

## تأثیر فعالیت استقامتی شدید بر بیان ژن فاکتور ۲ افزایش دهنده میوسیت‌های نوع C در عضلات کند و تند انقباض موش صحرایی نر: یک مطالعه تجربی

راضیه رضایی<sup>۱</sup>، محمد فتحی<sup>۲</sup>

دریافت مقاله: ۹۷/۶/۲۶ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۷/۷/۲۲ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۷/۱۲/۲۱ پذیرش مقاله: ۹۷/۱۲/۲۲

### چکیده

زمینه و هدف: فاکتور ۲ افزایش دهنده میوسیت‌های نوع c (MEF2c) موجب فعال‌سازی ژن‌های عضله کند انقباض می‌شود که در فعالیت استقامتی نقش دارند. هدف این مطالعه، تعیین اثر یک دوره فعالیت استقامتی شدید بر بیان ژن MEF2c در عضله اسکلتی تند و کند انقباض موش صحرایی نر نژاد ویستار است.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر ۱۴ موش صحرایی ( $24 \pm 231$  گرم) بعد از آشناسازی به صورت تصادفی به دو گروه کنترل (۷ سر) و تجربی (۷ سر) تقسیم شدند. گروه تجربی یک برنامه استقامتی (۳۰ متر در دقیقه، ۵۰ دقیقه در جلسه، ۶ جلسه در هفته به مدت ۱۴ هفته) را روی تردمیل اجرا کرد. ۴۸ ساعت پس از پایان آخرین جلسه بی‌هوش و تشریح شدند. عضله نعلی (کند انقباض) و عضله بازکننده بلند انگشتان (تند انقباض) خارج و با استفاده از روش واکنش زنجیره پلی‌مرز میزان بیان ژن MEF2c اندازه‌گیری شد. داده‌ها با استفاده از آزمون آماری t مستقل داده‌ها تحلیل شدند.

یافته‌ها: بیان ژن MEF2c در عضله تند انقباض گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری بیش‌تر بود ( $p=0/001$ ) و بیان ژن MEF2c در عضله نعلی گروه تجربی نسبت به گروه کنترل پس از ۱۴ هفته فعالیت استقامتی به طور معنی‌داری افزایش یافت ( $p=0/022$ ).

نتیجه‌گیری: فعالیت استقامتی شدید موجب افزایش بیان ژن MEF2c در عضلات اسکلتی تند و کند انقباض می‌شود و این تغییر بیان ژن، احتمالاً زمینه کسب خصوصیات استقامتی در هر دو عضله را فراهم می‌کند.

واژه‌های کلیدی: فعالیت استقامتی، ژن MEF2c، عضله نعلی، موش صحرایی، عضله بازکننده بلند انگشتان

۱- دانشجوی دوره دکترای فیزیولوژی ورزش، گروه تربیت‌بدنی و علوم ورزشی دانشکده تربیت‌بدنی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- نویسنده مسئول) استادیار فیزیولوژی ورزش، گروه تربیت‌بدنی و علوم ورزشی دانشکده علوم انسانی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

تلفن: ۰۶۶-۳۳۱۲۰۳۲۸، دورنگار: ۰۶۶-۳۲۷۲۱۷۲۵، پست الکترونیکی: fathi.m@lu.ac.ir

## مقدمه

فعالیت بدنی بر بافت عضلانی، پروتئین و ژن‌های آن‌ها تأثیرگذار است، از جمله این پروتئین و ژن‌ها می‌توان به فاکتور افزایش دهنده میوسیت نوع ۲ (Myocyte c 2 Enhancer Factor-2c; MEF2c) اشاره کرد [۱]. پروتئین MEF2c به عنوان یک عامل کلیدی در رشد، بیان ژن، کنترل نوع عضله درگیر است [۲]. ژن این پروتئین یعنی MEF2c (فاکتور-۲ افزایش دهنده میوسیت) با چندین فاکتور تنظیمی میوژنیک در ارتباط است و موجب فعال‌سازی ژن‌های ویژه عضله می‌شود [۳-۴]. برخی از ژن‌ها که توسط این فاکتور تنظیم می‌شوند عبارتند از مایوژین، پروتئین تمایزی عضله (myoD)، میوگلوبین و تروپونین C [۵]. بیان ایزومرهای MEF2c برای رشد و توسعه عضلات اسکلتی ضروری‌اند [۶] و در تمایز میوبلاست‌ها به میوتیوب‌ها نقش دارند، بسیاری از ژن‌های بیان‌شده در عضله به خصوص ژن‌های مرتبط با عضلات اسکلتی نوع کند توسط MEF2c تنظیم می‌شوند [۷].

فعالیت استقامتی بر فاکتورهای رونویسی تأثیر دارد، در تأیید این موضوع نتایج برخی پژوهش‌ها نشان داده که فسفوریلاسیون بخش تیرونین MEF2 در اثر یک جلسه تمرین ۹۰ دقیقه‌ای افزایش می‌یابد که موجب افزایش mRNA فاکتورهای MEF2a، MEF2c و MEF2d نیز می‌شود [۸]. در پژوهشی در بین مردان جوان مشخص شد که تمرین حاد استقامتی موجب افزایش فعالیت اتصال MEF2 به DNA می‌شود [۹].

فاکتور رونویسی MEF2c عمدتاً با فعال‌سازی بیان تارهای اکسیداتیو در ارتباط است، از جمله محرک‌هایی که بر فرآیندهای سلولی در عضلات تأثیرگذار است، فعالیت‌بدنی است [۸-۱۱]، که از طریق مسیرهای سیگنالینگ تغییراتی در ساختار و عملکرد عضله ایجاد

می‌کند [۱۲]. تحقیقاتی در این مورد صورت گرفته که نتایج برخی از آن‌ها گزارش می‌شود. مشخص شده که فعالیت‌بدنی باعث افزایش بیان MEF2c می‌شود [۱۳] و تغییر در عملکرد آن می‌شود [۱۴-۱۵] MEF2c در تمایز [۷] و تبدیل نوع تارها نیز نقش دارد [۱۶].

فعالیت استقامتی بر فعال‌سازی فرآیند تکثیر و تمایز سلول‌های ماهواره‌ای [۱۷] و تبدیل نوع تارها [۱۶، ۱۸-۱۹] اثر دارد از طرف دیگر ژن MEF2c در تمایز سلول‌های عضلانی به سمت تارهای کند انقباض نقش دارد [۳]. با توجه به تفاوت عضلات کند انقباض و تند انقباض در پاسخ به محرک یکسان (از نظر نوع فعالیت، حجم فعالیت و مدت فعالیت ورزشی) و هم‌چنین گستردگی فرآیندهایی که ژن MEF2c در آن‌ها دخیل است سؤال اصلی این پژوهش این است که آیا فعالیت‌های طولانی‌مدت استقامتی (محرک یکسان) تأثیر یکسانی بر بیان این ژن در عضلات تند و کند انقباض دارند؟ از آنجایی که روشن شدن تغییرات پایه‌ای فیزیولوژیکی و ژنتیکی درک ما را از تأثیر فعالیت‌های ورزشی بر عضلات اسکلتی چه با رویکرد درمانی و چه با رویکرد قهرمانی افزایش می‌دهد، انجام پژوهشی در این مورد ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین، هدف این پژوهش تعیین تأثیر یک دوره فعالیت استقامتی شدید بر بیان ژن MEF2c عضلات تند و کند انقباض موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار است.

## مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربی بود که بر روی موش‌های صحرایی سالم انجام شد. این پژوهش بر مبنای اصول اخلاقی انجام شده است پژوهش در سال ۱۳۹۶ با کد

۱۳۹۶۱۰۲۱۶۷۷ توسط کمیته اخلاق دانشگاه لرستان تأیید شده است. در این پژوهش اثر یک برنامه فعالیت استقامتی (۱۴ هفته) بر بیان ژن MEF2c عضلات تند و کند انقباض ارزیابی شد. در ابتدا ۲۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با ۵ هفته سن و وزن  $20 \pm 113$  گرم از انستیتو پاستور تهیه شد. همه آنها در شرایط مناسب (دسترسی آزاد به آب و غذای مخصوص موش صحرایی، چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت، میانگین دما  $3 \pm 22$  درجه سانتی گراد و رطوبت  $5 \pm 55$ ) به صورت یکسان در آزمایشگاه حیوانات تا رسیدن به سن بلوغ (۸ هفته) در ۴ قفس یکسان نگهداری شدند. در پایان این مرحله، میانگین و انحراف استاندارد وزن موش‌های صحرایی  $24 \pm 231$  گرم بود. سپس دوره آشناسازی با تمرینات استقامتی آغاز شد که ۱۰ روز (۵ جلسه) برای آشنایی با دویدن روی تردمیل (۹ متر در دقیقه، ۵ دقیقه و ۴ روز در هفته) زمان صرف شد، سپس به صورت تصادفی به ۲ گروه (۱۰ سر به عنوان گروه کنترل و ۱۰ سر دیگر به عنوان گروه تجربی) تقسیم شدند. از گروه تجربی ۳ سر نتوانست برنامه تمرینی را به پایان برساند، بنابراین با توجه به روش اندازه‌گیری نسبی (Real time relative quantification) در تکنیک واکنش زنجیره پلیمرز (Real-Time polymerase chain reaction) سه سر از گروه کنترل به صورت تصادفی کنار نهاده شد و تعداد نهایی به ۱۴ سر (۷ سر کنترل و ۷ سر تجربی) کاهش یافت.

با استفاده از منابع پیشین یک برنامه تمرین استقامتی برای آنان طراحی شد [۲۱-۲۰]. برنامه تمرینی (۱۴ هفته، هفته‌ای ۶ روز) گروه تجربی عبارت بود از دویدن روی تردمیل که سرعت و شیب و زمان آن قابل برنامه‌ریزی بود. پروتکل این پژوهش با یک دوره گرم‌کردن

آغاز می‌شد. دوره گرم کردن این پروتکل عبارت بود از ۵ دقیقه دویدن روی تردمیل با سرعت ۱۲ متر در دقیقه با شیب صفر درجه، بعد از گرم کردن بدنه اصلی پروتکل اجرا می‌شد که زمان آن ۵۰ دقیقه بود، اما سرعت آن طی دوره تمرینی یعنی ۱۴ هفته از ۲۰ متر در دقیقه (طی ۵ هفته اول) به ۳۰ متر در دقیقه رسید و از هفته هفتم تا پایان هفته دهم شیب تردمیل به ۵ درجه افزایش یافت و در نهایت تا پایان هفته چهاردهم پروتکل بدون تغییر اجرا شد. در پایان هر جلسه تمرینی بخش سرد کردن اجرا می‌شد که سرعت اجرای آن ۹ متر در دقیقه به مدت ۵ دقیقه بود. قابل ذکر است بخش اصلی این برنامه با حدود ۷۰ درصد حداکثر حجم اکسیژن مصرفی ( $VO_2 \max$ ) موش صحرایی اجرا شد [۲۲-۲۳] این برنامه بین ساعات ۵ تا ۷ بعد از ظهر هر روز اعمال می‌شد. طی این مدت گروه کنترل در داخل جعبه‌ها بودند و درگیر فعالیت بدنی نبودند.

بعد از پایان برنامه استقامتی و ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی موش‌های صحرایی با ترکیبی از کتامین (۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) بی‌هوش شدند. بعد از بیهوشی کامل (به طوری که به تحریک اعمال شده پاسخ ندهد)، عضله نعلی (عضله کند انقباض) و عضله باز کننده بلند انگشتان (Extensor digitorum longus; EDL) تحت شرایط استریل خارج شد. بافت‌های مورد نظر بلافاصله وارد تانک نیتروژن شدند. بعد از اتمام تشریح و تا شروع هموزن بافت‌ها، همه آنها در دمای  $-80$  درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند [۱].

برای استخراج ریبوز نوکلئیک اسید (RNA) از بافت‌های هموزن شده، به ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت داخل میکروتیوب، ۱ میلی‌لیتر ترایزول اینویترژن (Invitrogen)

اضافه شد و پس از مخلوط کردن کامل (پیپتاژ کردن) به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری (انکوبه) شد، سپس ۰/۲ میلی‌لیتر به آن کلروفورم سرد اضافه شد و پس از پیپتاژ (۱۵ ثانیه) حدود ۲ تا ۳ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد، در ادامه میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ (شرکت Eppendorff، مدل ۵۸۱۰ آلمان) شدند، سپس مایع رویی به دقت برداشته شد و به یک میکروتیوب RNAase free انتقال داده شد (از این مرحله به بعد با سرسمپلر فیلتردار کار شد). سپس ۰/۵ میلی‌لیتر ایزوپروپانول سرد اضافه شد و بعد از هم‌زدن ملایم در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد باقی ماندند (Overnight). روز بعد میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه مجدداً سانتریفیوژ شدند که در این مرحله یک رسوب سفید رنگ در ته اکثر میکروتیوب‌ها قابل مشاهده بود. با سمپلر (شرکت Eppendorff، آلمان) مایع رویی با دقت خارج شد و ۱ میلی‌لیتر اتانول خالص سرد به آن اضافه شد و بعد از تکان دادن مختصر به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با ۷۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و در ادامه مایع رویی به دقت تخلیه شد و ۱۰ دقیقه فرصت داده شد تا باقی‌مانده اتانول تبخیر شود و داخل میکروتیوب خشک شود. بعد از این مرحله ۵۰ لاند آب تزریقی به هر نمونه اضافه شد و چند بار به آرامی پیپتاژ صورت گرفت. در پایان غلظت و نسبت جذبی نمونه‌ها با استفاده از مدل دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Basic (شرکت Eppendorff، آلمان) ارزیابی شد که نسبت جذبی ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر برای تمام نمونه‌ها بین ۱/۶ تا ۱/۸ بود. تمام مراحل کار زیر هودی که از قبل آماده شده بود (استریل شده با الکل ۷۵ درصد و نور ماورا بنفش) انجام می‌شد، غیر از مرحله‌ای که نیاز بود

میکروتیوب‌های حاوی مواد، سانتریفیوژ و یا ورتکس شوند [۶].

برای رونویسی RNA به دزوکسی ریبوز نوکلئیک اسید مکمل (cDNA) از کیت شرکت ترموساینترفیک (Thermo Scientific) با کت نامبر Cat # K1621 استفاده شد. تمام مراحل مطابق دستورالعمل شرکت سازنده با استفاده از رندوم هگزامر (Random hexamer) انجام شد [۱]. ترموسایکلر مورد استفاده در این مرحله متعلق به شرکت Eppendorff آلمان بود. قبل از ارزیابی نهایی بیان ژن طبق دستورالعمل تکنیک Real time PCR نیاز بود که میزان کارایی (Efficiency) ژن رفرنس گلیسرآلدئید ۳ فسفات دی هیدروژناز (Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase; *gapdh*) و ژن هدف (MEF2c) برای هر عضله بررسی شود که مشخص شد میزان کارایی برای این دو ژن در بالاترین میزان خود (یعنی ۱) بود. در ادامه ارزیابی بیان ژن از تکنیک Real time PCR و دستگاه شرکت آپلاید بایوسیستم (Applied Biosystem) کشور آمریکا استفاده شد. سایبرگرین مسترمیکس (SYBR green master mix) استفاده شده در این مرحله متعلق به شرکت تاکارا ژاپن با کت نامبر 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 شد. در هر دور (Run) ۴۰ سیکلی یک نمونه به عنوان کنترل منفی برای تعیین آلودگی مسترمیکس که طبق دستورالعمل شرکت آپلاید بایوسیستم نباید سیکل آستانه (cycle threshold; CT) آن کم‌تر از ۳۵ باشد، در نظر گرفته شد. کنترل داخلی (GAPDH)، کنترل مثبت (گروه کنترل) و MEF2c

نیاز تکرار می‌شد. بعد از انتقال اطلاعات به نرم افزار اکسل Excel نسخه ۲۰۱۰ طبق فرمول  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  میزان بیان ژن MEF2c محاسبه شد [۲۴]. مشخصات پرایمرها در جدول ۱ مشخص شده است.

همزمان در یک Run به صورت دوتایی (Duplicate) ارزیابی شدند. بعد از به دست آوردن CT دوتایی برای هر نمونه میانگین آن‌ها محاسبه شد. لازم به ذکر است در برخی موارد نیاز بود تست مجدداً تکرار شود که در صورت

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش

اندازه محصول	NCBI توالی رفرنس	توالی ۵-۳	اسم ژن
74	NM_017008.4	AACCCATCACCATCTTCCAG CACGACATACTCAGCACCAG	GAPDH F R
84	XM_017591165.1	CCATTGGACTCACCAGACCT ATGTTGCCCATCCTTCAGAG	MEF2c F R

تجربی و گروه کنترل تفاوت وجود دارد اما این تفاوت معنی‌دار نبود ( $p=0/056$ ). مقادیر آزمون  $t$  (۶/۳۳) نشان داد میزان بیان ژن MEF2c در عضله بازکننده بلند انگشتان پس از ۱۴ هفته فعالیت استقامتی نسبت به گروه کنترل افزایش یافت که این افزایش با  $p=0/001$  معنی‌دار بود به این معنی که میزان بیان ژن MEF2c در گروه تجربی  $2/8$  برابر افزایش داشت (نمودار ۱). هم‌چنین مقادیر آزمون  $t$  (۳/۰۵۸) نشان داد که بیان ژن MEF2c در عضله نعلی گروه تجربی پس از ۱۴ هفته فعالیت استقامتی ۲ برابر افزایش یافت که این افزایش در مقایسه با گروه کنترل با  $p=0/022$  معنی‌دار بود (نمودار ۲).

داده‌های به دست آمده از دستگاه Real time PCR که به صورت CT بودند. با استفاده از نرم افزار اکسل Excel نسخه ۲۰۱۰ به  $\Delta\Delta Ct$  تبدیل شدند و سپس با استفاده از فرمول  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  اعداد نهایی به دست آمد. با انتقال این اعداد به نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ ابتدا نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون Shapiro-Wilks ارزیابی شد و مشخص شد که داده‌ها دارای توزیع طبیعی هستند ( $p>0/05$ ) سپس برای تعیین اختلاف میانگین گروه تجربی از گروه کنترل از آزمون  $t$  مستقل استفاده شد، از نظر آماری مقدار  $p<0/05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد.

## نتایج

با توجه به نتایج جدول ۲، در پایان مطالعه مشخص شد که بین وزن موش‌های صحرایی گروه

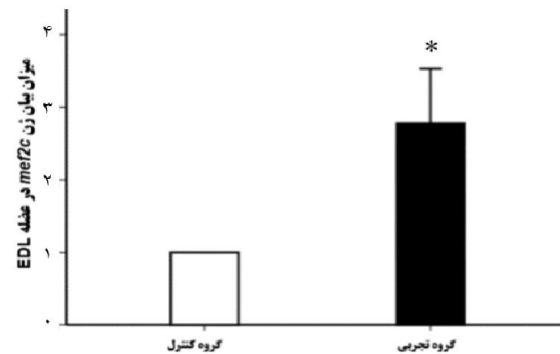
جدول ۲- میانگین وزن موش‌های صحرایی در ابتدا و انتهای دوره‌ی تمرینی این پژوهش ( $n=14$ )

مقدار p	گروه تجربی (تعداد=۷)	گروه کنترل (تعداد=۷)	وزن (گرم) موش‌های صحرایی قبل از آغاز دوره تمرینی
۰/۴۱۲	$220/9 \pm 4/94$	$221/4 \pm 8/06$	وزن (گرم) پایانی موش‌های صحرایی قبل از تشریح
۰/۰۵۶	$331/2 \pm 30$	$361/2 \pm 15/56$	مقدار p
	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	

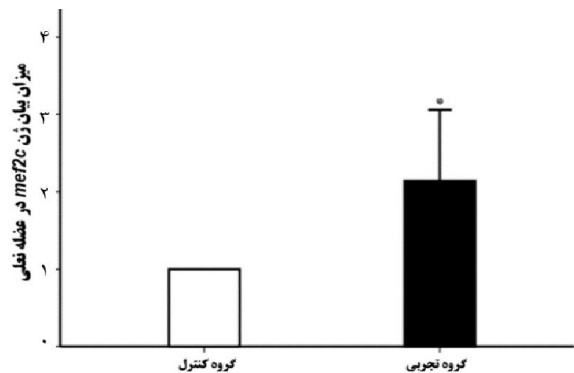
نتایج آزمون  $t$  زوجی جهت تعیین تفاوت وزن موش‌های صحرایی گروه‌ها (کنترل و تجربی) قبل ( $p=0/412$ ) و بعد از دوره تمرینی ( $p=0/056$ ) و  $t$  مستقل برای تعیین اختلاف وزن گروه کنترل ( $p=0/001$ ) و گروه تجربی ( $p=0/001$ ) در ابتدا و انتهای دوره تمرینی پژوهش حاضر

نتایج برخی پژوهش‌ها که تأثیر فعالیت‌بدنی بر بیان ژن MEF2c عضلات اسکلتی را بررسی کرده است، نشان داد که میزان بیان این ژن در پی فعالیت بدنی افزایش می‌یابد [۲۵] که با نتایج این پژوهش هم‌خوانی دارد. در پژوهشی مشخص شد میزان بیان این ژن در عضله پهن جانبی (زنان و مردان) بعد از یک جلسه فعالیت استقامتی (۶۰ درصد  $V_{O_2}^{peak}$ ) افزایش یافت [۲۶]. در حقیقت فاکتور رونویسی MEF2c ادغام‌کننده چندین مسیر سیگنالینگ مهم عضلات اسکلتی است که توسط کلسیم بیان ژن را تنظیم می‌کنند. انقباض عضلات از طریق مسیرهایی (که لزوماً شامل پروتئین فسفاتاز کالسی‌نورین هستند) فعالیت رونویسی MEF2c را افزایش می‌دهد [۱۶]. در موش‌ها دیده شده است که فاکتور MEF2c با فعال‌سازی ژن‌های درگیر در تمایز عضله، موجب توسعه عضلات اسکلتی می‌شود [۲۷] و فعال‌سازی مسیرهای کالسی‌نورین و MEF2c موجب بهبود بیان ژن‌های ویژه عضله مانند میوگلوبین، زنجیره سنگین میوزین و تروپونین ۱ نوع کند می‌شود [۲۸، ۵]. کالسی‌نورین و MEF2c در مکانیزم سازگاری شرکت می‌کنند که کسب خصوصیات انقباضی و متابولیکی ویژه توسط تارچه‌ها، تابعی از الگوی انقباض القاء‌شده به وسیله فعالیت‌بدنی است.

با توجه به عملکرد فاکتور رونویسی MEF2c که در بالا شرح داده شد (القاءکننده پروتئین‌های درگیر در فعالیت‌های استقامتی، تارهای کند انقباض) و نتایج پژوهش حاضر که نشان داد فعالیت استقامتی بلندمدت موجب افزایش بیان این ژن در تارهای کند و تند انقباض می‌شود، به نظر می‌رسد که عضلات اسکلتی کند و تند انقباض با افزایش تارهای کند انقباض و همچنین سایر پروتئین‌های درگیر در فعالیت استقامتی، زمینه را برای افزایش مقاومت در مقابل خستگی فراهم می‌آورند که در حقیقت یکی از سازگاری‌هایی است که در اثر فعالیت استقامتی رخ می‌-



نمودار ۱- تأثیر یک دوره فعالیت استقامتی بر بیان ژن MEF2c عضله بازکننده بلند انگشتان موش‌های صحرایی نر در گروه کنترل و تجربی (n=۱۴)  
نتایج آزمون t مستقل، \* نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های تجربی و کنترل (p=۰/۰۰۱)



نمودار ۲- تأثیر یک دوره فعالیت استقامتی بر بیان ژن MEF2c عضله نعلی موش‌های صحرایی نر در گروه کنترل و تجربی (n=۱۴)  
نتایج آزمون t مستقل، \* نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه کنترل و تجربی (p=۰/۰۲۲)

## بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که بیان ژن MEF2c در عضله بازکننده بلند انگشتان و نعلی پس از ۱۴ هفته فعالیت استقامتی نسبت به گروه کنترل افزایش می‌یابد. تعداد پژوهش‌ها در مورد این فاکتور با رویکرد فعالیت‌بدنی به خصوص فعالیت‌های استقامتی بلندمدت بسیار کم است، اما به طور کلی مشخص شده است که سرکوب بیان این ژن در عضله نعلی موجب افزایش بیان تارهای تند انقباض و کاهش معنی‌دار تارهای کند انقباض در این عضله می‌شود [۲].

گیری پروتئین این ژن و تأثیرات نهایی این فاکتور رونویسی نسبت داد، به منظور نتیجه‌گیری بهتر در مورد تأثیر فعالیت استقامتی بر بیان این فاکتور رونویسی، پیشنهاد می‌شود که در پژوهشی مشابه علاوه بر اندازه‌گیری بیان ژن، میزان پروتئین MEF2c نیز اندازه‌گیری شود.

### نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که فعالیت استقامتی بلندمدت موجب افزایش بیان ژن MEF2c در عضلات اسکلتی تند و کند انقباض می‌شود که تغییر در بیان این ژن احتمالاً زمینه را برای کسب خصوصیات استقامتی بیش‌تر عضلات اسکلتی (تند و کند انقباض) فراهم می‌کند و احتمالاً از این طریق میزان مقاومت آن‌ها را در برابر خستگی فراهم می‌آورد، هرچند پژوهش‌های بیش‌تری برای تأیید این موضوع است.

### تشکر و قدردانی

به این وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه لرستان به دلیل تأمین بخشی از منابع مالی این پژوهش تشکر می‌شود.

دهد. همچنین با توجه به تأثیر فاکتور رونویسی MEF2c بر تغییر نوع تارهای عضله به سمت تارهای کند انقباض به نظر می‌رسد، برای ایجاد پاسخی مناسب و سازگاری در عضلات اسکلتی و هماهنگ شدن با نوع محرک (نوع فعالیت بدنی) بیان این ژن در عضله نعلی و بازکننده بلند انگشتان افزایش می‌یابد. Anderson و همکاران نشان دادند که سرکوب بیان ژن MEF2c موجب کاهش بیان تارهای کند انقباض در عضله اسکلتی نعلی می‌شود [۲]. اما مکانیزمی که ممکن است موجب افزایش بیان این ژن در عضلات اسکلتی شود احتمالاً به این صورت است که فعالیت استقامتی چالش‌های متابولیکی شدیدی را در عضله ایجاد می‌کند و موجب فعال‌سازی مسیر پروتئین کیناز فعال شده به وسیله آدنوزین منو فسفات (AMP-activated protein kinase; AMPK) [۲۹] و همچنین افزایش جریان کلسیم درون سلولی می‌شوند که در پایین دست این مسیرها موجب افزایش بیان ژن MEF2c می‌شود و از این طریق میزان بیان این ژن افزایش می‌یابد [۵].

از محدودیت‌های این تحقیق می‌توان به عدم اندازه‌گیری میزان پروتئین فاکتور رونویسی اشاره کرد، بنابراین نمی‌توان یافته‌ها موجود را به شکل-

## References

- [1] Fathi M. The Effect of Endurance Activity on Pgc-1 Alpha Gene Expression in Soleus and Extensor Digitorum Longus Muscles of Adult Male Wistar Rats. *ZUMS Journal* 2016; 24(106): 51-62. [Farsi]
- [2] Anderson CM, Hu J, Barnes RM, Heidt AB, Cornelissen I, Black BL. Myocyte enhancer factor 2C function in skeletal muscle is required for normal growth and glucose metabolism in mice. *Skelet Muscle* 2015; 5(1): 1-7.

- [3] Potthoff 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.
- [4] Black BL, Olson EN. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998; 14(1): 167-96.
- [5] Friday BB, Mitchell PO, Kegley KM, Pavlath GK. Calcineurin initiates skeletal muscle differentiation by activating MEF2 and MyoD. *Differentiation* 2003; 71(3): 217-27.
- [6] Jama A, Huang D, Alshudukhi AA, Chrast R, Ren H. Lipin1 is required for skeletal muscle development by regulating MEF2c and MyoD expression. *J Physiol* 2019; 597(3): 889-901.
- [7] Chen X, Gao B, Ponnusamy M, Lin Z, Liu J. MEF2 signaling and human diseases. *Oncotarget* 2017; 8(67): 112152-65.
- [8] Vissing K, McGee SL, Roepstorff C, Schjerling P, Hargreaves M, Kiens B. Effect of sex differences on human MEF2 regulation during endurance exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 294(2): 408-15.
- [9] McGee SL, Sparling D, Olson AL, Hargreaves M. Exercise increases MEF2- and GEF DNA-binding activity in human skeletal muscle. *FASEB J* 2006; 20(2): 348-9.
- [10] Coffey VG, Zhong Z, Shield A, Canny BJ, Chibalin AV, Zierath JR, et al. Early signaling responses to divergent exercise stimuli in skeletal muscle from well-trained humans. *FASEB J* 2006; 20(1): 190-2.
- [11] Dimitrov VG, Arabadzhiev TI, Dimitrova NA, Dimitrov GV. Eccentric Contraction-Induced Muscle Fibre Adaptation. *Bio Automation* 2009; 13(4): 119-26.
- [12] Bassel-Duby R, Olson EN. Signaling Pathways in Skeletal Muscle Remodeling. *Annu Rev Biochem* 2006; 75(1): 19-37.
- [13] McGee SL, Sparling D, Olson AL, Hargreaves M. Exercise increases MEF2- and GEF DNA-binding activity in human skeletal muscle. *FASEB J* 2006; 20(2): 348-9.
- [14] Liu Y, Heinichen M, Wirth K, Schmidtbleicher D, Steinacker JM. Response of growth and myogenic factors in human skeletal muscle to strength training. *Br J Sports Med* 2007; 42(12): 989-93.
- [15] Raue U, Slivka D, Jemiolo B, Hollon C, Trappe S. Myogenic gene expression at rest and after a bout of resistance exercise in young (18-30 yr) and old (80-89 yr) women. *J Appl Physiol* 2006; 101(1): 53-9.
- [16] 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.

- [17] Kadi F. The effects of heavy resistance training and detraining on satellite cells in human skeletal muscles. *The J Physiol* 2004; 558(3): 1005-12.
- [18] Wu H, Naya FJ, McKinsey TA, Mercer B, Shelton JM, Chin ER, et al. MEF2 responds to multiple calcium-regulated signals in the control of skeletal muscle fiber type. *EMBO J* 2000; 19(9): 1963-73.
- [19] Adams GR, Hather BM, Baldwin KM, Dudley GA. Skeletal muscle myosin heavy chain composition and resistance training. *J Appl Physiol* 1993; 74(2): 911-5.
- [20] 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.
- [21] 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 J* 2010; 86(1-2): 39-44.
- [22] Wisloff U, Helgerud J, Kemi OJ, Ellingsen O. Intensity-controlled treadmill running in rats: VO<sub>2</sub>max and cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280(3): 1301-10.
- [23] 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.
- [24] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> Method. *Methods* 2001; 25(4): 402-8.
- [25] Hitomi Y, Kizaki T, Katsumura T, Mizuno M, Itoh CE, Esaki K, et al. Effect of moderate acute exercise on expression of mRNA involved in the calcineurin signaling pathway in human skeletal muscle. *IUBMB Life* 2003; 55(7): 409-13.
- [26] Vissing K, McGee SL, Roepstorff C, Schjerling P, Hargreaves M, Kiens B. Effect of sex differences on human MEF2 regulation during endurance exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 294(2): 408-15.
- [27] Subramanian SV, Nadal-Ginard B. Early expression of the different isoforms of the myocyte enhancer factor-2 (MEF2) protein in myogenic as well as non-myogenic cell lineages during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 1996; 57(1): 103-12.
- [28] Chin ER, Olson EN, Richardson JA, Yang Q, Humphries C, Shelton JM, et al. A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev* 1998; 12(16): 2499-509.
- [29] Atherton PJ, Babraj J, Smith K, Singh J, Rennie MJ, Wackerhage H. Selective activation of AMPK-PGC-1α or PKB-TSC2-mTOR signaling can explain specific adaptive responses to endurance or resistance training-like electrical muscle stimulation. *The FASEB Journal* 2005; 19(7): 786-8.

## The Effect of Intensive Endurance Activity on *Myocyte Enhancer Factor 2C* Gene Expression of Slow and Fast Twitch Muscles in Male Wistar Rats: An Experimental Study

R. Rezaei<sup>1</sup>, M. Fathi<sup>2</sup>

Received: 17/09/2018 Sent for Revision: 14/10/2018 Received Revised Manuscript: 12/03/2019 Accepted: 13/03/2019

**Background and Objectives:** Myocyte enhancer factor 2c activates the genes of the slow-twitch muscle, the muscle which plays role in endurance activity. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of a program of intensive endurance activity on MEF2c gene expression in fast and slow twitch skeletal muscles in wistar rats.

**Materials and Methods:** In this experimental study, 14 males wistar rats ( $231 \pm 24$  grams), after familiarization were randomly assigned into control (n=7) and experimental (n=7) groups. The experimental group performed an endurance activity program (30 m/min, 50 min, 6 sessions per week for 14 weeks) on motorized treadmill, and 48 hours after the end of the last session of endurance activity were anesthetized and sacrificed then the soleus (slow-twitch) and extensor digitorum longus (fast-twitch) muscles were removed. Real time PCR was used to determine expression levels of MEF2c gene and the data were analyzed by independent t-test.

**Results:** The MEF2c gene expression in fast-twitch muscle of the experimental group was significantly more compared to the control group ( $p=0.001$ ), and the expression of MEF2c gene in soleus muscle of the experimental group significantly increased after 14 weeks endurance activity compared to the control group ( $p=0.022$ ).

**Conclusion:** Intensive endurance activity increases MEF2c gene expression in slow and fast twitch skeletal muscle which this change in gene expression probably provides grounds to obtain endurance characteristics in slow and fast twitch skeletal muscles.

**Key word:** Endurance activity, MEF2c gene, Soleus muscle, Rat, Extensor digitorum longus muscle

**Funding:** This research was partially funded by Lorestan University.

**Conflict of interest:** None declared.

**Ethical approval:** The Ethics Committee of Lorestan University approved the study (13961021677).

**How to cite this article:** Rezaei R, Fathi M. The Effect of Intensive Endurance Activity on *Myocyte Enhancer Factor 2C* Gene Expression of Slow and Fast Twitch Muscles in Male Wistar Rats: An Experimental Study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2019; 18 (5): 417-26. [Farsi]

1- PhD Student of Exercise Physiology, Dept. of Physical Education & Sport Sciences, Faculty of Physical Education, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran ORCID: 0000-0003-0413-9803

2- Assistant Prof. of Exercise Physiology, Dept. of Physical Education & Sport Sciences, Faculty of Humanities, Lorestan University, Khorramabad, Iran, ORCID: 0000-0002-2113-365X  
(Corresponding Author) Tel: (066) 33120328, Fax: (066) 32721725, E-mail: fathi.m@lu.ac.ir