تغییرات بیان ژن آلفا اکتینین ۳ و ترکیب تار عضله بازکننده دراز انگشتان پا در پاسخ به هشت هفته تمرین مقاومتی فزاینده موش‌های صحرایی اسپراگ

عباسعلی گائینی[۱]، ندا خالدی[۲*]
رعنا فیاض میلانی[۳]، علی‌اصغر رواسی[۱]
گلنوش صدقروحی[۴]، وحید عربکری[۵]

۱- گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۲- گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.
۳- گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.
۴- دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، پردیس بین‌المللی کیش، دانشگاه تهران، جزیره کیش، ایران.
۵- گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: تهران، بلوار میرداماد، خیابان رازان جنوبی، جنب ورزشگاه شهید کشوری، دانشگاه خوارزمی، گروه فیزیولوژی ورزشی
تلفن: ۰۲۱-۲۲۲۲۸۰۰۱
E-mail: n.khaledi@tmu.ac.ir

چکیده

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۸/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰/۲۳

زمینه و هدف: آلفا اکتینین‌ها در خط z عضله اسکلتی پستانداران و دارای دو نوع آلفا اکتینین دو و سه می‌باشند و پژوهش‌های اندکی درباره تاثیر تمرین بر بیان ژن آلفا اکتینین‌ها انجام شده است. این پژوهش تاثیر هشت هفته تمرین مقاومتی فزاینده را بر وزن، تغییرات بیان ژن آلفا اکتینین سه و ترکیب تار عضله تا کننده دراز انگشت شست پا بررسی کرده است.

روش بررسی: ۴۵ سر موش صحرایی ماده سه‌ماهه نژاد اسپراگ (وزن اولیه ۹±۱۶۹/۲۵) به گروه‌های کنترل (۱۸ موش)، تمرین (۲۲ موش) و آزمایشی (پنج موش) تقسیم شدند. تمرین مقاومتی شامل بالا رفتن از نردبان همراه با وزنه‌های متصل به دم موش بود و وزنه‌های حمل شده در هشت هفته تمرین به‌تدریج افزایش می‌یافت. سنجش بیان ژن آلفا اکتنین سه با روش کمی واکنش زنجیره پلیمراز و تعیین ترکیب تار با روش رنگ‌آمیزی ایمونو بافت شیمی انجام شد.

یافته‌ها: در این مطالعه، وزن عضله افزایش معنی‌داری بین گروه تمرینی و کنترل داشت (P=۰/۰۱). تفاوت میانگین بیان ژن بین گروه‌های تمرین و کنترل از نظر آماری معنی‌دار نبود (P=۰/۸۵۲). هم‌چنین، نتایج نشان داد ارتباط معنی‌داری بین بیان ژن و تغییرات نوع تار IIX وجود ندارد (r=۰/۰۱۲ , P=۰/۷۰).

نتیجه‌گیری: علی‌رغم تاثیر تمرین مقاومتی بر افزایش پروتیین‌های سارکومری، نتایج این پژوهش نشان داد تمرین مقاومتی تاثیری بر مقادیر آلفا اکتینین سه ندارد. گرچه آلفا اکتینین‌ها نقش مهمی در تولید و گسترش نیرو در سارکومر دارند، اما در پاسخ به تمرین مقاومتی تغییر معنی‌داری نشان ندادند.

کلمات کلیدی: خط z، آلفا اکتینین، تمرین مقاومتی، تا کننده دراز انگشت شست پا، نردبان عمودی.

مقدمه

فعالیت بدنی فنوتیپ پیچیده‌ای دارد که متاثر از میلیون‌ها عامل محیطی و ژنتیکی است. از مدت‌ها قبل معلوم شده است عملکرد بدنی و توانایی ورزشی، اجزای ژنتیکی زیادی دارند. به‌تازگی، گسترش روش‌های تعیین توالی DNA و ژنوتیپ این امکان را فراهم کرده است تا برخی گونه‌های ژنتیکی- فردی که عملکرد ورزش را نشان می‌دهد، شناسایی شوند.[۱] از میان ژن‌های کشف‌شده درباره‌ی عملکرد ورزشی، ژن α-actinin (ACTN) از سال ۱۹۹۲ به بعد مورد توجه فیزیولوژیست‌ها قرار گرفته است.[۲و۳] ژن‌های بسیاری مسئول آمادگی و عملکرد ورزشی‌اند، اما محصول این ژن برای اولین‌بار نشان می‌دهد ژنی که تولیدکننده پروتیین‌های ساختاری عضله است، با عملکرد ورزشی جنبه اختصاصی دارد. در دوران تکامل، کپی ژن و اتصال متناوب آن به شکل‌گیری خانواده گوناگونی از ژن‌های ACTN منجر می‌شود که از نقطه نظر عملکردی با هم متفاوتند.[۴] ژن‌های ACTN1, ACTN2, ACTN3, ACTN4 حداقل شش پروتیین جداگانه را

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-17]

با توجه به ویژگی‌های منحصر به فرد بیان ژنی بافت‌ها تولید می‌کنند. با توجه به ویژگی‌های بیوشیمیایی، الگوی بیان و جایگاه درون سلولی، محصولات پروتیینی ژن به دو گروه اصلی تقسیم می‌شوند: ایزوفرم سایتواسکلتون‌های غیر عضلانی (حساس به کلسیم) و ایزوفرم سارکومرهای عضلانی (غیر حساس به کلسیم).[۴]

نقش‌هایی که به آلفا اکتینین نسبت داده‌اند عبارتند از: ۱) تغییر ویژگی‌های انقباضی سارکومر در تارهای عضلانی تند انقباض، ۲) تاثیر بر تمایزگذاری و هیپرتروفی تار عضلانی از طریق ارتباط غیر مستقیم آلفا اکتینین و پروتیین‌های پیام‌رسان مانند کلسی‌نورین (Calcineurin)، ۳) تغییر توانایی مقاومت و تحمل و بازیافت پس از فعالیت ورزشی آسیب‌زا، ۴) تغییر ویژگی‌های متابولیکی تارهای عضلانی از راه آنزیم‌های متابولیکی مثل فروکتوز ۱-۶ دی فسفاتاز و گلیکوژن فسفوریلاز.[۱] حضور و نقش آلفا اکتینین سه به‌عنوان عاملی که می‌توانند در تولید نیرو و عملکرد سرعتی نقش داشته باشد مورد توجه پژوهشگران بسیاری بوده است.

با هدف مطالعه تاثیر ژنوتیپ بر عملکرد ورزشی، McArthur با غیر فعال کردن ژن ACTN3 در موش‌های Knockout (KO) نشان داد عضلات مبتلا به کمبود ACTN3 (ژنوتیپ XX)، بازیافت پس از خستگی و زمان رسیدن به درماندگی بهتری داشته‌اند. این یافته‌ها نشان می‌دهد تغییر مسیر متابولیسم اکسایشی در موش‌های KO، ظرفیت استقامتی ذاتی را افزایش می‌دهد. از طرفی، تغییرات متاثر از ژنوتیپ با تغییر نوع تار و کاهش ویژگی‌های انقباضی همراه است. این تغییرات با همبستگی جهش ژنوتیپ و تضعیف عملکرد سرعتی در انسان ورزشکار و غیر ورزشکار سازگاری دارد.[۵]

این یافته‌ها نشان می‌دهد: بین ژنوتیپ‌های ACTN3 و عملکرد ورزشی ارتباط معنی‌داری وجود دارد و حضور یا عدم حضور ACTN3 احتمالا بر عملکرد عضله تاثیر می‌گذارد. حضور و نقش آلفا اکتینین سه به‌عنوان عاملی که می‌تواند در تولید نیرو و عملکرد سرعتی نقش داشته باشد مورد توجه پژوهش‌گران بسیاری بوده است.

Yang معتقد است هنگام انقباض‌های سریع، پروتیین آلفا اکتینین سه، احتمالاً مسئول ظرفیت بیش‌تر جذب و انتقال نیرو در خط Z سارکومر می‌باشد.[۵] تمرین ورزشی یکی از بهترین محرک‌های فیزیولوژیکی است که سبب تغییر در ویژگی‌های عضله اسکلتی می‌شود. یکی از پیش‌فرض‌ها درباره‌ی تغییر مقادیر بیان ژن و محتوی آلفا اکتینین‌ها، تمرین مقاومتی (Resistance (RE و یا بروز هیپرتروفی عضلانی است. تمرین مقاومتی که یکی از مهم‌ترین ابزارهای افزایش پروتیین‌های عضله اسکلتی به‌ویژه پروتیین‌های سارکومری است که می‌تواند سبب افزایش ویژگی‌های سرعتی و قدرتی عضله گردد. به‌طور کلی، پذیرفته شده است تمرین مقاومتی به سازگاری‌هایی مثل افزایش وزن عضله اسکلتی و تغییر در ویژگی‌های انقباضی منجر می‌شود. بیش‌تر این سازگاری‌ها با افزایش اندازه میوفیبریل‌ها[۶] و تغییر در ترکیب پروتیین‌های انقباضی و متابولیکی سلول عضلانی همانند تغییر ایزوفرم عضله همراه است.[۷] تغییر نوع و میزان پروتیین‌های سلول عضلانی می‌تواند نتیجه تغییر مقادیر نسخه‌برداری و ترجمه ژن‌های سلول عضلانی باشد. در محیط‌های In vivo و In vitro برخی از mRNAهای عضله اسکلتی شناسایی شده‌اند که به افزایش اضافه بار پاسخ می‌دهند.[۷] تمرین قدرتی با تاثیر بر ساختار و محتوی پروتیینی عضله اسکلتی سبب افزایش قدرت و توان عضله می‌شود. یکی از این پروتیین‌های موثر بر افزایش قدرت در سارکومر عضله اسکلتی، آلفا اکتینین است.

تاکنون پژوهش‌های کمی به بررسی سازگاری این پروتیین به تمرین ورزشی پرداخته‌اند. Ogura پس از ۹ هفته تمرین سرعتی دریافتند محتوی پروتیین آلفا اکتینین سه تغییری نکرده، اما بیان آلفا اکتینین دو افزایش یافته است.[۸] در پژوهش دیگری که در آن تاثیر یک دوره فعالیت ورزشی آسیب‌زا بر تغییرات آلفا اکتینین بررسی شد، Yu گزارش کرد، بیان آلفا اکتینین پس از فعالیت ورزشی آسیب‌زا کاهش می‌یابد، آن‌ها دریافتند این کاهش پس از گذشت روزهایی به اوج خود می‌رسد و به‌تدریج در هفت تا هشت روز پس از فعالیت بازسازی می‌شود.[۹] با وجود این، داده‌های کمی درباره تاثیر تمرین طولانی‌مدت بر مقادیر بیان ژن و محتوی پروتیینی آلفا اکتینین سه در عضلات اسکلتی پستانداران وجود دارد. با توجه به تاثیر تمرین مقاومتی فزاینده بر کسب و افزایش قدرت عضلانی و با توجه به جایگاه و نقش موثر ساختاری و عملکردی آلفا اکتینین‌ها در سارکومر عضله اسکلتی، به‌نظر می‌رسد بررسی تاثیر تمرین ورزشی بر این پروتیین‌ها ضروری است.

از آنجایی که نمی‌توان در پژوهش‌های انسانی بیش‌تر عامل‌های اثرگذار را کنترل کرد و از آنجا که کنترل عامل‌های مداخله‌گر و مطالعه تاثیر خالص فعالیت ورزشی بر پروتیین‌های مورد نظر حایز

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-17]

اهمیت زیادی است، لذا بررسی پاسخ این ژن می‌تواند تا حدودی مسیر تاثیرگذاری محرک فعالیت ورزشی بر پیام‌های سلولی را مشخص کند، اما تاثیر تمرین ورزشی بر بیان ژن پروتیین‌های سارکومر عضله اسکلتی که مسئولیت تولید نیرو را به عهده دارند، کم‌تر مورد توجه بوده است.

از طرفی Vincent نیز نشان داد، بین ژنوتیپ‌های ACTN3 و درصد تارهای تند انقباض گلیکولیزی رابطه معنی‌داری وجود دارد و درصد حضور آلفا اکتینین سه در تارهای نوع IIX بیش‌تر از نوع IIa می‌باشد. این یافته‌ها نشان می‌دهند احتمالا سازوکاری که با آن پلی‌مورفیسم ژن ACTN3 بر کسب توان عضلانی اثرگذار است، بر تنظیم و نسبت انواع تار نیز موثر است.[۱۰] Ogura نیز از جهات دیگری به بررسی تغییرات بیان ژن آلفا اکتینین سه پرداخت. آن‌ها با توجه به کشف رابطه بین حضور آلفا اکتینین سه و تغییر نوع تار، به بررسی پاسخ سازگاری آلفا اکتینین سه، به تغییر نوع تار پرداختند. آن‌ها دریافتند پس از یک دوره غیرفعال کردن (Unloading) عضله، و تغییر نوع تار از کند انقباض به تند انقباض در موش‌ها، میزان بیان آلفا اکتینین سه افزایش داشته، اما تغییری در بیان آلفا اکتینین دو مشاهده نشده است.[۱۱] نتایج ضد و نقیض تغییرات زنجیره سنگین میوزین در اثر فعالیت ورزشی و ارتباط آن با انواع ژنوتیپ ACTN3 و یا بیان این ژن گزارش شده است.[۱۲و۱۰و۱]

هنوز مشخص نیست که آیا هشت هفته تمرین مقاومتی فزاینده با هدف هیپرتروفی می‌تواند سبب تغییر میزان بیان ژن آلفا اکتینین ۳ در خط Z سارکومری شود؟آیا تحریک بیان ژن آلفا-اکتینین ۳ با تغییرات پروتئین زنجیره سنگین میوزین همبستگی دارد؟ بنابراین، مطالعه حاضر در موش‌های صحرایی اسپراگ انجام شد تا بدون تاثیر عوامل ژنتیکی، محیطی و انواع ژنوتیپ‌های گوناگون که در ژن آلفا اکتینین سه انسان دیده شده است، بتوان تاثیر خالص تمرین را شناسایی کرد.

روش بررسی

این پژوهش از نوع تجربی و آزمایشگاهی و با مدل حیوانی است و در آزمایشگاه حیوانات دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه تهران انجام شد. در این پژوهش تغییرات حاصل از اجرای یک دوره تمرین قدرتی فزاینده هشت هفته‌ای در گروه تمرینی (n=۲۲) به‌همراه گروه کنترل (n=۱۸) از موش‌های صحرایی ماده بر بیان ژن ACTN3 و پروتیین‌های زنجیره سنگین مورد مطالعه قرار گرفت. نمونه‌های پژوهش عبارت بودند از ۴۵ سر موش صحرایی ماده سه ماهه از نژاد اسپراگ با دامنه وزنی ۲۰۰gr–۱۸۵ که از مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی انستیتو رازی ایران تهیه و به آزمایشگاه حیوانات دانشگاه تهران انتقال داده شدند. گروه آزمایشی (n=۵) ۲۰ روز زودتر وارد محیط آزمایشگاه شدند و تحت آزمایش‌های گوناگون قرار گرفتند.

حیوانات پس از انتقال به آزمایشگاه و قرار گرفتن در محیط پژوهش و آشنایی با فعالیت ورزشی نردبان عمودی ویژه جوندگان، بر اساس تکرار بیشینه (One repetition maximum) موش‌ها به دو گروه کنترل و تمرین تقسیم شدند. برای آماده کردن شرایط محیطی مناسب موش‌ها از آخرین توصیه‌های علمی و اصولی ارایه شده در کدهای اخلاقی نگه‌داری و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی در تحقیقات که توسط کشور استرالیا به چاپ رسیده است، استفاده شد.[۱۳و۱۴]

بر این اساس، موش‌های صحرایی در این پژوهش به‌صورت گروهی (چهار سر موش) در قفس‌هایی از جنس پلی‌کربنات شفاف و در محیطی با دمای استاندارد تعریف شده برای رت‌ها ۲۶–۱۸ °C و رطوبت ۳۰ تا ۷۰٪ نگه‌داری شدند. به‌منظور اجرای اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی و ارتقای کیفیت زندگی (Animal welfare and wellbeing) و تعدیل استرس ناشی از محیط، از لوله‌های پلاستیکی به طول ۲۰ سانتی‌متر در داخل قفس به‌منظور سرگرمی استفاده شد. با توجه به تحقیقات انجام‌شده[۱۵و۱۴] درباره بهترین زمان فعالیت موش‌های آزمایشگاهی در تاریکی، از چرخه معکوس تاریکی به روشنایی هر ۱۲ ساعت از ساعت هشت صبح تا ۲۰ بعد از ظهر استفاده شد، به شکلی که همه حیوانات در تاریکی تمرین می‌کردند و حیوانات آزمایشی نیز در همین شرایط آماده شدند. وضعیت آلاینده‌های هوا با توجه به شاخص استاندارد آلاینده‌ها (PSI) در بخش اعظم دوره پژوهش (دست‌کم یک هفته قبل از اتمام مراحل نمونه‌گیری) در وضعیت سالم قرار داشت. با وجود این، برای حفظ دما، رطوبت هوا و تهویه مناسب (برای تعدیل میزان آلودگی موجود در مکان آزمایشگاه و کاهش بوی محیط ناشی از تجمع آمونیاک

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-17]

حاصل از ادرار و کاهش بروز بیماری‌های تنفسی در آزمودنی‌ها و همکاران تحقیق) از دستگاه تصفیه هوا، دماسنج و رطوبت‌سنج دیجیتال با قابلیت ثبت تغییرات طی ۲۴ ساعت، دستگاه تهویه هوا، چیلر گرمایی و یک دستگاه بخور سرد استفاده شد. برای جمع‌آوری ادرار و مدفوع آزمودنی‌ها نیز از تراشه‌های استریل که از مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی انستیتو سرم‌سازی رازی ایران تهیه شده بود، استفاده شد.

آشنایی آزمودنی‌ها با محیط و فعالیت روی نردبان عمودی: انتقال حیوانات آزمایشگاهی از محیطی به محیط دیگر باعث بروز استرس و تغییرات فیزیولوژیکی در آنان می‌شود و حیوانات برای سازگاری با شرایط جدید به زمان نیاز دارند.[۱۴] در این پژوهش، موش‌های صحرایی پس از انتقال به آزمایشگاه حیوانات به‌مدت ۱۴ روز برای سازگاری با محیط جدید در اتاق ویژه استراحت حیوانات نگه‌داری شدند. ابتدا آزمودنی‌های گروه آزمایشی همه مراحل پروتکل را تجربه کردند و سپس گروه اصلی همان مراحل را تکرار کردند. آشناسازی حیوانات با نردبان عمودی در سه جلسه تمرینی در یک هفته انجام شد. نردبان عمودی به ارتفاع ۱/۵m و فاصله پله‌های آن ۲cm و زاویه آن ۸۵ درجه بود که در قسمت فوقانی محفظه‌ای کاملا مجزا برای استراحت حیوان تعبیه شده بود. برای حمل وزنه تمرینی ابتدا نقطه مورد نظر اتصال کیسه حمل وزنه توسط چسب لکوپلاست پوشیده و سپس کیسه با پارچه‌ای به دم چسبیده می‌شد تا حیوان کم‌ترین آزردگی را هنگام حمل وزنه تحمل کند. وزنه‌هایی که در داخل کیسه گذاشته می‌شد وزنه‌های سربی با وزن مشخص بود که به‌دلیل کوچک بودن و در عین حال وزن‌دار بودن از آن‌ها استفاده شد. اتصال کیسه به دم حیوان در دوسوّم انتهای فوقانی دم حیوان انجام می‌شد. آزمودنی‌ها در پایین نردبان گذاشته شده و با تکان دادن انتهای دم حیوان برای بالا رفتن تحریک می‌شدند. پس از مدت مذکور، آزمودنی‌های گروه آزمایشی ابتدا به‌مدت یک هفته (سه جلسه تمرینی) پروتکل تمرینی را در اتاق تمرین و در چرخه تاریکی انجام دادند. حداکثر وزنه حمل‌شده توسط آزمودنی پس از امتناع از بالارفتن بدین شکل قابل تشخیص بود که اگر حیوان پس از ممانعت از بالا رفتن با سه تحریک پیاپی (ایجاد صدای بلند و یا تکان دادن دم) باز هم بالا نرود، به‌منزله اتمام فعالیت حیوان در آن جلسه و رسیدن به درماندگی بود. در پروتکل تمرینی هر جلسه تمرین چهار تکرار اول با ۵۰٪، ۷۵٪، ۹۰٪ و ۱۰۰٪ وزن بدن حیوان آغاز می‌شد و در تکرارهای بعدی هر بار ۳۰ گرم به وزنه‌ها اضافه می‌شد تا حیوان به درماندگی برسد. آخرین وزنه حمل شده در هر جلسه ۱RM (یک تکرار بیشینه) جلسه بعدی در نظر گرفته می‌شد که بر اساس آن وزنه‌های آن جلسه تمرینی تعیین می‌گردید. این دوره تمرینی شامل ۲۰ جلسه بود که هر سه روز در میان انجام می‌شد. در این دوره تمرینی از هیچ شوک الکتریکی استفاده نشد.

استخراج و سنجش بیان ژن ACTN3:

آماده‌سازی نمونه: برای بیرون آوردن عضله مورد سنجش، عضله تاکننده دراز انگشت شست پا (Flexor Hallucis Longus, FHL)، در دو گروه کنترل و تمرین ابتدا موش‌ها با ترکیبی از داروی بیهوشی (Ketamine, Merck, Germany) (۷۵mg/kg) و (Xylazine, Merck, Germany) (۱۰mg/kg) به نسبت وزن بدن و جنسیت بیهوش می‌شدند. سپس برای اطمینان از کم‌ترین آزار حیوان، ابتدا بلافاصله از قلب حیوان به‌طور مستقیم خون‌گیری به‌عمل می‌آمد. برای سنجش میزان بیان mRNA ژن ACTN3 نمونه‌های عضلات استخراج شده از موش‌های صحرایی را سریع در ازت مایع قرار داده و سپس به فریزر ۸۰- منتقل می‌شد.

استخراج RNA: از بافت عضله به کمک کیت (RNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN, USA) (شماره کاتالوگ: ۷۴۱۳۴) انجام گرفت. بسته به نوع بافت، ۳۰ گرم بافت عضله را در ازت مایع تخریب و هموژنایز شد. اتانولی که پس از آن به محتویات این محصول لیز اضافه شد شرایطی ایجاد کرد که باعث اتصال اختصاصی RNA به غشا (RNeasy (Membrane شد. پس از آن نمونه به ستون منتقل می‌شود و RNA به غشای متصل شده و سایر آلودگی‌ها شسته شدند. RNA استخراج‌شده به‌سرعت به ۷۰ °C- منتقل شد. قبل از آن با (Spectrophotometer, NanoDrop™ 2000, Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, USA) با استفاده از فرمول یک غلظت RNA استخراج شده محاسبه گردید.

فرمول ۱: ضریب رقت×۴۰×OD۲۶۰=غلظت RNA (میلی‌گرم/میلی‌لیتر)

واکنش رونویسی معکوس برای سنتز cDNA: واکنش رونویسی ویژه ساخت رشته اول cDNA انجام شد. برای انجام این واکنش از کیت (QuantiTect Reverse Transcription, QIAGEN, USA) (شماره کاتالوگ: ۲۰۵۳۱۱) استفاده شد.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-17]

جدول ۱: طراحی پرایمر ژن‌های ACTN3 و β-Actin

نام پرایمر	توالی پرایمر
ACTN3 Forward	5’-AGAAACAGCAGCGGAAAACC -3’
Actin-β Forward	5’-ACCATGTACCCAGGCATTGC -3’
ACTN3 Revers	5’-CAGGGCTTTGTTGACATTG -3’
Actin-β Revers	5’-ATGACTCTACCCACGGCAAG -3’

جدول ۲: تنظیمات انجام واکنش Real Time

مرحله	تعداد سیکل	مدت زمان	دما (°C)
واسرشت‌سازی اولیه	۱	۵ دقیقه	۹۵
تکثیر	۴۵	۱۰ ثانیه	۹۵
		۳۰ ثانیه	۶۰
منحنی ذوب	۱	۱۵ ثانیه	۹۵
	۱	۶۰ ثانیه	۶۰

Real Time PCR: در این پژوهش از روش کمی- مقایسه‌ای با استفاده از رنگ‌آمیزی SYBR-Green برای تعیین میزان بیان mRNA ژن ACTN3 موش‌های صحرایی نژاد اسپراگ استفاده شد. برای مقایسه کیفی و کمی در میزان بیان ژن‌های مذکور، از بیان ژن β-ACTIN به‌عنوان ژن کنترلی (Housekeeping gene) استفاده شد. برای انجام این واکنش ابتدا پرایمرهای مناسب با شرایط لازم برای Real Time طراحی و تهیه گردید (پرایمرهای ACTN3 و β-ACTIN جدول ۱). تنظیمات Real-time طبق جدول ۲ صورت گرفت.

تعیین نوع تار: آماده‌سازی نمونه‌ها: برای سنجش میزان و درصد انواع تارهای عضله اسکلتی، از روش رنگ‌آمیزی بافت استفاده شد. ابتدا نمونه‌های فریز شده با چسب (Tissue-Tek, Sakura Finetechnical Company, Tokyo, Japan)، برای برش آماده شدند. برش نمونه‌ها بر روی لام با قطر هشت میکرومتر صورت گرفت. پس از برش نمونه‌ها، ابتدا با استون در دمای ۲۰- ثابت شدند و سپس رنگ‌آمیزی صورت گرفت. برای رنگ‌آمیزی ابتدا پروتیین‌های نمونه‌ها در هر برش با BSA 2% (Bovine Serum Albumin) ۵۰µl بلاک شدند و سپس با استفاده از آنتی‌بادی‌های اولیه (مدت زمان انکوبه شدن یک ساعت) زنجیره سنگین میوزین تارهای نوع I, IIX, IIB با نام‌های BF-F3، SC-71, DmEm n+4 6H1 به‌ترتیب استفاده شدند. میزان آنتی‌بادی برای هر برش ۵۰ میکرولیتر بود. سپس با بافر فسفات سالین ۱٪ (PBS1%) برش‌ها شستشو شدند و در نهایت با آنتی‌بادی‌های ثانویه فلورسنس رنگ‌آمیزی شدند.

آنتی‌بادی‌های ثانویه برای هر سه آنتی‌بادی از نوع anti-mouse IgM, IgG بود. پس از اتمام رنگ‌آمیزی، اسلایدها با چسب اینتلان (Entellan, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) ثابت شده و برای مشاهده از Fluorescence microscopy مجهز به دوربین Nikon استفاده شد. از آمار توصیفی برای دسته‌بندی داده‌های خام و تنظیم جداول و از برنامه Microsoft Office Excel برای تنظیم نمودارها استفاده شد. برای تشخیص همسانی و طبیعی بودن اطلاعات مربوط به آزمودنی‌های گروه‌های پژوهش، آزمون کولموگروف اسمیرنوف و سپس از Independent T-test برای بررسی اختلاف میانگین بین گروهی استفاده شد. برای تعیین سطح معنی‌داری در بررسی داده‌های مربوط به بیان ژن از نرم‌افزار REST 2009 ساخت شرکت کیاژن استفاده شد. برای تعیین ارتباط بین متغیرهای پژوهش از آزمون پیرسون استفاده شد. سطح معنی‌داری آزمون‌ها $\alpha \leq ۰/۰۵$ تعیین و برای انجام محاسبات آماری از SPSS ویراست ۱۳ استفاده شد.

یافته‌ها

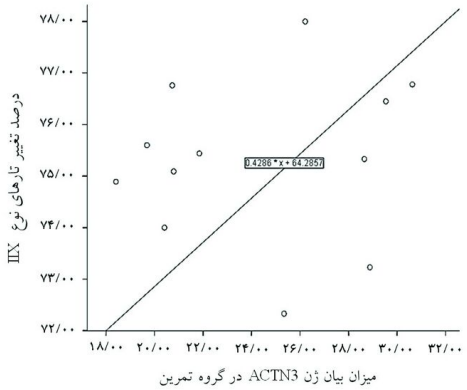
تفاوت معنی‌داری در وزن بدن حیوانات بین دو گروه کنترل و تمرین مشاهده نشد (۱۱±۲۰۴/۳۱). تمرین مقاومتی تاثیر معنی‌داری بر افزایش وزن عضله FHL در گروه تمرینی در مقایسه با گروه کنترل داشت (P=۰/۰۱) (جدول ۳).

جدول ۳: مقایسه تغییرات وزن بدن وزن عضله FHL بین گروه کنترل و تمرین پس از دوره تمرینی (P=۰/۰۱)

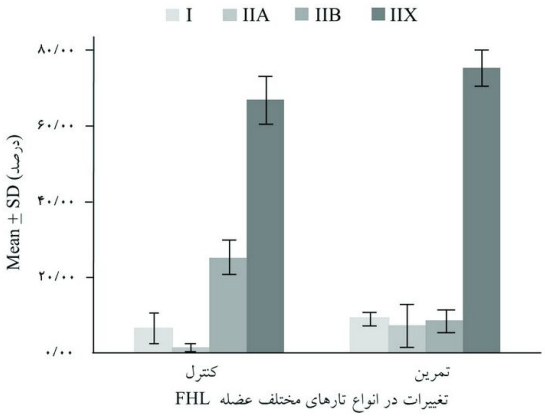
گروه	وزن اولیه (گرم)	وزن نهایی (گرم)	وزن عضله FHL
کنترل	۱۷۱±۴	۲۰۲±۹	۲۹۸/۳۰±۳۶
تمرین	۱۶۹±۱۲	۲۰۷±۹	۴۰۲/۹۲±۴۱

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-17]

نمودار ۱: میزان بیان ژن ACTN3 عضله FHL بین گروه‌های تمرین و کنترل



نمودار ۳: ارتباط بین بیان ژن ACTN3 و درصد تغییر تارهای نوع IIX در عضله FHL



نمودار ۲: میانگین درصد انواع تارهای مختلف عضله FHL دو گروه کنترل و تمرین پس از دوره تمرینی

تغییرات بیان ژن ACTN3 در گروه‌های تمرینی و کنترل: با توجه به‌میزان بیان ژن Relative quantitative ratio (RQ) به‌دست آمده (نمودار ۱) با استفاده از نرم‌افزار StepOne™ Software V2.2 (Applied Biosystems, Austin, TX, USA) به‌منظور مقایسه بیان ژن ACTN3 با بیان ژن کنترل منفی و هم‌چنین تعیین میزان بیان ژن، نشان داده شد بیان ژن ACTN3 در گروه تمرین ۱/۶۹ برابر نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است. اما در آزمون سطح معنی‌داری نشان داده شد این اختلاف معنی‌دار نبوده است (P=۰/۸۵۲).

تغییرات نوع تار در عضلات FHL در گروه‌های تمرینی و کنترل: چنانچه در نمودار ۲ دیده می‌شود، در درصدهای ارایه‌شده، درصد تارهای نوع IIB گروه تمرین کاهش و به نسبت‌های گوناگون درصد تارهای IIX و IIA و I عضله FHL افزایش داشته‌اند.

ارتباط بین تغییرات نوع تار و بیان ژن ACTN3 در عضله FHL: نتایج نشان داد، بین پاسخ بیان ژن ACTN3 عضله اسکلتی به یک دوره تمرین مقاومتی فزاینده و درصد تغییرات تارهای نوع IIX (عضله FHL) ارتباط معنی‌داری وجود ندارد (r=۰/۱۲) (نمودار ۳).

بحث

نتایج پژوهش نشان داد هشت هفته تمرین مقاومتی سبب بروز هیپرتروفی عضلانی می‌شود علی‌رغم افزایش ۱/۶۹ برابری بیان ژن ACTN3 در گروه تمرینی، این تفاوت معنی‌دار نبود (P=۰/۸۵۲). در دیگر نتایج پژوهش نشان داد بین بیان ژن ACTN3 عضله FHL و درصد تغییرات تارهای نوع IIX نیز رابطه معنی‌داری وجود ندارد (r=۰/۱۲). علی‌رغم عدم تفاوت معنی‌دار در وزن گروه کنترل و تمرین پس از دوره تمرین قدرتی، تفاوت معنی‌داری بین وزن عضله FHL گروه کنترل و تمرین پس از یک دوره تمرین مقاومتی فزاینده مشاهده شد (P=۰/۰۱).

پژوهش‌های بسیاری بر تاثیر تمرین مقاومتی و رشد عضلانی تاکید داشته‌اند و معتقدند افزایش سیگنال‌های رشدی سلول عضله و

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-17]

ایجاد سازگاری در سیگنال‌های آنابولیکی، اساس رشد سلول عضله است.[۱۶] از طرفی، Haddad افزایش بیان عامل شبه انسولینی IGF-1 و عامل رشد عضلانی (MGF) را دلیل افزایش رشد عضله می‌دانند.[۱۶] Spangenburg سازگاری‌های سلولی عضله اسکلتی را مرحله بعد از تغییرات عصبی- عضلانی موثر در افزایش قدرت گزارش کرده و معتقد است پس از این مرحله، عملکرد عضلانی تحت تاثیر سازگاری‌های سلولی عضله، افزایش می‌یابد.[۱۷] در پروتکل تمرینی استفاده شده در این پژوهش نیز عضله اصلی درگیر در بالارفتن از نردبان را می‌توان عضله FHL در نظر گرفت که بیش‌ترین سازگاری را به تمرین مقاومتی نشان داده است. علی‌رغم تغییرات ایجاد شده در وزن عضله FHL، Gaeini، نشان داد تغییر معنی‌داری در مقادیر پروتیینی آلفا اکتینین سه مشاهده نکردند.[۱۸] آن‌ها علت معنی‌دار نبودن تفاوت میزان آلفا اکتینین سه گروه کنترل و تمرین را کافی نبودن طول دوره تمرینی گزارش کرده‌اند. هم‌چنین، آن‌ها نتیجه‌گیری کرده‌اند علی‌رغم تغییرات وزن عضلات و بدن آزمودنی‌ها که نشانه شکل‌گیری هیپرتروفی است، اما شاید این میزان تمرین و شدت برای تحریک پاسخ‌های فیزیولوژیک آلفا اکتینین سه کافی نباشد.[۱۸] پژوهش مستقیمی درباره تاثیر تمرین و فعالیت ورزشی بر بیان ژن ACTN3 صورت نگرفته است.

تنها پژوهشی که درباره بیان ژن ACTN3 و فعالیت ورزشی انجام شده است، بررسی بیان ژن ACTN3 در ژنوتیپ‌های گوناگون بین افراد ورزیده مقاومتی بوده است. نتیجه پژوهش حاضر با نتیجه پژوهش Norman درباره عدم تغییر معنی‌دار بیان ژن ACTN3 عضله اسکلتی هم‌سو است.[۱۹]

Norman معتقد است افرادی که ژنوتیپ جهش یافته دارند و فاقد بیان ژن ACTN3، سازگاری بهتری در کسب قدرت و توان در پاسخ به تمرین قدرتی داشته‌اند. او معتقد است پاسخ ژن ACTN3 بیش‌تر از آن‌که متاثر از انواع ژنوتیپ باشد، بیش‌تر متاثر از شدت، مدت، نوع تمرین و ترکیبات تار است.[۱۹] از طرفی، در پژوهش دیگری نتیجه‌ای ناهمسو نشان داده شد. Ogura نشان داد ژن ACTN3 تنها در شرایط غیر فعال کردن عضله و در صورتی که تغییر نوع تار صورت گیرد، افزایش خواهد یافت.[۱۱] علت عدم تغییر معنی‌دار ژن ACTN3 را می‌توان در ماهیت این ژن جستجو کرد. احتمالاً ژن ACTN3 از گروه ژن‌هایی است که محرک‌های ویژه‌ای با توجه به تحریک ابتدایی مسیرهای سوخت و سازی و تغییر تار، می‌تواند در بیان آن تغییر ایجاد کنند. ژن‌های بسیاری به تمرین‌ها و فعالیت‌های گوناگون پاسخ می‌دهند، اما ژن ACTN3 با این‌که در گروه تمرینی این پژوهش اندکی افزایش نشان داد، احتمالاً به‌دلیل حساسیت‌های ویژه در ساختار ژنومی و تکاملی این ژن، به تحریکاتی قوی‌تر نیاز دارد تا بتواند به تمرین‌ها به‌ویژه تمرین قدرتی پاسخ معنی‌دار دهد. آنچه که در پاسخ‌های سلولی ژن‌های مسئول پروتیین‌های سارکومر عضله اسکلتی به تمرین ورزشی تاکنون مورد توجه بوده است، بیش‌تر معطوف به ژن‌های کلسی‌نورین و تیتین، دیستروفین و اینتگرین می‌باشد.[۹و۲۰-۲۲] در پژوهشی که Seto پس از یک وهله فعالیت ورزشی آسیب‌زا نشان داد میزان بیان ژن‌های میوتیلین (Myotilin)، گاما- فیلامین (γ-filamin)، دسمین (Desmin)، آلفا بتا کریستالین (α-β-Cristalin)، زسپ (ZASP) (که همگی در بازسازی و بازشکل‌گیری عضله موثرند) افزایش داشته است، اما میزان بیان پروتیین آلفا اکتینین سه تغییری نکرده است.[۱۲]

با توجه به ارتباط قوی ACTN3 و دیگر پروتیین‌های سارکومر عضله اسکلتی می‌توان تغییر یا عدم تغییر بیان ژن ACTN3 به آبشارهای سیگنالی و مراحل تغییر ساختارهای عضله اسکلتی تحت تاثیر شرایط فیزیولوژیکی و پاتوفیزیولوژیکی نسبت داد. هم‌زمان با بررسی پاسخ آلفا اکتینین‌ها به تمرین‌های گوناگون، پیشنهاد می‌شود پروتیین‌ها و شاخص‌های دیگری در ارتباط با سازگاری‌های سلول عضله اسکلتی مطالعه تا مشخص گردد محرک فعالیت ورزشی که هدف بسیاری از ورزشکاران و افراد جامعه می‌باشد، تا چه حد بر عملکرد سلولی و ساختار آن موثر است. شاید با تعیین این آثار و تعریف دقیق‌تری از نوع تمرینات بتوان به اهداف تمرینی در زمان کوتاه‌تر و با کیفیت بالاتری دست یافت.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه تحت عنوان "بررسی میزان تغییرات بیان ژن و پروتیین ACTN3, ACTN2 سارکومر عضله اسکلتی در پاسخ به هشت هفته تمرین مقاومتی" مقطع دکتری در سال ۱۳۹۰ دانشگاه تهران که با حمایت معاونت پژوهشی وزارت علوم، تحقیقات و فناوری و پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک اجرا شد. بدین‌وسیله از حمایت‌های جناب دکتر محمد مهدی‌نژاد نوری، مهندس اسماعیل قادری‌فر و دکتر عباس صاحبقدم لطفی به‌دلیل حمایت‌های مادی و معنوی ایشان تقدیر و تشکر به‌عمل می‌آید.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-17]

References

1. Macarthur DG, North KN. Genes and human elite athletic performance. *Hum Genet* 2005;116(5):331-9.
2. North KN, Beggs AH. Deficiency of a skeletal muscle isoform of alpha-actinin (alpha-actinin-3) in merosin-positive congenital muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 1996;6(4):229-35.
3. North K. Why is alpha-actinin-3 deficiency so common in the general population? The evolution of athletic performance. *Twin Res Hum Genet* 2008;11(4):384-94.
4. MacArthur DG, North KN. A gene for speed? The evolution and function of alpha-actinin-3. *Bioessays* 2004;26(7):786-95.
5. Yang N, MacArthur DG, Gulbin JP, Hahn AG, Beggs AH, Easteal S, et al. ACTN3 genotype is associated with human elite athletic performance. *Am J Hum Genet* 2003;73(3):627-31.
6. Degens H, Meessen NE, Wirtz P, Binkhorst RA. The development of compensatory hypertrophy in the plantaris muscle of the rat. *Ann Anat* 1995;177(3):285-9.
7. Booth FW, Tseng BS, Fluck M, Carson JA. Molecular and cellular adaptation of muscle in response to physical training. *Acta Physiol Scand* 1998;162(3):343-50.
8. Ogura Y, Naito H, Kakigi R, Akema T, Sugiura T, Katamoto S, et al. Different adaptations of alpha-actinin isoforms to exercise training in rat skeletal muscles. *Acta Physiol (Oxf)* 2009;196(3):341-9.
9. Yu JG, Furst DO, Thornell LE. The mode of myofibril remodelling in human skeletal muscle affected by DOMS induced by eccentric contractions. *Histochem Cell Biol* 2003;119(5):383-93.
10. Vincent B, De Bock K, Ramaekers M, Van den Eede E, Van Leemputte M, Hespel P, et al. ACTN3 (R577X) genotype is associated with fiber type distribution. *Physiol Genomics* 2007;32(1):58-63.
11. Ogura Y, Naito H, Kakigi R, Ichinoseki-Sekine N, Kurosaka M, Katamoto S. Alpha-actinin-3 levels increase concomitantly with fast fibers in rat soleus muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;372(4):584-8.
12. Seto JT, Chan S, Turner N, MacArthur DG, Raftery JM, Berman YD, et al. The effect of alpha-actinin-3 deficiency on muscle aging. *Exp Gerontol* 2011;46(4):292-302.
13. The APS Resource Book for the Design of Animal Exercise Protocols. American Physiological Society, 2006.
14. Australian Antarctic Division on behalf of the Antarctic Animal Care and Ionising Radiation Usage Ethics Committee. Guidelines for research involving animal experimentation or use of ionising radiation. Hobart, Tasmania: Commonwealth of Australia, 1989.
15. Perry M. Revised Australian Code of Practice for the care and use of animals for scientific purposes. *Aust Vet J* 1998;76(4):286.
16. Haddad F, Adams GR. Selected contribution: acute cellular and molecular responses to resistance exercise. *J Appl Physiol* 2002;93 (1):394-403.
17. Spangenburg EE. Changes in muscle mass with mechanical load: possible cellular mechanisms. *Appl Physiol Nutr Metab* 2009;34 (3):328-35.
18. Gaeini AA, Khaledi N, Ravasi AA. The Response of skeletal muscle sarcomeric proteins to 8 week progressive resistance training in Sprague-Dawley rats. *Olympic J* 2012;56(2):56-64.
19. Norman B, Esbjörnsson M, Rundqvist H, Osterlund T, von Walden F, Tesch PA. Strength, power, fiber types, and mRNA expression in trained men and women with different ACTN3 R577X genotypes. *J Appl Physiol* 2009;106(3):959-65.
20. Frank D, Kuhn C, Katus HA, Frey N. The sarcomeric Z-disc: a nodal point in signalling and disease. *J Mol Med (Berl)* 2006;84(6):446-68.
21. He Y, Jones KJ, Vignier N, Morgan G, Chevallay M, Barois A, et al. Congenital muscular dystrophy with primary partial laminin alpha2 chain deficiency: molecular study. *Neurology* 2001;57(7): 1319-22.
22. Ilkovski B, Clement S, Sewry C, North KN, Cooper ST. Defining alpha-skeletal and alpha-cardiac actin expression in human heart and skeletal muscle explains the absence of cardiac involvement in ACTA1 nemaline myopathy. *Neuromuscul Disord* 2005;15(12): 829-35.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-17]

TUMJ monthly Tehran University Medical Journal
Tehran University Medical Journal, April 2013; Vol. 71, No. 1: 37-45 *Original Article*

Changes in ACTN3 gene expression and fiber type composition in flexor hallucis longus muscle after eight weeks progressive resistance training in Sprague-Dawley rats

Abbas Ali Gaeini Ph.D.[1]
Neda Khaledi Ph.D.[2*]
Rana Fayazmilani Ph.D.[3]
Aliasghar Ravasi Ph.D.[1]
Golnoosh Sedghroohi Ph.D.[4]
Vahid Arabkari M.Sc.[5]

1- Department of Exercise Physiology, School of Physical Education and Sport Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran.
2- Department of Exercise Physiology, School of Physical Education and Sport Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.
3- Department of Exercise Physiology, School of Physical Education and Sport Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.
4- Department of Exercise Physiology, School of Physical Education and Sport Sciences, University of Tehran, International Campus, Kish Island, Iran.
5- Department of Anatomical Sciences, School of Medical Sciences, Tarbiad Modares University, Tehran, Iran.

[*] Corresponding author: Dept. of Exercise Physiology, Kharazmi University, Keshvari Sport Complex, South Razan St., Mirdamad Blvd., Tehran, Iran.
Tel: +98-21-22228001
E-mail: n.khaledi@tmu.ac.ir

Abstract

Received: November 11, 2012 Accepted: January 12, 2013

Background: Alpha-actinins are located in the skeletal muscle Z-line and form actin–actin cross-links. It belongs to a highly conserved family of actin-binding proteins- the spectrin superfamily, which also contains the spectrins and dystrophin. Mammalian skeletal muscle has two isoforms: alpha-actinins-2 and alpha-actinins-3. However, the response of alpha-actinins to exercise training is little understood. This study examined the effects of 8 weeks of resistance training on muscle mass, ACTN3 (alpha-actinins-3) gene expression levels and fiber type composition in the flexor hallucis longus (FHL) muscle.

Methods: Forty five female Sprague-Dawley rats (Initial body mass: 169.25±9gr age: 3 month) were obtained and assigned to a control (C; n=18) or exercise training (T; n=22) and pilot (P; n=5) groups. The resistance training consisted of climbing a ladder carrying a load suspended from the tail and the weight increased progressively. Real-time PCR and Immunohistochemistry techniques were used to measure gene expression levels and myosin heavy chain (MyHC) composition, respectively.

Results: Following 8 weeks of training, we observed significant increase in absolute muscle mass in FHL (P=0.01). Results showed that no significant difference was found in ACTN3 gene expression levels between training and control groups (P=0.852 respectively). Also, Pearson coefficient didn't indicated any significant relationships in gene expression and Fiber type IIX in response to resistance training in FHL (r=0.12).

Conclusion: However, resistance training effects on sarcomeric proteins development, these results showed no effect of resistance training on alpha-actinins-3 levels. Although alpha-actinins-3 has an important function to produce and progress of force in sarcomere, but didn't changed significantly in response to resistance training.

Keywords: Alpha-actinins, flexor hallucis longus, resistance training, vertical ladder, z-line.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-17]