌باشد، میزان حضور ایزوفرم نوع آلفا نیز بیشتر است، اما در گونه‌های بزرگتر، میزان آن کمتر است؛ زیرا سرعت کوتاه‌شدن پروتئین‌های انقباضی قلب آنان نسبت به حیوانات کوچکتر، کندتر می‌شود (۱۴، ۱۵). دو ایزوفرم در قلب پستانداران با نام‌های α MHC و β MHC بیان می‌گردد.

در جوندگان بالغ و سالم نوع آلفا که به‌وسیله ژن *myh6* کدگذاری می‌شود ایزوفرم اصلی است (۱۶). پروتئین‌های اعضای خانواده MADS مانند SRF (Serum Response Factor)

و (2) MEF2 (Myocyte Enhancer Factor 2) در تنظیم بیان MHC نقش اصلی را بازی می‌کنند (۱۷). در پی عوامل استرس‌زا مانند دیابت و فشارخون طولانی، نوع آلفا این پروتئین عمدتاً به نوع بتا تبدیل می‌شود، این تغییر خیلی سریع رخ می‌دهد، به‌طوری‌که مشخص شده یک‌هفته بعد از بیماری دیابت ملیتوس، این تغییر در تبدیل نوع تارها آغاز می‌گردد (۱۷)، همچنین در افراد دچار نارسایی قلبی، میزان بیان آن به‌شدت کاهش می‌یابد، به‌طوری‌که ردیابی آن غیرممکن می‌شود (۱۸). عوامل زیادی از جمله هورمون تیروئید (۱۹) و فعالیت بدنی (۱)، بر بیان MHC‌ها تأثیر می‌گذارد. مشاهده شده است در قلب جوندگان، هورمون تیروئید و افزایش فعالیت بدنی موجب افزایش بیان ایزوفرم نوع آلفا می‌شود، در صورتی‌که کاهش میزان هورمون تیروئید، سن، کاردیومیوپاتی و اضافه باری فشاری منجر به افزایش ایزوفرم نوع بتا می‌شود (۱۵، ۲۰). پژوهش‌ها نشان داده‌اند بی‌حرکی (۲۱) و فعالیت (استقامتی و مقاومتی) بر میزان بیان آنها در قلب تأثیر می‌گذارد (۲۲) و متناسب با نوع فعالیت، بیان آن دستخوش تغییر می‌شود (۲۳). فعالیت‌های بدنی، میزان بیان پروتئین MHC را حتی در غیاب تست‌تسترون افزایش می‌دهند (۲۴). با توجه به پژوهش‌های پیشین به‌نظر می‌رسد برای پاسخ به این دو نکته؛ انجام مطالعاتی دقیق، لازم و ضروری است {نکته اول تناقض در نتایج تحقیقات در مورد تأثیر فعالیت بدنی (استقامتی و مقاومتی) بر بیان این ژن (۲۵) و نکته دوم انجام مطالعه‌ای در جهت بررسی سازگاری ژن *myh6* به فعالیت‌های استقامتی بلندمدت و شدید در قلب سالم}. بنابراین، این مطالعه با هدف تعیین سازگاری ژن *myh6* بطن چپ با فعالیت‌های شدید و بلندمدت استقامتی انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، ۲۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با ۵ هفته سن (وزن 113 ± 20 گرم) تهیه‌شده از انستیتو پاستور بررسی گردید. حیوانات به‌صورت یکسان در شرایط مناسب (دسترسی آزاد به آب و غذا، چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت، میانگین دما 22 ± 3 درجه سانتیگراد) در آزمایشگاه حیوانات دانشگاه تربیت مدرس تا رسیدن به سن بلوغ (۸ هفته) در ۴ قفس

یکسان نگهداری شدند. در پایان این مرحله، میانگین و انحراف استاندارد وزن آنها (231 ± 24 گرم) ارزیابی شد. سپس دوره آشناسازی با تمرینات استقامتی آغاز گردید که (۵ جلسه) آشنایی برای دوییدن روی تردمیل (۹ متر در دقیقه، ۵ دقیقه و ۴ روز در هفته) به مدت ۱۰ روز طول کشید، سپس حیوانات به صورت تصادفی به دو گروه کنترل و تجربی (هر کدام ۱۰ سر) تقسیم شدند. از گروه تجربی، ۳ سر نتوانست برنامه تمرینی را به پایان برساند، بنابراین با توجه به روش نسبی اندازه گیری در تکنیک Real time-Pcr، ۳ سر از گروه کنترل به صورت تصادفی کنار گذاشته شد و تعداد نهایی به ۱۴ سر (در هر گروه ۷ سر) کاهش یافت.

با استفاده از منابع پیشین یک برنامه تمرین استقامتی طراحی شد (۲۶، ۲۷). در گروه تجربی برنامه تمرینی به صورت ۱۴ هفته و هفته ای ۶ روز عبارت بود از: دوییدن روی تردمیل که سرعت، شیب و زمان آن قابل برنامه ریزی بود و در انتهای آن نیز یک شوکر برای جلوگیری از توقف تعبیه شده بود، هر جلسه با یک بخش ۵ دقیقه ای با سرعت ۱۲ متر در دقیقه برای گرم کردن شروع شد. در جلسه اول، بخش اصلی برنامه ۱۲ دقیقه بود. به طور هفتگی، مدت زمان بخش اصلی برنامه افزایش یافت؛ بدین صورت که در هفته ۳-۱ هر روز، ۲ دقیقه به مدت زمان اجرای بخش اصلی برنامه اضافه شد، به طوری که در پایان روز بیست و سوم، مدت بخش اصلی برنامه به ۵۰ دقیقه رسید و با احتساب ۵ دقیقه گرم کردن و ۵ دقیقه سرد کردن، مدت زمان کلی ۶۰ دقیقه محاسبه گردید. شدت تمرین با سرعت ۲۰ متر در دقیقه شروع شد. سپس هر هفته ۲ متر بر دقیقه به سرعت افزوده گردید، به طوری که در پایان هفته ششم، سرعت به ۳۰ متر در دقیقه رسید. در نهایت، در طی هفته های هفتم تا دهم، به تدریج ۵ درجه شیب (ابتدای هر هفته تقریباً ۱/۲ درجه شیب) نیز اضافه شد. این برنامه {۶۰ دقیقه دوییدن (شامل ۵ دقیقه گرم کردن با سرعت ۱۲ متر در دقیقه، ۵۰ دقیقه دوییدن با سرعت ۳۰ متر در دقیقه، با شیب ۵ درجه، به عنوان بخش اصلی برنامه و در نهایت، ۵ دقیقه دوییدن با سرعت ۹ متر در دقیقه، به عنوان بخش سرد کردن)} تا پایان هفته چهاردهم حفظ شد. بخش اصلی این برنامه با حدود ۷۰٪، $VO_2 \max$ موش صحراییت اجرا شد (۲۸، ۲۹)، و بین ساعات

۵-۷ بعد از ظهر هر روز اعمال گردید. برای اطمینان از تأثیر برنامه استقامتی بر ساختار قلب، به خصوص بطن چپ با استفاده از منابع پیشین (۳۰)، قطر پایان دیاستولی که تحت تأثیر فعالیت استقامتی قرار می گیرد به وسیله سونوگرافی (m-mode) ارزیابی شد. از آنجایی که حرکت بر مقادیر اولتراسوند اثر می گذارد، موش های صحرایی با میزان کمی از کتامین (۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) (۳۱) بیهوش و در وضعیت خوابیده به پشت قرار داده شدند. ژل اولتراسوند روی قفسه سینه آنها که از قبل آماده شده بود (حذف موها) مالیده شد. اولتراسوند بر پایه روشی که انجمن اکوکاردیوگرافی آمریکا به عنوان راهنما برای ارزیابی قلب ارائه داده است اجرا گردید (۳۲). شاخص ها با استفاده از دستگاه اولتراسوند با اسم تجاری اولتراسونیک (ساخت کشور کانادا) انجام شد. تصاویر با کیفیت ۱۴ مگاهرتز (فرکانس) و عمق ۲/۵ سانتی متر به دست آمد (۳۳). عمل اکوکاردیوگرافی تا جایی که پروب دستگاه روی قفسه سینه بتواند یک m-mode با کیفیت مناسب اسکن کند، ادامه یافت. با استفاده از این روش، ابعاد داخلی بطن چپ (LV) در حین دیاستول (LVEDD) اندازه گیری شد (۳۴). تمام عملیات این مرحله، ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و توسط متخصص اولتراسوند صورت گرفت. ۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرین، حیوانات با ترکیب بالایی از کتامین (۸۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) بیهوش و سپس تشریح شدند.

در حالت بیهوشی کامل، طول بدن حیوان (از دهان تا ابتدای دُم) برای محاسبه سطح رویه بدن (BSA (Body Surface Area) اندازه گیری شد (۳۵). به طور همزمان، قلب حیوان خارج و بطن چپ جدا گردید که هر دو آنها (قلب و بطن) به طور جداگانه با دقتی تا ۴ رقم اعشار با ترازوی دقیق (A&D ساخت کشور ژاپن) وزن شدند. BSA موش ها با استفاده از فرمول زیر برآورد گردید. برای محاسبات مورد نظر از برنامه Excel استفاده شد.

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

L= (طول بدن (سانتی متر)

بعد از این مرحله، ۵۰ لاند آب تزریقی به هر نمونه اضافه و چند بار به آرامی پیتاژ صورت گرفت. در پایان، غلظت و نسبت جذبی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (شرکت Eppendorff) ارزیابی گردید که نسبت جذبی ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر برای تمام نمونه‌ها بین ۱/۸-۱/۶ بود. تمام مراحل کار زیرهودی که از قبل آماده شده بود (استریل شده با الکل ۷۵٪، نور UV و غیر از) که برای آن نیاز بود میکروتیوب‌های حاوی مواد، سانتریفوژ و یا ورتکس شوند) انجام گرفت. در طی مراحل، از دستکش لاتکس بدون پودر استفاده گردید و به محض نیاز، دستکش‌ها تعویض می‌شد. کیت‌ها دقیقاً قبل از استفاده، از یخچال (در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد) خارج و بعد از استفاده به داخل یخچال منتقل شدند. تمام سمپلرها طبق زمان‌بندی‌های گروه، کالبره شدند.

برای رونویسی RNA به cDNA، از کیت شرکت ترموساینتفیک (Thermo Scientific) با Cat # K1621 استفاده شد، و تمام مراحل مطابق دستورالعمل شرکت سازنده با استفاده از Random Hexamer انجام گرفت. ترموسایکلر مورد استفاده در این مرحله متعلق به شرکت Eppendorff بود.

قبل از ارزیابی نهایی بیان ژن، طبق دستورالعمل، میزان کارایی (Efficiency) ژن رفرنس (*gapdh*) و ژن هدف (*myh6*) با استفاده از تکنیک Real Time PCR بررسی گردید. میزان کارایی برای این دو ژن در بالاترین میزان خود، ۱ بود. در ادامه، برای ارزیابی بیان ژن از تکنیک Real Time PCR و دستگاه شرکت آپلاید بایوسستم 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 کارایی ژن رفرنس و هدف، برای یک نمونه ۱۰ لاندایی، ترکیبی از مسترمیکس (۵ لاند) پرایمر (۱ لاند)، cDNA (۱ لاند) و آب مقطر (۳ لاند) در نظر گرفته شد و میزان بیان ژن با استفاده از روش نسبی، ارزیابی گردید. در هر Run (۴۰ سیکلی) یک نمونه به‌عنوان کنترل منفی برای تعیین آلودگی مسترمیکس (طبق دستورالعمل شرکت آپلاید بایوسستم، $CT > 35$) در نظر گرفته شد. کنترل داخلی (*gapdh*)، کنترل مثبت (گروه کنترل) و *myh6* همزمان در یک Run ارزیابی گردید. نمونه‌ها نیز به‌صورت دوتایی (Duplicate) بررسی شدند.

در ادامه، بافت مورد نظر (بطن چپ) بلافاصله در میکروتیوب‌هایی با حجم ۱/۵ میلی‌لیتر با برچسب متناسب با بافت موش صحرایی، جاسازی و وارد تانک نیتروژن شد. بعد از اتمام تشریح و تا شروع هموژن، بافت‌ها در دمای ۸۰- درجه 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.

مجوز این پژوهش توسط کمیته اخلاق دفتر حمایت از طرح‌های پژوهشی ریاست جمهور صادر شد. در زمان ارائه برنامه تمرینی، موش‌هایی که نمی‌توانستند دوره تمرینی را ادامه دهند، کنار گذاشته شدند. هنگام کشتن موش‌ها، با تزریق مقدار مناسبی از کتامین و زایلازین (به ترتیب ۸۰ و ۱۰ میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن)، موش‌ها کاملاً بیهوش شدند، سپس عمل تشریح انجام شد. برای استخراج RNA از بافت‌های هموژن شده، به ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت داخل میکروتیوب، ۱ میلی‌لیتر تریزول (Invitrogen) اضافه و پس از مخلوط کردن کامل (پیتاژ کردن)، به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری انکوبه شدند، سپس ۰/۲ میلی‌لیتر به آن کلروفرم سرد اضافه گردید و پس از پیتاژ (۱۵ ثانیه)، حدود ۳-۲ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند، در ادامه میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفوژ (شرکت Eppendorff) شدند، سپس مایع رویی به دقت برداشته شد و به یک میکروتیوب RNAase free منتقل گردید (از این مرحله به بعد با سرسمپلر فیلتردار کار شد)، سپس با افزودن ۰/۵ میلی‌لیتر ایزوپروپانول سرد و هم‌زدن ملایم، در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد باقی ماند (Overnight). روز بعد میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه، مجدداً سانتریفوژ 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 و ۱ میلی‌لیتر اتانول خالص سرد به آن افزوده شد و بعد از تکان دادن مختصر، به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد با ۷۵۰۰ دور در دقیقه، سانتریفوژ شد، در ادامه، مایع رویی به دقت تخلیه و ۱۰ دقیقه فرصت داده شد تا باقی‌مانده اتانول تبخیر گردد و داخل میکروتیوب خشک شود،

بعد از به دست آوردن CT دوتایی برای هر نمونه، میانگین آنها محاسبه شد. لازم به ذکر است که در برخی موارد، تست مجدداً تکرار می‌شد. بعد از انتقال اطلاعات به نرم‌افزار Excel طبق فرمول: $2^{-\Delta\Delta C}$ ، میزان بیان ژن *myh6* محاسبه گردید (۳۶).

مشخصات پرایمرهای استفاده‌شده در جدول شماره ۱ آمده است. ژن رفرنس در این تحقیق ژن *gapdh* (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) می‌باشد.

جدول شماره ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش

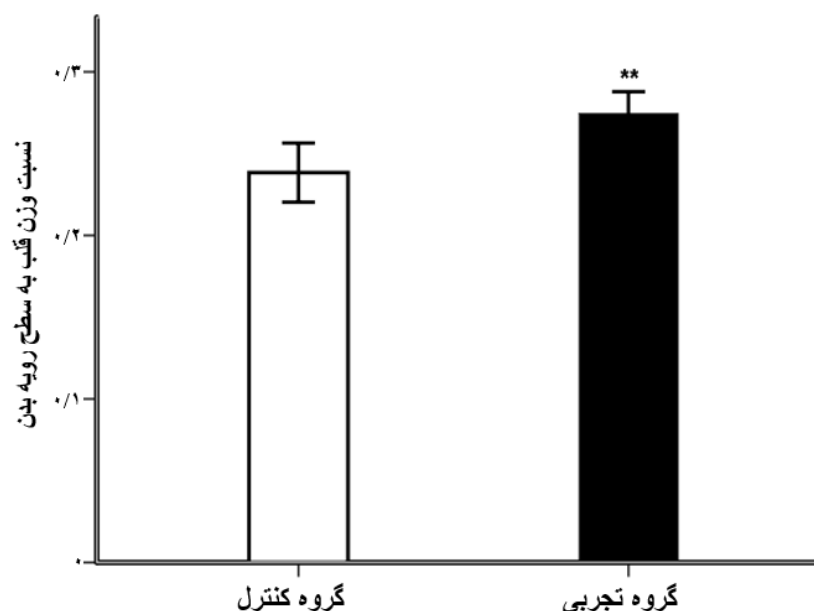
Name		Sequence 5-3	NCBI Reference Sequence	Product size
gapdh	F	AACCCATCACCATCTTCCAG	NM_017008.4	۷۴
	R	CACGACATACTCAGCACCAG		
myh6	F	GGAAGACTGTCAACACGAAG	NM_017239.2	۱۳۰
	R	GGTTAGCCTGGATAATCTGGTC		

این تغییرات حاکی از بهبود معنی‌دار کارایی بطن چپ بود. همچنین فعالیت استقامتی به‌طور معنی‌دار نسبت وزن قلب به سطح رویه بدن را در گروه تجربی (0.274 ± 0.014) نسبت به گروه کنترل (0.238 ± 0.019)، افزایش داد ($p < 0.002$). قطر پایان دیاستولی بطن چپ در گروه تجربی (5 ± 0.719) نسبت به گروه کنترل (3.98 ± 0.135) نیز افزایش معنی‌داری ($p < 0.008$) را نشان داد (نمودار شماره ۱ و ۲). نتایج ارزیابی بیان ژن مشخص کرد یک برنامه ۱۴ هفته‌ای استقامتی منجر به افزایش ۱۲۴ برابری و معنی‌دار ($p < 0.011$) بیان ژن *myh6* گروه تجربی نسبت به گروه کنترل می‌شود (نمودار شماره ۳).

داده‌های به‌دست‌آمده از دستگاه Real time PCR به‌صورت CT (Cycle threshold) (میانگین CT برای هر نمونه)، با استفاده از نرم‌افزار Excel به $\Delta\Delta C$ تبدیل شدند و سپس با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta C}$ ، اعداد نهایی به دست آمد. در نهایت، داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ و آزمون شاپیرو-ویلکس (جهت نرمال بودن توزیع داده‌ها) و آزمون تی (برای تعیین اختلاف میانگین گروه تجربی از گروه کنترل) ارزیابی شدند.

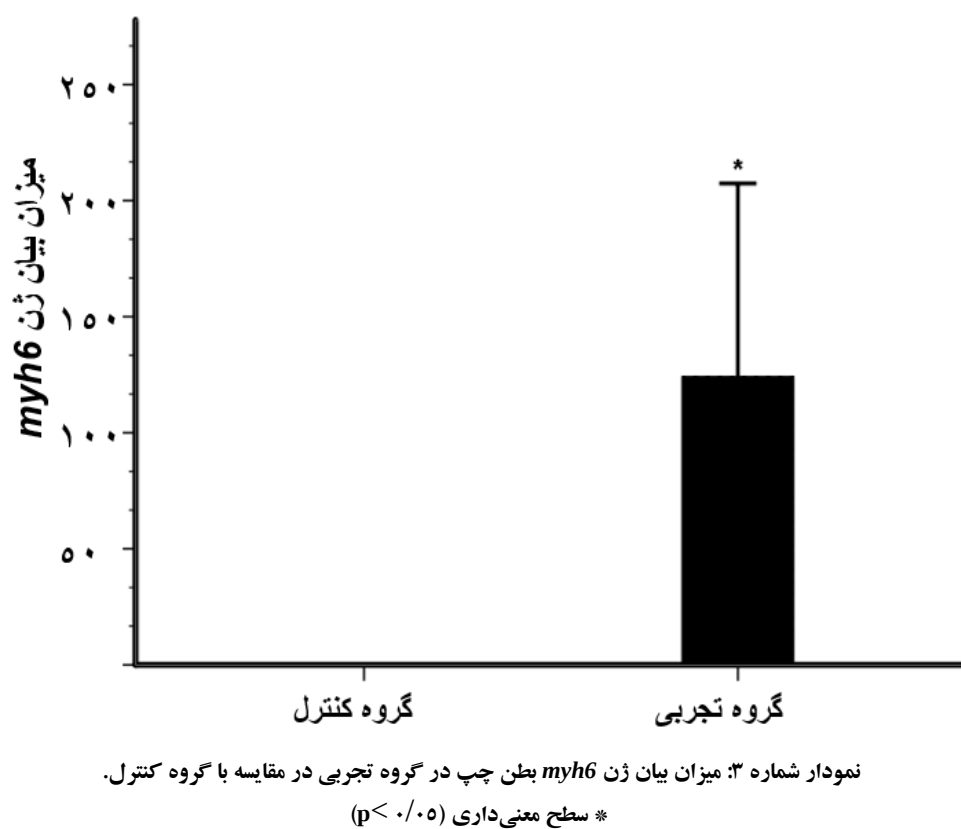
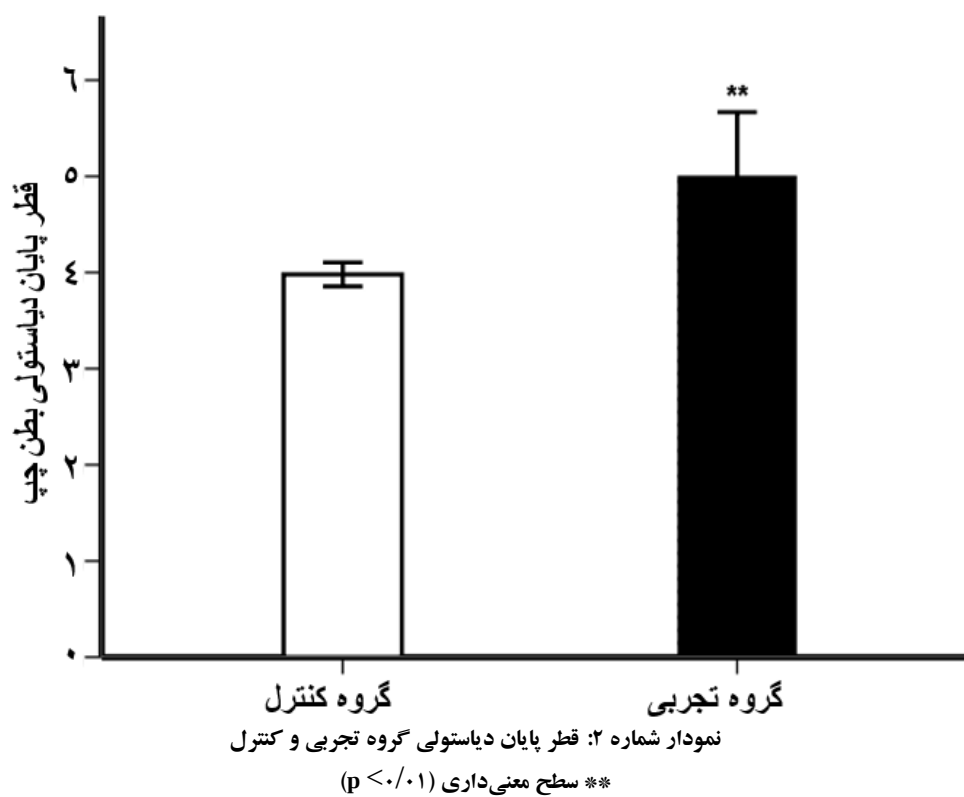
یافته‌ها

در اثر ۱۴ هفته تمرین استقامتی، تغییرات ساختاری در بطن چپ رخ داد.



نمودار شماره ۱: نسبت وزن قلب به سطح رویه بدن (HW/BSA) در موش‌های صحرایی گروه تجربی و کنترل.

** = سطح معنی‌داری ($p < 0.01$)



بحث

نتایج این پژوهش نشان داد وزن قلب نسبت به سطح رویه بدن در گروهی که فعالیت استقامتی دارند بیشتر و قطر پایان دیاستولی بطن چپ نیز در آنها بالاتر است، به طوری که هر دو در سطح $0/01$ معنی دار بودند و این تغییرات با افزایش بیان ژن *myh6* در بطن چپ همراه بود.

پژوهش‌های متعددی روی تجدید ساختار قلب در پاسخ به تمرینات ورزشی متمرکز شده است، که نتایج آنها مطلوب و متفاوت بودن هایپرتروفی ناشی از فعالیت بدنی (هایپرتروفی فیزیولوژیکی) با هایپرتروفی ناشی از عوامل عصبی - هورمونی و یا فشارخون (هایپرتروفی پاتولوژیکی) را تأیید کرده‌اند (۳۷،۶). تمرینات استقامتی، موجب هایپرتروفی نوع استنتریک در ورزشکاران استقامتی می‌شود. این ورزشکاران دارای اندازه قلب بزرگتری هستند (۱)، و تمرینات قدرتی موجب افزایش هایپرتروفی نوع کانستریک بدون نقص بطنی یا کاهش حفره‌ها می‌شود (۳۸)، که عمدتاً هایپرتروفی در این نوع فعالیت‌ها، افزایش ضخامت دیواره بطن‌ها می‌باشد (۳۹).

در پژوهش حاضر، نتایج m-mode نشان داد در گروه تجربی (فعالیت استقامتی)، میانگین قطر داخلی بطن چپ حین دیاستول، به طور معنی داری ($p=0/008$) افزایش می‌یابد. به نظر می‌رسد بار اعمال شده در اثر فعالیت‌های استقامتی بر قلب عمدتاً اضافه بار حجمی است؛ بدین معنی که برگشت خون سیاهرگی بیشتر (ناشی از افزایش حجم خون و پمپ عضلانی)، موجب کشیدگی حفره‌های قلب می‌شود که افزایش حجم داخلی بطن‌ها، به خصوص بطن چپ را در پی داشته (۳۹) و زمانی که قلب به مدت طولانی در معرض این محرک قرار گیرد نسبت به آن سازگار شده و این سازگاری در افزایش حجم داخلی بطن چپ نمود پیدا می‌کند. در پژوهش حاضر نیز این یافته در am-mode به خصوص در شاخص "قطر داخلی بطن چپ در زمان دیاستول" تأیید شد که این ناشی از افزایش حجم داخلی قلب یا همان هایپرتروفی نوع استنتریک در قلب می‌باشد (۳۹).

نتایج این پژوهش نشان داد وزن قلب نسبت به BSA در اثر تمرینات استقامتی افزایش می‌یابد، به طوری که نسبت وزن قلب در گروه تجربی بالاتر از گروه کنترل بود ($p=0/002$)؛ بدین معنی که

"میانگین وزن قلب گروه تجربی به نسبت BSA" در اثر تمرینات استقامتی افزایش یافته بود (نمودار شماره ۱). از آنجایی که BSA تابعی از وزن و طول بدن بوده و ارتباط مستقیمی با میزان سوخت و ساز و در نتیجه برون‌ده قلب دارد، لذا منطقی است قلب هایپرتروفی شده برای رفع نیازهای بدن سازگار شود و افزایش این نسبت (وزن قلب به سطح رویه بدن)، واکنشی طبیعی به نظر می‌رسد.

یکی دیگر از یافته‌های این پژوهش، افزایش ۱۲۴ برابری بیان ژن *myh6* بود که کدکننده زنجیره سنگین میوزین نوع آلفا می‌باشد؛ یعنی همان ایزوفرمی که موجب افزایش انقباض پذیری و بهبود عملکرد قلب می‌شود (۱۴). در پژوهش‌ها، یکی از نشانه‌های هایپرتروفی پاتولوژیک، افزایش بیان β MHC و کاهش شدید بیان نوع α می‌باشد، به طوری که ردیابی بیان آن غیرممکن است (۴۰) در پی این نارسایی، کارایی قلب شدیداً کاهش یافته (۴۱)، و این کاهش در حجم پایان دیاستولی قلب ظاهر می‌شود. همسو با این مطالعه، Iemitsu و همکاران (سال ۲۰۰۱) مشخص کردند فعالیت بدنی موجب افزایش بیان نسبت ایزوفرم نوع آلفا به بتا می‌شود که برآیند آن افزایش میوزین نوع تند است (۴۰). به نظر می‌رسد بطن چپ برای غلبه بر پیش‌بار افزایش یافته (حجم خون پایان دیاستولی که در افزایش قطر پایان دیاستولی بطن چپ نمایان می‌شود) و متناسب با تغییرات ساختاری ایجاد شده (افزایش وزن قلب نسبت به سطح رویه بدن)، در سطح سلولی نیز سازگار می‌شود. بنابراین، این سازگاری می‌تواند تحت تأثیر فاکتورهایی از قبیل فاکتورهای رونویسی SRF و MEF2 رخ دهد؛ زیرا مطالعات نشان داده‌اند فعالیت استقامتی موجب فعال‌سازی این فاکتورهای رونویسی می‌شوند (۴۲)، ضمن اینکه، این فاکتورها بر بیان زنجیره سنگین میوزین تأثیر گذارند (۴۳). با توجه به آنچه که ذکر شد، می‌توان نتیجه گرفت فعالیت‌های استقامتی، موجب ایجاد تغییرات ساختاری و عملکردی در قلب، به خصوص بطن چپ می‌شود. برای انطباق با این شرایط، فاکتورهای رونویسی مانند SRF و MEF2 نیز فعال می‌شوند که در پایین دست این فاکتورها، ژن *myh6* قرار دارد. این پژوهش نتوانست میزان پروتئین این ژن را اندازه‌گیری کند، لذا نمی‌توان یافته‌های ژنی این پژوهش را به بیان پروتئین تعمیم داد.

بنابراین، پیشنهاد می‌گردد تا در یک مطالعه دیگر، ضمن بررسی اثرات ساختاری ناشی از فعالیت استقامتی در بطن چپ، میزان بیان پروتئین α MHC نیز ارزیابی شود.

ساختاری و عملکردی در بطن چپ متناسب با تغییرات ژنی، زمینه را برای بهبود عملکرد قلب فراهم می‌کند، از جمله افزایش بیان ژن *myh6* که از این طریق قدرت انقباض پذیری قلب را افزایش می‌دهد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت فعالیت استقامتی منجر به هایپرتروفی قلبی نوع فیزیولوژیک می‌شود که برآیند این پدیده، بهبود کارایی عملکرد قلب را در پی خواهد داشت.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد فعالیت استقامتی همسو با تغییرات

References:

- Hill JA, Olson EN. Cardiac plasticity. *N Engl J Med* 2008;358(13):1370-80.
- Cooke SF, Bliss TV. Plasticity in the human central nervous system. *Brain* 2006;129(7):1659-73.
- Holloszy JO, Coyle EF. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *J Appl Physiol* 1984;56(4):831-8.
- Fathi M, Gharakhanloo 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(1):5-15. [Full Text in Persian]
- Fathi M, Gharakanlou R, Rezaei R. The effect of 14-week endurance training on left ventricle HDAC4 gene expression of Wistar male rat. *Sport Biomotor Sci* 2014;11(1):1-15. [Full Text in Persian]
- Zhua SS, Mab JZ, Yong YH, Niu J, Zhang JN. Left ventricular function in physiologic and pathologic hypertrophy in Sprague-Dawley rats. *Sci Sports* 2008;23(6):299-305.
- D'Andrea A, Limongelli G, Caso P, Sarubbi B, Della Pietra A, Brancaccio P, et al. Association between left ventricular structure and cardiac performance during effort in two morphological forms of athlete's heart. *Int J Cardiol* 2002;86(2-3):177-84.
- Czarkowska-Paczek B, Zendzian-Piotrowska M, Bartłomiejczyk I, Przybylski J, Gorski J. The effect of acute and prolonged endurance exercise on transforming growth factor-beta1 generation in rat skeletal and heart muscle. *J Physiol Pharmacol* 2009;60(4):157-62.
- Iemitsu M, Maeda S, Jesmin S, Otsuki T, Miyauchi T. Exercise training improves aging-induced downregulation of VEGF angiogenic signaling cascade in hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291(3):1290-8.
- Weeks KL, McMullen JR. The athlete's heart vs. The failing heart: Can signaling explain the two distinct outcomes? *Physiology (Bethesda)* 2011;26(2):97-105.
- Kolomeisky AB, Fisher ME. Molecular motors: A theorist's perspective. *Annu Rev Phys Chem* 2007;58:675-95.
- Litten RZ, Martin BJ, Low RB, Alpert NR. Altered myosin isozyme patterns from pressure-overloaded and thyrotoxic hypertrophied rabbit hearts. *Circ Res* 1982;50(6):856-64.
- Harris DE, Work SS, Wright RK, Alpert NR, Warshaw DM. Smooth, cardiac and skeletal muscle myosin force and motion generation assessed by cross-bridge mechanical interactions in vitro. *J Muscle Res Cell Motil* 1994;15(1):11-9.
- Barany M. ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J Gen Physiol* 1967;50(6):197-218.
- Herron TJ, Korte FS, McDonald KS. Loaded shortening and power output in cardiac myocytes are dependent on myosin heavy chain isoform expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281(3):1217-22.

16. Dillmann WH. Diabetes mellitus induces changes in cardiac myosin of the rat. *Diabetes* 1980;29(7):579-82.
17. Gupta MP. Factors controlling cardiac myosin-isoform shift during hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2007;43(4):388-403.
18. Miyata S, Minobe W, Bristow MR, Leinwand LA. Myosin heavy chain isoform expression in the failing and nonfailing human heart. *Circ Res* 2000;86(4):386-90.
19. Izumo S, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. All members of the MHC multigene family respond to thyroid hormone in a highly tissue-specific manner. *Science* 1986;231(4738):597-600.
20. Swynghedauw B. Developmental and functional adaptation of contractile proteins in cardiac and skeletal muscles. *Physiol Rev* 1986;66(3):710-71.
21. Giger JM, Haddad F, Qin AX, Zeng M, Baldwin KM. Effect of unloading on type I myosin heavy chain gene regulation in rat soleus muscle. *J Appl Physiol* 2005;98(4):1185-94.
22. Koller A, Mair J, Schobersberger W, Wohlfarter T, Haid C, Mayr M, et al. Effects of prolonged strenuous endurance exercise on plasma myosin heavy chain fragments and other muscular proteins. Cycling vs running. *J Sports Med Phys Fitness* 1998;38(1):10-7.
23. 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.
24. Hydock DS, Lien CY, Schneider CM, Hayward R. Effects of voluntary wheel running on cardiac function and myosin heavy chain in chemically gonadectomized rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293(6):3254-64.
25. Baldwin KM, Haddad F. Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle. *J Appl Physiol* 2001;90(1):345-57.
26. Jin H, Yang R, Li W, Lu H, Ryan AM, Ogasawara AK, et al. Effects of exercise training on cardiac function, gene expression, and apoptosis in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279(6):2994-3002.
27. Sun L, Shen W, Liu Z, Guan S, Liu J, Ding S. Endurance exercise causes mitochondrial and oxidative stress in rat liver: Effects of a combination of mitochondrial targeting nutrients. *Life Sci* 2010;86(1-2):39-44.
28. Wisloff U, Helgerud J, Kemi OJ, Ellingsen O. Intensity-controlled treadmill running in rats: VO₂ max and cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280(3):1301-10.
29. Hoydal MA, Wisloff U, Kemi OJ, Ellingsen O. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2007;14(6):753-60.
30. Haskell WL, Lee IM, Pate RR, Powell KE, Blair SN, Franklin BA, et al. Physical activity and public health: Updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Med Sci Sports Exerc* 2007;39(8):1423-34.
31. Kong SW, Bodyak N, Yue P, Liu Z, Brown J, Izumo S, et al. Genetic expression profiles during physiological and pathological cardiac hypertrophy and heart failure in rats. *Physiol Genomics* 2005;21(1):34-42.
32. Sahn DJ, Demaria A, Kisslo J, Weyman A. Recommendations Regarding Quantitation in M-Mode Echocardiography: Results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation* 1978;6(58):1071-83.
33. Fathi M, Gharakanlou R, Abroun S, Mokhtari-Dizaji M, Rezaei R. The evaluation of cardiac changes following endurance training in male wistar rats. *Yafteh* 2014;15(5):112-23. [Full Text in Persian]
34. Hayward R, Lien CY. Echocardiographic evaluation of cardiac structure and function during exercise training in the developing Sprague-Dawley rat. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2011;50(4):454-61.
35. Farriol M, Rossell J, Schwar S. Body surface area in Sprague-Dawley rats. *J Animal Physiol Animal Nutr* 1997;77(1-5):61-5.

36. 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(4):402-8.
37. McMullen JR, Jennings JL. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: Novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007;34(4):255-62.
38. Barauna VG, Rosa KT, Irigoyen MC, de Oliveira EM. Effects of resistance training on ventricular function and hypertrophy in a rat model. *J Clin Med Res* 2007;5(2):114-20.
39. Muhl C, Dassen WR, Kuipers H. Cardiac remodelling: Concentric versus eccentric hypertrophy in strength and endurance athletes. *Neth Heart J* 2008;16(4):129-33.
40. Iemitsu M, Miyauchi T, Maeda S, Sakai S, Kobayashi T, Fujii N, et al. Physiological and pathological cardiac hypertrophy induce different molecular phenotypes in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;281(6):2029-36.
41. Richey PA, Brown SP. Pathological versus physiological left ventricular hypertrophy: A review. *J Sports Sci* 1998;16(2):129-41.
42. Wu H, Rothermel B, Kanatous S, Rosenberg P, Naya FJ, Shelton JM, et al. Activation of MEF2 by muscle activity is mediated through a calcineurin-dependent pathway. *EMBO J* 2001;20(22):6414-23.
43. Vyas DR, McCarthy JJ, Tsika RW. Nuclear protein binding at the beta-myosin heavy chain A/T-rich element is enriched following increased skeletal muscle activity. *J Biol Chem* 1999;274(43):30832-42.

The effect of Endurance Exercise on myh6 Gene Expression and Structural and Functional Changes of Left Ventricular

Mohammad Fathi*

Department of Physical
Education, Lorestan
University, Khorramabad,
Iran.

***Corresponding Author:**
Mohammad Fathi,
Department of Physical
Education, Lorestan
University, Khorramabad,
Iran.

Email:
fathi.m@lu.ac.ir

Received: 28 Mar, 2015

Accepted: 23 May, 2015

Abstract

Background and Objectives: Endurance exercise induces cardiac remodeling. Also, *myh6* gene is affected by cardiac remodeling. This study was performed with the objective of determining the effect of endurance activity on cardiac *myh6* gene expression.

Methods: In this study, 14 rats (weight, 231±24g), after familiarization with endurance trainings, were randomly divided into two groups of control and experimental (7 animals each). The experimental group performed a training program (30m/min, 50min/session, and 6 session/week, for 14 weeks) on treadmill. Forty-eight hours after the end of the last session, the animals of the experimental and control groups were anesthetized and anatomized, then, the heart and subsequently the left ventricle, were removed. Real time PCR and sonography methods were, respectively, used to assess the expression levels of *myh6* gene and structural changes in left ventricle. Data were analyzed using t-test.

Results: In this study, endurance exercise significantly increased heart weight to body surface area ratio ($p=0.002$), also final diastolic diameter increased ($p=0.008$) in experimental group compared to control group. The results showed 124 fold and significant ($p=0.011$) increase in *myh6* gene expression in the experimental group compared to control group.

Conclusion: According to the results of this study, endurance exercise along with structural and functional changes in the left ventricle, induces changes at the gene level and thereby increases heart contractility power.

Keywords: Myosin heavy chains; Exercise; Heart; Heart ventricles.