

## Effect of moderate intensity exercise on HDAC4 and CaMKII genes expression in myocardium of male rats

Khajehlandi M<sup>1</sup>, Bolboli L<sup>1\*</sup>, Siahkuhian M<sup>1</sup>, Rami M<sup>2</sup>, Tabandeh M<sup>3</sup>

- 1- Department of Physical Education and Sport Sciences, Faculty of Educational Sciences and Psychology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, I.R. Iran.
- 2- Department of Sport Physiology, Faculty of Sport Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, I.R. Iran.
- 3- Department of Basic Sciences, Biochemistry and Molecular Biology Section, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, I.R. Iran.

Received: 2020/02/17 | Accepted: 2020/08/5

### Abstract:

**Background:** Histone Dacetylases-4 (HDAC4) is phosphorylated by calcium-calmodulin-dependent kinase (CaMKII) that plays an important role in cardiac tissue hypertrophy. Therefore, the present study aimed to investigate the effect of moderate intensity exercise on HDAC4 and CaMKII genes expression in myocardial Wistar male rats.

**Materials and Methods:** In this experimental study, 19 adult male rats with 10 weeks of age and weighing of (243±8.2 g) were divided into 2 groups (endurance training=9) and (control=10) based on weight matching. Training program consisted of 6 weeks of endurance training, 5 days per week and moderate intensity. 24 hours after the last training session, cardiac tissue samples were extracted to measure the expression levels of HDAC4 and CaMKII by in vitro Real Time PCR. Data were analyzed using SPSS software version 23 and independent t-test was used.

**Results:** The results showed that the expression of both HDAC4 and CaMKII genes in the exercise group was lower than the control group, significantly ( $P<0.001$ ).

**Conclusion:** According to the results of the present study, it seems that moderate intensity endurance training can change some factors related to cardiac hypertrophy tissue of rats and can be effective in preventing cardiovascular disease.

**Keywords:** Moderate intensity endurance training, HDAC4, CaMKII, Myocard, Male rats

### \*Corresponding Author:

**Email:** l\_bolboli@uma.ac.ir

**Tel:** 0098 914 351 2590

**Fax:** 0098 453 352 0456

Conflict of Interests: *No*

*Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, October, 2020; Vol. 24, No 4, Pages 357-365*

Please cite this article as: Khajehlandi M, Bolboli L, Siahkuhian M, Rami M, Tabandeh M. Effect of moderate intensity exercise on HDAC4 and CaMKII genes expression in myocardium of male rats. *Feyz* 2020; 24(4): 357-65.

# اثر فعالیت ورزشی با شدت متوسط بر میزان بیان ژن HDAC4 و CaMKII در میوکارد رت‌های نر

مژده خواجه‌لندی<sup>۱</sup>، لطفعلی بلبلی<sup>۲\*</sup>، معرفت سیاهکوهیان<sup>۳</sup>، محمد رمی<sup>۴</sup>، محمدرضا تابنده<sup>۵</sup>

## خلاصه:

**سابقه و هدف:** هیستون داستیلازاها-4 (HDAC4) که فسفوریله شدن آن‌ها به وسیله کیناز وابسته به کلسیم کالمودولین (CaMKII) صورت می‌گیرد، نقش مهمی در رشد و نمو بافت قلب دارد. از این‌رو هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر فعالیت ورزشی با شدت متوسط بر بیان ژن‌های HDAC4 و CaMKII در میوکارد رت‌های نر نژاد ویستار بود.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، ۱۹ سر موش صحرایی نر بالغ با ۱۰ هفته سن و وزن  $243 \pm 8/2$  گرم براساس همسان‌سازی وزن به ۲ گروه (تمرین استقامتی=۹) و (کنترل=۱۰) تقسیم شدند. برنامه تمرینی شامل ۶ هفته تمرین استقامتی، ۵ روز در هفته با شدت متوسط بود. ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، نمونه‌های بافت قلب برای اندازه‌گیری سطوح بیان ژن‌های HDAC4 و CaMKII با استفاده از روش آزمایشگاهی Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل داده‌ها از طریق نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۳ و با استفاده از آزمون تی مستقل انجام شد.

**نتایج:** یافته‌ها نشان داد میزان داد میزان بیان هر دو ژن HDAC4 و CaMKII در گروه تمرین به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بوده است ( $P < 0/001$ ).

**نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج حاصل از پژوهش حاضر، به نظر می‌رسد که تمرین استقامتی با شدت متوسط می‌تواند برخی از فاکتورهای مرتبط با هایپرتروفی بافت قلب رت‌ها را تغییر دهد و همچنین می‌تواند در پیشگیری از بیماری‌های قلبی - عروقی مؤثر باشد.

**واژگان کلیدی:** تمرین استقامتی با شدت متوسط، HDAC4، CaMKII، میوکارد، رت‌های نر

دو ماه‌نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و چهارم، شماره ۴، مهر و آبان ۱۳۹۹، صفحات ۳۶۵-۳۵۷

## مقدمه

لازمه یک زندگی سالم، داشتن سیستم قلبی - عروقی کارآمد است. زندگی ماشینی امروز، کم‌تحرکی و تغذیه نامناسب خطرهای بی‌شماری برای قلب به دنبال دارند.

بافت قلب در پاسخ به استرس‌های مطلوب واردشده، از جمله فعالیت‌ها و تمرینات ورزشی توانایی سازگاری دارد [۱] که این نوع سازگاری و تجدید ساختار در عضله قلبی به نوع تمرین ورزشی، شدت، مدت، حجم و طول دوره تمرینی بستگی دارد [۲]: به‌طوری که مشخص شده است، فعالیت‌های ورزشی هوازی با اعمال پیش‌بار حجمی بر عضله قلب، از الگوی هایپرتروفی برون‌گرا پیروی می‌کنند و موجب ارتقای بافت قلب و به تبع آن بهبود عملکرد قلب می‌شوند [۳]. مطالعات اپیدمیولوژیکی از این فرضیه حمایت می‌کند که فعالیت بدنی اگر به اندازه، با برنامه و منظم باشد، عاملی مهم برای تقویت قلب است [۴]، اما ابهامات بسیاری در مورد چگونگی ایجاد این تغییرات و طریقه دستیابی به عملکرد بهتر وجود دارد. تغییرات ژنی و تجدید ساختار قلب از مهم‌ترین سازگاری‌های تمرینات استقامتی است که از طریق فرآیندی به نام اپیژنتیک (Epigenetic) صورت می‌گیرد و شامل داستیلاسیون (Deacetylation) و استیلاسیون (Acetylation) می‌باشد [۵، ۶]، که به ترتیب موجب تراکم و عدم تراکم کروماتین می‌شوند. این اعمال توسط پروتئین‌های خانواده هیستون داستیلازاها (HDACs) و استیل ترانسفرازها (HATs) و بیش‌تر فاکتورهایی که بیان ژن زنجیره سنگین میوزین (MHC) قلب را کنترل می‌کنند، صورت می‌گیرد و با HAT و HDACs در ارتباط هستند [۷، ۸].

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روان‌شناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
۲. دانشیار، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روان‌شناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
۳. استاد، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روان‌شناسی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
۴. استادیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۵. دانشیار، گروه علوم پایه، بخش بیوشیمی و بیولوژی مولکولی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

## \* نشانی نویسنده مسئول:

اردبیل، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روان‌شناسی، دانشگاه محقق اردبیلی

دوره‌نویس: ۰۴۵۳۳۵۲۰۴۵۶

تلفن: ۰۹۱۴۳۵۱۲۵۹۰

پست الکترونیک: l\_bolboli@uma.ac.ir

تاریخ پذیرش نهایی: ۹۹/۵/۱۵

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۱/۲۸

HDAC4، گروه‌هایی از ژن‌های ویژه را که با عملکرد و هایپرτροφی قلب مرتبط هستند، سرکوب می‌کند [۲۰، ۱۹]. در پژوهش‌های مختلفی به بررسی میزان HDAC4، متعاقب تمرین‌های استقامتی پرداخته و نتایج متناقضی دیده شده است؛ به طوری که در تحقیق پیرکی و همکاران مشخص گردید که ۱۰ هفته‌ش‌نای امانده‌ساز باعث افزایش HDAC4 در بطن چپ موش‌های صحرایی نر گردیده است [۲۱]. همچنین فتحی و همکاران در مطالعه خود افزایش معنی‌دار ژن HDAC4 را در بطن چپ موش‌های نری که ۱۴ هفته تمرین استقامتی داشتند، مشاهده کردند [۲۲]. این در حالی است که در مطالعه Medeiros و همکاران کاهش معنی‌دار HDAC4 پس از تمرین استقامتی مشاهده شد [۲۳]. اثر تمرین ورزشی بر میزان تغییرات CaMKII به ندرت مورد بررسی قرار گرفته است. Rose و همکاران، افزایش کوتاه مدت CaMKII را در عضلات اسکلتی پس از تمرین ورزشی گزارش نمودند [۲۴]. Kemi و همکاران با بلاک نمودن CaMKII، کاهش تراکم فسفولمبان فسفریله را پس از تمرین نشان دادند [۲۵]. بنابراین از یک سو مشاهدات در زمینه تأثیر فعالیت ورزشی بر تغییرات آنزیم CaMKII بسیار اندک می‌باشد و نیز مجهولات بسیاری وجود دارد و از سوی دیگر تحقیقات در زمینه HDAC4 با نتایج ضد و نقیضی همراه می‌باشد. به نظر می‌رسد تاکنون در پژوهشی بیان ژن CaMKII در بافت قلب پس از انجام یک دوره تمرین استقامتی بررسی نشده است، در نتیجه پیگیری تغییرات آن به دنبال HDAC4 در عضله قلبی با توجه به نقش مهمی که در پروسه هایپرτροφی قلب دارد، ایده‌آل می‌باشد. حال، پرسشی که مطرح می‌شود این است که آیا فعالیت‌های استقامتی که موجب هایپرτροφی قلب می‌شود، بر بیان ژن‌های HDAC4 و CaMKII که در هایپرτροφی قلب نقش مؤثری دارند، تأثیر می‌گذارد؟ به این ترتیب، هدف از مطالعه اخیر، بررسی اثر ۶ هفته فعالیت ورزشی با شدت متوسط بر بیان ژن‌های HDAC4 و CaMKII در میوکارد موش‌های نر نژاد ویستار بود.

#### مواد و روش‌ها

##### نمونه‌ها

پژوهش حاضر از نوع بنیادی به روش تجربی و شیوه آزمایشگاهی با طرح پس‌آزمون بود. این پژوهش با رعایت کلیه اصول آیین‌نامه اخلاق در پژوهش مصوب وزارت بهداشت و درمان انجام شده و در کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی اردبیل با شماره IR.ARUMS.REC.1398.251 در سال ۱۳۹۸ به تصویب رسیده است. در تحقیق حاضر، تعداد ۱۹

هیستون داستیلاز ۴ (HDAC4: Histone Dacetylases 4) از جمله عوامل تأثیرگذار بر تغییرات ژنی ناشی از ورزش محسوب می‌شود که نقش سرکوب‌کنندگی بیان ژن را برعهده دارد [۹]. کروماتینی که در حالت متراکم‌تری قرار دارد، فعالیت رونویسی ندارد و با متراکم شدن در داخل DNA کروماتین، رونویسی ژن به شدت سرکوب می‌شود [۱۰]. در ایجاد فشردگی ساختار کروماتین، فاکتور HDAC4 نقش اصلی را بازی می‌کند. پروتئین HDAC4 عمدتاً در هسته و سیتوپلاسم سلول قرار دارد و چون عملکرد آن‌ها برای میوزینیک عضلات اسکلتی قلبی بسیار حیاتی است، به طوری که تنظیم نامناسب فعالیت HDAC4 با هایپرτροφی قلبی و مرگ ناگهانی همراه است [۱۱]. HDAC4 از طریق دو ناحیه مستقل، رونویسی را سرکوب می‌کند: یکی از طریق ناحیه‌ای که متشکل از قسمت ۲۰۸ در پایانه N خود است و دیگری ناحیه‌ای که در قسمت داستیلاز قرار دارد [۱۲]. رونویسی از طریق دو تا دومین مستقل HDAC4 سرکوب می‌شود، نخست دومنی که متشکل است از قسمت ۲۰۸ در پایانه N و دوم دومنی که در قسمت داستیلاز قرار دارد. HDAC4 از طریق ناحیه‌ای کوچک در پایانه N خود با ایزوفرم C، فاکتور افزایش‌دهنده میوسیت (MEF2C) در تعامل است [۱۳] و موجب سرکوب آن می‌شود [۱۴] و بدین ترتیب مانع هایپرτροφی قلب می‌گردد. برخلاف هیستون داستیلازهای دیگر، HDAC4 دارای یک جایگاه اتصال برای CaMKII است که از این طریق سیگنال‌های وابسته به کلسیم، قادر است رشد قلب را تنظیم کند [۱۵]. به این صورت که فسفوریله شدن HDAC4 به وسیله CaMKII موجب می‌شود که به درون سیتوپلاسم رانده شود و به این طریق فرصتی برای فعالیت MEF2C و رشد هایپرτροφیک قلب ایجاد کند [۱۶]. بنابراین CaMKII تحت شرایط فیزیولوژیک به عملکرد طبیعی قلب کمک می‌کند [۱۵]. آنزیم CaMKII در نوسان با چندین پروتئین کلیدی دخیل در تنظیم حاد هموستاز کلسیم از جمله گیرنده‌های ریانودین (RyR)، کانال‌های کلسیمی Ca-ATPase شبکه سارکوپلاسمی، فسفولامبان و کانال‌های کلسیمی نوع L در میوسیت‌های بطنی نقش دارند [۱۷]. تغییر در عملکرد CaMKII می‌تواند از طریق پیشبرد مکانیسم‌های منجر به هایپرτροφی، اختلال در عملکرد پروتئین‌های دخیل در جابه‌جایی کلسیم و یا آپوپتوزیس به ایجاد و پیشرفت نارسایی قلبی کمک کند [۱۸]. یافته‌های حاصل از پژوهش‌ها نشان می‌دهد که ژن‌های زیادی در غیاب ژن HDAC4 در قلب افزایش می‌یابند؛ از جمله: ژن‌های میوفیلانت‌ها، ژن‌هایی که در انقباض قلب نقش دارند و ژن‌های تنظیم‌کننده هموستاز یون کلسیم. بر این اساس می‌توان بیان نمود که

سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با ۱۰ هفته سن و وزن  $8\pm 243/2$  گرم به عنوان نمونه خریداری و به مرکز پژوهش منتقل شدند. دو هفته جهت سازگاری با محیط و رسیدن به دامنه وزنی مطلوب در قفس هایی از جنس پلی کربنات در دمای  $20\pm 2$  درجه سانتی گراد، رطوبت ۲۵ تا ۳۰ درصد و چرخه تاریکی به روشی ۱۲:۱۲ (از ۷ صبح تا ۷ شب) نگهداری شدند. غذای مصرفی از شرکت خوراک دام پارس تهیه شد و آب آشامیدنی به صورت آزادانه در اختیار آنها قرار گرفت. پس از انتقال به آزمایشگاه و آشنایی با فعالیت ورزشی روی تردمیل مخصوص جوندگان، موش ها بر اساس همسان سازی وزن به طور تصادفی به دو گروه تقسیم شدند: گروه سالم تمرین (HT): این گروه شامل ۹ سر موش صحرایی نر سالم بود که در برنامه تمرینی نوار گردان شرکت کردند و گروه سالم کنترل (HC): این گروه شامل ۱۰ سر موش صحرایی نر سالم بود که هیچ گونه فعالیت ورزشی روی آنها انجام نگرفت.

#### پروتکل ورزشی

در پژوهش حاضر از تمرین استقامتی روی نوار گردان با شدت متوسط استفاده شد؛ بدین صورت که گروه ورزشی با رعایت اصل اضافه بار در معرض تمرین روی نوار گردان (تردمیل حیوانی مدل آذرخش، شرکت مهندسی پیشرو اندیشه صنعت، ایران) به تعداد ۵ جلسه در هفته و به مدت ۶ هفته قرار گرفت. سرعت و مدت تمرین نوار گردان به تدریج افزایش یافت: از ۱۰ متر در دقیقه در هفته دوم، ۱۵ متر در دقیقه برای ۲۰ دقیقه در هفته سوم، ۱۵ متر در دقیقه برای ۳۰ دقیقه در هفته چهارم، به ۱۸-۱۷ متر در دقیقه برای ۳۰ دقیقه در هفته پنجم افزایش یافت [۲۶]. جهت رسیدن به سازگاری های به دست آمده در حالت یکنواخت، تمامی متغیرهای تمرینی در هفته پایانی (هفته ششم) ثابت نگه داشته شدند. رعایت نکات اخلاقی برای وادار کردن به دویدن از شوک الکتریکی استفاده نشد و به جای آن میله پلاستیکی به کار رفت.

جدول شماره ۱- پروتکل تمرینی در طول ۶ هفته

هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم	هفته پنجم	هفته ششم
۱۰	۲۰	۲۰	۳۰	۳۰	۳۰
۱۰	۱۰	۱۵	۱۵	۱۸-۱۷	۱۸-۱۷
۰	۰	۰	۰	۰	۰
۵	۵	۵	۵	۵	۵

#### آنالیز کمی بیان ژن

۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، موش های صحرایی توسط تزریق درون صفاقی ترکیبی از  $1\text{-}50\text{mg/kg}$  کتامین و  $1\text{-}5\text{mg/kg}$  زایلازین بیهوش شدند و بافت قلب تحت شرایط استریل، توسط متخصص آناتومی جدا شد. بافت های قلب تا قبل از انجام بررسی های آزمایشگاهی در دمای  $70^\circ\text{C}$  - نگهداری شدند. استخراج RNA با استفاده از کیت تجاری TRIZOL و مطابق با روش ارائه شده توسط شرکت انجام شد. به منظور حذف DNA، تمام نمونه های RNA به مدت ۱ ساعت با آنزیم Dnase و مطابق روش ارائه شده توسط شرکت تیمار شدند. غلظت و میزان خلوص نمونه های RNA پس از قرائت جذب آنها در طول موج  $260\text{nm}$  و نیز محاسبه نسبت جذب  $260/280$  با استفاده از اسپکتروفوتومتر بیوفتومتر (پندورف، آلمان) تعیین گردید. نمونه هایی که نسبت جذب  $260/280$  آنها بیش از  $1/8$  بود، جهت سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفتند. سنتز cDNA با استفاده از کیت تجاری AmpliSence صورت پذیرفت. پرایمر های

تصادفی، هگزامر شد و در واکنش هایی با حجم  $20\ \mu\text{L}$  مطابق دستورالعمل شرکت مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تأیید بیان ژن های مورد بررسی، ابتدا واکنش روی بافت های انتخابی انجام گردید و سپس برای بررسی مقایسه ای بیان ژن ها از آزمون PCR در زمان حقیقی استفاده شد. همچنین برای طراحی پراب و پرایمر، نرم افزار Beacon designer TM7/01 به کار گرفته شد. واکنش های PCR با استفاده از آنزیم Taq polymerase در واکنش هایی با حجم  $25\ \mu\text{L}$  انجام شد. نمونه cDNA بافت قلب به عنوان کنترل مثبت و یک نمونه واکنش فاقد cDNA به عنوان کنترل منفی در هر واکنش PCR در نظر گرفته شد. برای مشاهده محصول PCR از ژل آگاروز دو در صد تهیه شده در محلول بافر TAE استفاده شد. برای ارزیابی تغییرات بیان ژن ها، روش مقایسه ای  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  و دستگاه Mini Option Tm محصول شرکت بیوراد و کیت تجاری qPCR Probe Master Bioneer به کار گرفته شد. مقادیر مقایسه ای بیان ژن های مورد نظر در مقایسه با بیان

GAPDH در هر بافت توسط نرم افزار ژن، ارزیابی و براساس

رابطه  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  گزارش گردید.

جدول شماره ۲- توالی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش

Genes	Forward	Reverse	Accession No.
GAPDH	AGTTCAACGGCACAGTCAAG	TACTCAGCACCAGCATCACC	XM_017593963.1
HDAC4	CTCTGCCAAATGTTTCGGGT	CAAGCTCATTTCCAGCAGA	NM_053449
CaMKII	AGTGACACCTGAAGCCAAAG	GTCAAGATGGCACCCCTTCAA	NM_012519

پس از توزیع نرمال داده ها و تجانس واریانس، به ترتیب از آزمون شاپیرو ویلک، آزمون لوین ( $P \geq 0.05$ ) و آزمون آنالیز آمستقل با شاخص معنی داری  $P < 0.05$  برای بررسی تفاوت بین دو گروه تمرین و کنترل استفاده شد. کلیه بررسی های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ انجام گرفت.

نتایج

نتایج جدول شماره ۳ نشان می دهد که وزن بدن گروه تمرین ( $269/27 \pm 38/15$ )، کمتر از گروه کنترل ( $275/75 \pm 26/18$ ) می باشد؛ اما این اختلاف، معنی دار نیست ( $P = 0.718$ ) که می توان نتیجه گرفت دو گروه از لحاظ وزن بدن همسان هستند. همچنین وزن بدن چپ جدا شده در گروه تمرین به طور معنی داری بیشتر از گروه کنترل می باشد ( $P = 0.002$ ). علاوه بر این، نسبت وزن بدن چپ به BSA و نسبت وزن بدن چپ به وزن بدن در گروه تمرین، به طور معنی داری بیشتر از گروه کنترل شده است ( $P < 0.05$ ).

ارزیابی هایپرتروفی بطن چپ

برای دستیابی به میزان هایپرتروفی قلب از ارزیابی نسبت وزن بطن چپ به وزن بدن و سطح رویه بدن استفاده گردید. بدین منظور دو شاخص برای نسبی کردن وزن بطن چپ (نرمال کردن) و تأیید کردن هایپرتروفی به کار رفت. در حالت بیهوشی، وزن و طول بدن حیوان (از دهان تا ابتدای دم)، برای محاسبه سطح رویه بدن استخوان درشتنی توسط کولیس اندازه گیری شد. سپس قلب حیوان از شکاف ناحیه سینه، خارج و پس از اندازه گیری وزن قلب، بطن چپ نیز به دقت جدا شد و هر دوی آنها به طور جداگانه توسط ترازوی مدل GR202 ساخت کشور ژاپن وزن شدند BSA. موش ها با استفاده از فرمول زیر و برنامه Excel برآورد شد.

$$L = \text{طول بدن (سانتی متر)} \quad W = \text{وزن بدن (گرم)}$$

$$BSA = 6.67 \times W^{0.7} \left[ 0.34 / \left( \frac{W}{L} \right) \right]$$

آنالیز آماری

برای گزارش داده ها از میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد استفاده شد.

جدول شماره ۳- بررسی میزان شاخص های ارزیابی کننده هایپرتروفی بطن چپ در دو گروه

شاخص	گروه		p#
	تمرین	کنترل	
وزن بدن (گرم)	269/27 ± 38/15	275/75 ± 26/18	0/718
وزن قلب (میلی گرم)	998/67 ± 49/56	879/56 ± 68/74	0/893
وزن بطن چپ (میلی گرم)	690/58 ± 26/38	610/44 ± 43/68	0/002
BSA (سانتی متر)	387/23 ± 23/31	392/20 ± 14/17	0/890
نسبت وزن بطن چپ به BSA (میلی گرم/سانتی متر)	2/0 ± 21/11	2/0 ± 19/21	0/030
نسبت وزن بطن چپ به وزن بدن (میلی گرم/گرم)	1/0 ± 76/19	1/0 ± 55/20	0/#/028

# Independent t-test

گروه کنترل بوده است ( $P < 0.001$ ). نمودارهای شماره ۱ و ۲ این اختلافها را با وضوح بیشتری نشان می دهند.

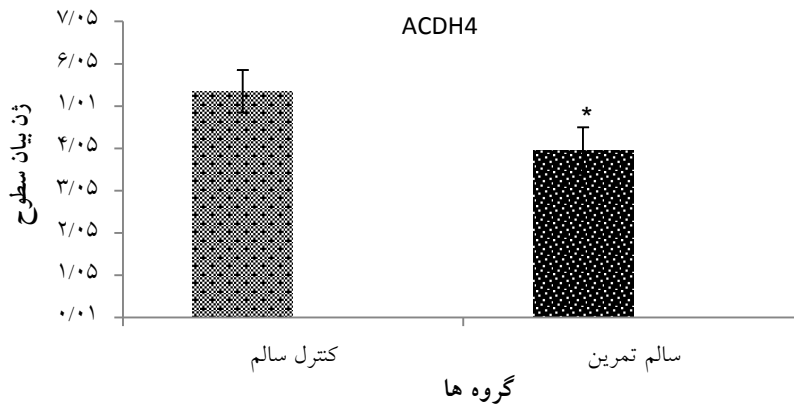
بیان ژنها

نتایج جدول شماره ۴ نشان می دهد میزان بیان هر دو ژن HDAC4 و CaMKII در گروه تمرین به طور معنی داری کمتر از

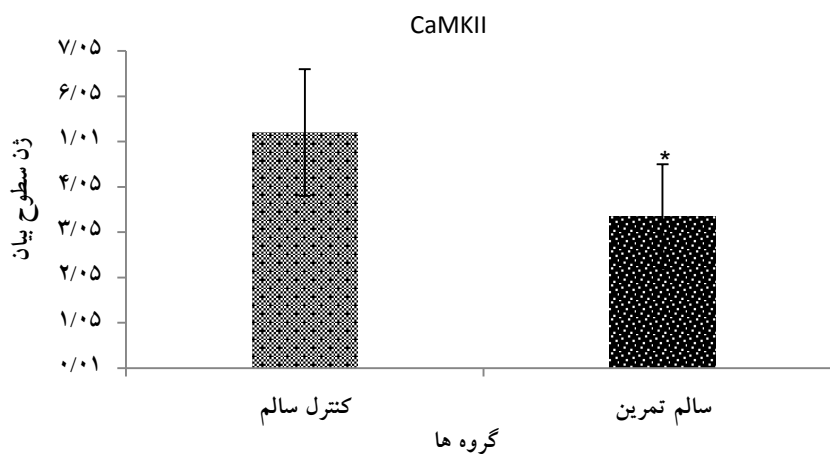
جدول شماره ۴- بررسی مقایسه میزان بیان ژنهای HDAC4 و CaMKII بین دو گروه

گروه	تمرین	کنترل	t	p#
HDAC4	۰/۰±۷۹/۱۱	۱/۰±۰۷/۱۰	۱۱/۷۹	۰/۰۰۰
CaMKII	۰/۰±۶۷/۲۳	۱/۰±۰۴/۲۸	۱۰/۹۷	۰/۰۰۰

# Independent t-test



نمودار شماره ۱- میزان بیان ژن ACDH4 در دو گروه تمرین و کنترل



نمودار شماره ۲- میزان بیان ژن CaMKII در دو گروه تمرین و کنترل

## بحث

قلب موش های نر پرداخته بودند، این نتیجه به دست آمد که اثر تمرینات ورزشی بر هایپرتروفی بطن چپ در گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل بیشتر بوده است. Medeiros و همکاران نیز افزایش ۱۳ درصدی در وزن بطن چپ را پس از یک دوره تمرینات استقامتی مشاهده کردند. در این راستا نتایج مطالعه DaSilva و همکاران نیز افزایش ۳۰ درصدی در وزن بطن را پس از اعمال ۱۰ هفته تمرین مداومی با وزنه نشان داد. این گونه به نظر می رسد که فعالیت های ورزشی موجب هایپرتروفی قلب شده است. شایع ترین تغییرات اپیژنتیک القاشده به وسیله فعالیت های بدنی، تعدیل های هیستونی، مانند متیلاسیون و استیلاسیون

تمرینات ورزشی منظم، می تواند موجب ایجاد سازوکارهای مفیدی در عملکرد قلب شود و در آماده سازی سلول ها برای مقابله با مرگومیر ناشی از بیماری های قلبی نقش داشته باشد که از جمله این تمرینات، تمرین استقامتی است. بنابر نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر ۶ هفته تمرین استقامتی، موجب هایپرتروفی قلب در حیوانات گردیده است که با نتایج Alessio و همکاران [۲۷]، Medeiros و همکاران [۲۳] و DaSilva و همکاران [۲۸] همسو است. در تحقیق Alessio و همکاران که به بررسی تأثیر فعالیت های ورزشی بر هایپرتروفی

هایپرتروفی قلبی به آن اشاره نمود، AMPK است [۳۳]. چنانچه مشخص شده است که بسیاری از فرآیندهای قلبی مانند تنظیم عملکرد میتوکندریایی و خصوصیات الکتروفیزیولوژی قلب را تنظیم می‌کند [۳۴] که میزان فعالیت آن در فعالیت‌های استقامتی افزایش می‌یابد [۳۵]. در تحقیق حاضر مشاهده گردید که پس از ۶ هفته تمرین استقامتی میزان بیان ژن CaMKII در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری پیدا کرد. تغییر در عملکرد CaMKII می‌تواند از طریق پیشبرد مکانیسم‌های منجر به هایپرتروفی، اختلال در عملکرد پروتئین‌های دخیل در جا به جایی کلسیم و آپوپتوزیس، به ایجاد و پیشرفت نارسایی قلبی کمک کند [۳۶]. در طول دو دهه اخیر شواهدی در زمینه نقش پاتولوژیک آنزیم CaMKII ارائه و گزارش شده است که نشان می‌دهد فعالیت CaMKII در میوکاردیوم تحت شرایطی همچون هایپرتروفی، انفارکتوس و استرس اکسیداتیو افزایش می‌یابد [۳۷-۳۹]. به‌علاوه افزایش سه برابری فعالیت CaMKII و افزایش دو برابری بیان ژن این آنزیم در افراد دارای نارسایی قلبی همراه با کاردیومیوپاتی گشادشده گزارش شده است [۴۰]. از جمله مواردی که برای توجیه کاهش بیان این آنزیم در تحقیق حاضر می‌توان بیان نمود، افزایش بیان زیرواحدهای AMPK می‌باشد؛ به‌طوری که با افزایش بیان آن در تمرینات استقامتی، فسفوریله شدن HDAC4 و خروج آن از هسته سیتوپلاسم دیده می‌شود [۴۱]. بدین ترتیب نیاز به وجود CaMKII برای خروج HDAC4 کاهش می‌یابد. هرچند ارتباط این دو در قلب به‌خوبی مشخص نشده است، اما امکان دارد فاکتور رونویسی در قلب با HDAC4 و ژن سرکوب‌کننده رونویسی ژن AMPK در ارتباط باشد که نیاز به برسی‌های سلولی مولکولی بیشتر در این زمینه را ایجاد می‌کند. از دیگر احتمالات ممکن در روند تأثیر بیان ژن CaMKII می‌توان به کاهش استرس اکسیداتیو متعاقب تمرین هوازی طولانی مدت اشاره نمود؛ چرا که بنا بر بسیاری از مطالعات کاهش استرس متعاقب فعالیت بدنی به اثبات رسیده است [۴۲، ۴۳]. بنابراین از آنجایی که بین استرس اکسیداتیو و آنزیم CaMKII ارتباط مستقیمی وجود دارد، احتمالاً با کاهش استرس اکسیداتیو پس از ۶ هفته تمرین استقامتی بیان ژن این آنزیم کاهش می‌یابد [۴۴]. نقاط قوت تحقیق حاضر، قابل کنترل بودن زمان تمرینات، در دسترس بودن وسایل و امکانات موردنیاز و کنترل تغذیه حیوانات است و محدودیت‌های تحقیق حاضر، عدم اندازه‌گیری شاخص‌های ساختاری قلب، قبل از انجام پروتکل تمرینی، سایر فاکتورهای مرتبط با هایپرتروفی بافت قلب و میزان پروتئین آن‌ها بود که امید است در پژوهش‌های آتی در زمینه تغییرات پس از رونویسی این ژن‌ها تحقیقاتی صورت پذیرد.

DNA است. در بخش سلولی مولکولی مشاهده گردید که تمرین استقامتی باعث کاهش معنی‌دار بیان ژن‌های HDAC4 و CaMKII شده است. از جمله دلایل کاهش بیان CaMKII می‌تواند در تعامل با HDAC4 باشد که در اثر سازگاری با فعالیت هوازی، مقادیر بیان ژن HDAC4 کم می‌شود و نیاز به فسفوریله شدن آن توسط CaMKII نیز کاهش می‌یابد. بنابراین نیاز به بیان بالای CaMKII کاهش می‌یابد. نتیجه تغییرات بیان ژن HDAC4 در پژوهش حاضر با نتیجه تحقیق Medeiros [۲۳] همسو و با نتایج پژوهش فتحی و همکاران [۲۲] ناهمسو بود. نتایج مطالعه فتحی و همکاران نشان داد که پس از اجرای ۱۴ هفته تمرین دویدن استقامتی موش‌های صحرایی، بیان ژن HDAC4 در بطن چپ موش‌های نر افزایش پیدا کرده است. این در حالی است که نتایج مطالعه Medeiros بیان می‌دارد که اجرای تمرین شناهی استقامتی به افزایش حجم و اندازه دیواره بطن چپ قلب موش‌های نر منجر می‌شود که با کاهش HDAC4 ارتباط دارد. از جمله دلایل افزایش بیان ژن HDAC4 در تحقیق فتحی و همکاران می‌توان این مورد را بیان نمود که رشد هایپرتروفیک قلب با فعال‌سازی مسیرهای AKT و PI3K در ارتباط است [۲۹] و یون کلسیم در فعال‌سازی این مسیرهای سیگنالیکی نقش دارد [۳۰]. احتمال دارد که فعالیت استقامتی موجب ریزش کلسیم به درون سلول‌های قلب شود و در نتیجه با فعال‌سازی مسیرهای سیگنالیکی موجب افزایش بیان ژن مذکور گردد. اما در سطح رونویسی عنوان شده است که جایگاه اتصال برای فاکتورهای رونویسی SP1 و SP3 در پروموتور ژن وجود دارد، به این معنا که فعالیت این فاکتورهای رونویسی، موجب افزایش بیان این ژن و سرکوب آن‌ها موجب کاهش بیان ژن HDAC4 می‌شود [۳۱]. از جمله دلایل کاهش بیان ژن HDAC4 پس از ۶ هفته تمرین در پژوهش حاضر می‌توان به تغییرات فشار اکسایشی اشاره نمود؛ چنانچه از یک سو بیان شده است که تمرین استقامتی با شدت متوسط باعث کاهش فشار اکسایشی می‌گردد [۳۲]؛ از سوی دیگر رابطه مستقیمی بین HDAC4 و استرس اکسایشی وجود دارد. پس کاهش بیان این فاکتور و تعدیل شاخص‌های آنتی‌اکسیداتیو متعاقب سازگاری با تمرین استقامتی با شدت متوسط احتمالاً از جمله دلایل دیگر توجیه نحوه بیان ژن این فاکتور است. بنابراین از آنجایی که بیان ژن‌های زیادی توسط HDAC کنترل می‌شود که در هایپرتروفی قلب نقش دارند، با کاهش بیان این ژن فرصت برای اعمال فعالیت ژن‌های تحت کنترل HDAC بیشتر می‌شود و بدین ترتیب با در نظر گرفتن وضعیت ایده‌آل سایر فاکتورها شرایط برای هایپرتروفی قلب مهیا می‌گردد. از جمله فاکتورهایی که می‌توان در پروسه

## نتیجه گیری

روش به عنوان یک روش مداخله‌ای تأثیرگذار جهت سلامت و بقای قلب می‌تواند مورد توجه بیشتر قرار گیرد.

## تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از رساله دکتری در رشته فیزیولوژی ورزش و گرایش قلب، عروق و تنفس مصوب سال ۱۳۹۸ دانشکده علوم تربیتی و روان‌شناسی دانشگاه محقق اردبیلی می‌باشد. صمیمانه از تمام کسانی که در انجام پژوهش ما را یاری نمودند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

می‌توان نتیجه گرفت که ۶ هفته تمرین استقامتی موجب هایپرتروفی قلب حیوانات شده است که این هایپرتروفی توسط ارزیابی نسبت وزن بطن چپ به وزن بدن و سطح رویه بدن تأیید شد. علاوه بر این با بیان متعارف CaMKII و کاهش بیان ژن HDAC4 در اثر یک دوره تمرین استقامتی با شدت متوسط زمینه برای فعالیت فاکتورهای مرتبط با هایپرتروفی مهیا می‌گردد و هایپرتروفی فیزیولوژیک قلب به دنبال فعالیت ورزشی دیده می‌شود. از این رو انجام تمرین استقامتی را می‌توان به عنوان یک استراتژی مهم در راستای بهبود ساختار و عملکرد قلب توصیه نمود و این

## References:

- [1] Seo DY, Kwak HB, Kim AH, Park SH, Heo JW, Kim HK, et al. Cardiac adaptation to exercise training in health and disease. *Pflug Arch Eur J PHY* 2020; 472(2): 155-68.
- [2] Basavarajaiah S, Boraita A, Whyte G, Wilson M, Carby L, Shah A, et al. Ethnic differences in left ventricular remodeling in highly trained athletes relevance to differentiating physiologic left ventricular hypertrophy from hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51(23): 2256-62.
- [3] Henriksen E, Sundstedt M, Hedberg P. Left ventricular end-diastolic geometrical adjustments during exercise in endurance athletes. *Clin Physiol Funct Imaging* 2008; 28(2): 76-80.
- [4] Anderson E, Durstine JL. Physical activity, exercise, and chronic diseases: A brief review. *Sports Medicine Health Science* 2019; 1(1): 3-10.
- [5] Ntanasis-Stathopoulos J, Tzanninis JG, Philippou A, Koutsilieris M. Epigenetic regulation on gene expression induced by physical exercise. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2013; 13(2): 133-46.
- [6] Liu Y, Randall WR, Schneider MF. Activity-dependent and independent nuclear fluxes of HDAC6 mediated by different kinases in adult skeletal muscle. *J Cell Biol* 2005; 146:661-71.
- [7] McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN. Signaling chromatin to make muscle. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14(6): 763-72.
- [8] Jaenisch, Wolffe, Bird, Fedoroff, Horz, Finnegan, Laird, Flavell, Wilkins, Allshire, Kooter. DNA methylation, nucleosomes and the inheritance of chromatin structure and function-Discussion. 1995: 35-45.
- [9] Miska EA, Karlsson C, Langley E, Nielsen SJ, Pines J, Kouzarides T. HDAC4 deacetylase associates with and represses the MEF2 transcription factor. *EMBO J* 1999; 18(18): 5099-107.
- [10] Kehat I, Accornero F, Aronow BJ, Molkentin JD. Modulation of chromatin position and gene expression by HDAC4 interaction with nucleoporins. *J Cell Biol* 2011; 193(1): 21-9.
- [11] Dressel U, Bailey PJ, Wang SM, Downes M, Evans RM, Muscat GE. A dynamic role for HDAC7 in MEF2-mediated muscle differentiation. *J Biol Chem* 2001; 276(20):17007-13.
- [12] Rose AJ, Frosig C, Kiens B, Wojtaszewski JFP, Richter EA. Effect of endurance exercise training on Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent protein kinase II expression and signalling in skeletal muscle of humans. *J Physiol* 2007; 583(2): 785-95.
- [13] Feng J, Fouse S, Fan G. Epigenetic regulation of neural gene expression and neuronal function. *Pediatr Res* 2007; 61(5): 58-63.
- [14] Wang AH, Bertos NR, Vezmar M, Pelletier N, Crosato M, Heng HH, et al. HDAC4, a human histone deacetylase related to yeast HDA1, is a transcriptional corepressor. *Mol Cell Biol* 1999; 19(11): 7816-27.
- [15] Backs J, Song K, Bezprozvannaya S, Chang S, Olson EN. CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest* 2006; 116(7): 1853-64.
- [16] Zhang T, Maier LS, Dalton ND, Miyamoto S, Ross J, Bers DM, et al. The  $\delta$  C isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circulation Res* 2003; 92: 912-9.
- [17] Zhang T, Miyamoto S, Brown JH. Cardiomyocyte calcium and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II: friends or foes?. *Recent Prog Horm Res* 2004; 59: 141-68.
- [18] Zhang T, Brown JH. Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovascular Res* 2004; 63: 476-86.
- [19] Pothhoff 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.

- [20] Rose AJ, Frosig C, Kiens B, Wojtaszewski JFP, Richter EA. Effect of endurance exercise training on Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent protein kinase II expression and signalling in skeletal muscle of humans. *J Physiol* 2007; 583(2): 785-95.
- [21] Piraki P, Hematfar A, Behpour N, Samavati Sharifi MA. The Effect of 10 Weeks of Exhaustive Swimming on Gene Expression of Histone Deacetylase-4 and Myocyte Enhancer Factor-2c in Left Ventricle in Male Rats. *Journal of sport Biosciences* 2018; 10(2): 249-61. [in Persian]
- [22] Fathi M, Gharakanlou R, Rezaei R. The Effect of 14-Week Endurance Training on Left Ventricle HDAC4 Gene Expression of Wistar Male Rat. *J Sport Biomotor Sci* 2013; 11(1): 5-15.
- [23] Medeiros A, Oliveira EM, Gianolla R, Casarini DE, Negrao CE, Brum PC. Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37(12): 1909-17.
- [24] Rose AJ, Kiens B, Richter EA. Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent protein kinase expression and signalling in skeletal muscle during exercise. *J Physiol* 2006; 574(3): 889-903.
- [25] Kemi OJ, Ellingsen Ø, Ceci M, Grimaldi S, Smith GL, Condorelli G, et al. Aerobic interval training enhances cardiomyocyte contractility and Ca<sup>2+</sup> cycling by phosphorylation of CaMKII and Thr-17 of phospholamban. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 43(3): 354-61
- [26] Chae CH, Jung SL, An SH, Jung CK, Nam SN, Kim HT. Treadmill exercise suppresses muscle cell apoptosis by increasing nerve growth factor levels and stimulating p-phosphatidylinositol 3-kinase activation in the soleus of diabetic rats & quot. *Physiol Biochem* 2011; 67(2): 235-41.
- [27] Alessio DL, Laura S, Gianni P, Stefano P, Giorgio G. The effect of exercise training on left ventricular function in young elite athletes. *Cardiovasc Ultrasound* 2011; 9: 27.
- [28] Da Silva JND, Fernandes T, Soci UPR, Monteiro AWA, Phillips MI, De Oliveira EM. Swimming training in rats increases cardiac MicroRNA-126 expression and angiogenesis. *Med Sci Sports Exerc* 2012; 44(8): 1453-62.
- [29] DeBosch B, Treskov I, Lupu TS, Weinheimer C, Kovacs A, Courtois M, et al. Akt1 is required for physiological cardiac growth. *Circulation* 2006; 113(17):2097-104.
- [30] O'Neill BT, Kim J, Wende AR, Theobald HA, Tuinei J, Buchanan J, et al. A conserved role for phosphatidylinositol 3-kinase but not Akt signaling in mitochondrial adaptations that accompany physiological cardiac hypertrophy. *Cell Metab* 2007; 6 (4):294-306.
- [31] Liu F, Pore N, Kim M, Voong KR, Dowling M, Maity A, et al. Regulation of histone deacetylase 4 expression by the SP family of transcription factors. *Mol Biol Cell* 2006; 17(2): 585-97.
- [32] Bolboli L, Khajehlandi M. A Comparison of the Effect of Endurance Training on the Activities of Glutathione Peroxidase and Superoxide Dismutase in the Cardiac Tissue of Healthy and Diabetic Rats. *Yafte* 2020; 21(4): 20-31. [in Persian]
- [33] Zaha VG, Young LH. AMP-activated protein kinase regulation and biological actions in the heart. *Circ Res* 2012; 111(6): 800-14.
- [34] Musi N, Hirshman MF, Arad M, Xing Y, Fujii N, Pomerleau J, et al. Functional role of AMP-activated protein kinase in the heart during exercise. *FEBS Lett* 2005; 579(10): 2045-50.
- [35] Mihaylova MM, Vasquez DS, Ravnskjaer K, Denechaud PD, Yu RT, Alvarez JG, et al. Class IIa histone deacetylases are hormone-activated regulators of FOXO and mammalian glucose homeostasis. *Cell* 2011; 145 (4):607-21.
- [36] Zhang T, Brown JH. Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovascular Res* 2004; 63: 476-86.
- [37] Anderson ME, Braun AP, Wu Y, Lu T, Wu Y, Schulman H, et al. KN-93, an inhibitor of multifunctional Ca<sup>++</sup>/calmodulin-dependent protein kinase, decreases early afterdepolarizations in rabbit heart. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 287(3):996-1006.
- [38] Wu Y, Roden DM, Anderson ME. Calmodulin kinase inhibition prevents development of the arrhythmogenic transient inward current. *Circ Res* 1999; 84(8): 906-12.
- [39] Wu Y, MacMillan LB, McNeill RB, Colbran RJ, Anderson ME. CaM kinase augments cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> current: a cellular mechanism for long Q-T arrhythmias. *Am J Physiol* 1999; 276(6 Pt 2): H2168-2178.
- [40] Kirchhefer U, Schmitz W, Scholz H, Neumann J. Activity of cAMP-dependent protein kinase and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human hearts. *Cardiovasc Res* 1999; 42(1): 254-61
- [41] Kehat I, Accornero F, Aronow BJ, Molkenstein JD. Modulation of chromatin position and gene expression by HDAC4 interaction with nucleoporins. *J Cell Biol* 2011; 193(1):21-9.
- [42] Powers SK, Quindry JC, Kavazis AN. Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemiareperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 2008; 44: 193-201.
- [43] Naderi R, Gisou M, Mohammadi M, Ghaznavi R, Ghyasi R, Vatankeh A. Voluntary Exercise Protects Heart from Oxidative Stress in Diabetic Rats. *Adv Pharm Bull* 2015; 5(2): 231-6.
- [44] Anderson ME, Brown JH, Bers DM. CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2011; 51(4): 468-73.