

بررسی الگوی بیان ژن *hdac4* پس از تمرین استقامتی در مدل حیوانی

محمد فتحی*

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

تاریخ پذیرش: ۹۵/۲/۱

تاریخ دریافت: ۹۴/۸/۲۹

چکیده:

زمینه و هدف: بیشتر تغییرات ایجاد شده در اثر فعالیت های بدنی طی روند اپی ژنتیک رخ می دهد که فاکتور رونویسی HDAC4 در این روند نقش محوری بازی می کند. بنابراین هدف این پژوهش بررسی اثر یک دوره فعالیت استقامتی بر بیان ژن *hdac4* در عضلات کند و تند انقباض بود.

روش بررسی: آزمودنی های این پژوهش تجربی ۱۴ سر موش صحرایی (24 ± 231 گرم) بودند که تحت شرایط استاندارد نگهداری شدند. بعد از آشنایی با پروتکل تمرینی به صورت تصادفی به دو گروه کنترل ($n=7$) و تجربی ($n=7$) تقسیم شدند. گروه تجربی یک برنامه (۳۰ متر در دقیقه، ۵۰ دقیقه در هر جلسه، ۶ جلسه در هفته به مدت ۱۴ هفته) استقامتی را روی تردمیل اجرا کرد و سپس ۴۸ ساعت پس از پایان آخرین جلسه تمرینی همراه با گروه کنترل بی هوش و تشریح شدند، سپس عضله نعلی و عضله EDL آن ها خارج و با استفاده از روش Real time-PCR میزان بیان ژن *hdac4* عضلات نعلی و EDL آن ها اندازه گیری شد. در پایان با استفاده از آزمون آماری *t* میانگین بیان ژن *hdac4* گروه تجربی و کنترل ارزیابی و مقایسه شد.

یافته ها: نتایج نشان داد، ۱۴ هفته فعالیت استقامتی موجب کاهش بیان ژن *hdac4* در عضله نعلی (کند انقباض) می شود به طوری که میزان بیان این ژن در عضله نعلی گروه تجربی به طور معنی داری ($P=0/0001$) کمتر از گروه کنترل بود. اما در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معنی داری ($P=0/76$) در بیان ژن *hdac4* در عضله EDL گروه تجربی مشاهده نشد.

نتیجه گیری: این تحقیق نشان داد که علیرغم یکسان بودن شدت و مدت فعالیت استقامتی، بیان ژن *hdac4* در عضلات تند و کند انقباض متفاوت بود. کاهش میزان بیان ژن *hdac4* در عضله نعلی احتمالاً نشان دهنده رفع فشارگی کروماتین باشد که آغازیست بر بیان ژن های درگیر در فعالیت استقامتی در عضله اسکلتی کند انقباض.

واژه های کلیدی: ژن *hdac4* تمرین استقامتی، عضله.

مقدمه:

فعالیت های بدنی بر بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی از جمله تغییر بیان ژن تأثیر می گذارد (۱-۳). مشخص شده که تأثیر آن بر بیان ژن از طریق فرآیندی به نام اپی ژنتیک (Epigenetic) صورت می گیرد که فاکتورهای Histone deacetylases - هیستون استیلازها- (HDACs) در این فرآیند نقش محوری دارند (۴، ۵). HDACs موجب فشرده شدن کروماتین می شوند و دسترسی فاکتورهای رونویسی به پروموتورها (توالی از DNA که به آن RNA پلیمراز

اتصال یافته و شروع رونویسی را هدایت می کند) توسط کروماتین تغییر شکل یافته محدود می شود و از این طریق بیان ژن سرکوب می شود (۶)، بنابراین فعال شدن رونویسی مستلزم تغییرات ساختار کروماتین در ناحیه رونویسی است (۷). فاکتور HDAC4 یکی از ایزوفرم های HDACs است که آن ها را تحت عنوان فاکتورهای رونویسی کلاس IIA می شناسند و عمدتاً در هسته و سیتوپلاسم قرار دارند (۸). HDAC4 رونویسی را از طریق دو تا دامین مستقل سرکوب می کند،

آیا فعالیت های استقامتی که موجب افزایش ظرفیت عضله اسکلتی می شود بر بیان ژن *hdac4* تأثیر می گذارد؟ با توجه به اطلاعات کمی که در مورد بیان این ژن در پی فعالیت استقامتی وجود دارد و همچنین تأثیر این ژن بر شکل گیری تارهای کند انقباض ضرورت دارد. برای پاسخ به این سوال، پژوهشی دقیق و کنترل شده صورت گیرد، بنابراین هدف این پژوهش بررسی تأثیر یک دوره فعالیت استقامتی بر بیان ژن *hdac4* است.

روش بررسی:

پژوهش حاضر اثر ۱۴ هفته فعالیت استقامتی بر بیان ژن *hdac4* عضلات نعلی و (*Extensor Digitorum Longus= EDL*) به ترتیب به عنوان عضلات کند و تند انقباض را به روش تجربی ارزیابی کرد. برای این منظور ۲۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با ۵ هفته سن (113 ± 20 گرم) از انستیتو پاستور تهیه شد. شرایط مناسب آزمایشگاهی (دسترسی آزاد به آب و غذا مخصوص، چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت، میانگین دما 22 ± 3 درجه سانتی گراد) به صورت یکسان در آزمایشگاه حیوانات تا رسیدن به سن بلوغ (۸ هفته) برای همه آن ها فراهم شد. در این مدت آن ها در ۴ قفس یکسان نگهداری شدند. در پایان این مرحله، میانگین و انحراف استاندارد وزن آن ها به 231 ± 24 گرم رسید. سپس دوره آشناسازی با فعالیت استقامتی (دویدن روی تردمیل با سرعت ۹ متر در دقیقه، به مدت ۵ دقیقه و ۴ روز در هفته) آغاز شد که این دوره ۱۰ روز (۵ جلسه) به طول انجامید. در پایان جلسات آشناسازی به صورت تصادفی به ۲ گروه (۱۰ سر به عنوان گروه کنترل و ۱۰ سر دیگر به عنوان گروه تمرینی) تقسیم شدند، ۳ سر از رت ها نتوانستند پروتکل را به پایان برسانند. از آنجایی که در روش *Real time quantitative* باید تعداد گروه شاهد و تجربی مساوی باشند، با حذف ۳ سر از گروه کنترل

نخست دومی که از ۲۰۸ اسید آمینه تشکیل شده و در پایانه N قرار دارد و دوم دومی که در قسمت داستیلاز قرار دارد. همچنین HDAC4 از طریق ناحیه ای کوچکی در پایانه N خود با ایزوفرم C فاکتور Myocyte Enhancer Factor 2C یا افزایش دهنده میوسیت (MEF2C) در تعامل است که موجب سرکوب آن می شود (۱۰،۹). مشخص شده که HDAC4 درون سلولی به وسیله فسفوریلاسیون های پی در پی تنظیم می شود (۱۱). HDAC4 در میوزنیک عضلات نقشی حیاتی دارد و تنظیم نامناسب فعالیت آن با مرگ ناگهانی همراه است (۷).

افزایش بیان HDAC کلاس II باعث می شود که شکل گیری تارهای کند انقباض سرکوب شود (۱۲)، بنابراین HDACs کلاس II شکل گیری تارهای کند انقباض و اکسیداتیو را سرکوب می کند که این سرکوب از طریق مهار فعالیت MEF2 (القاء کننده تارهای کند انقباض) صورت می گیرد، زیرا دیده شده که بیان شکل فعال MEF2 در عضلات اسکلتی موش های ترانس ژنیک (*Transgene*)، موجب شکل گیری تارهای کند انقباض و افزایش استقامت آن ها می شود و موش ها را قادر می سازد که تقریباً دو برابر بیشتر از هم تایان عادی خود بدون (۱۳). برخلاف عضلات تند انقباض مانند پهن جانی، HDAC4 نمی تواند در عضله نعلی (عضله کند) تجمع یابد و سرکوب انتخابی HDAC کلاس II در عضلات اسکلتی موجب افزایش فعالیت MEF2c و در نتیجه بهبود اجرای بدنی می شود که نتیجه این فرآیند مقاومت در برابر خستگی است (۱۲). با توجه به تأثیر فعالیت استقامتی بر افزایش ظرفیت هوازی عضلات اسکلتی و نقش HDAC4 در مهار MEF2c انتظار می رود که میزان بیان ژن *hdac4* در پاسخ به فعالیت استقامتی کاهش یابد که با رفع فشردگی کروماتین شرایط برای بیان ژن های درگیر در فعالیت استقامتی مانند MEF2 مساعد شود، حال پرسشی که مطرح است این است،

کلی ۶۰ دقیقه بود. شدت تمرین با سرعت ۲۰ متر در دقیقه شروع شد. سپس هر هفته ۲ متر بر دقیقه به سرعت اضافه شد، به طوری که در پایان هفته ششم سرعت به ۳۰ متر در دقیقه رسید. در نهایت در طی 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 دویدن (شامل ۵ دقیقه گرم کردن با سرعت ۱۲ متر در دقیقه، با شیب ۵ درجه به عنوان سرعت ۳۰ متر در دقیقه، با شیب ۵ درجه به عنوان بخش اصلی برنامه و در نهایت ۵ دقیقه دویدن با سرعت ۹ متر در دقیقه به عنوان بخش سرد کردن)] تا پایان هفته چهاردهم حفظ شد. بخش اصلی این برنامه با حدود ۷۰٪ VO2max (حداکثر اکسیژن مصرفی طی یک فعالیت ورزشی) موش ها اجرا شد (۱۷،۱۶). این برنامه بین ساعات ۵ تا ۷ بعد از ظهر هر روز اعمال می شد (جدول شماره ۱).

(به طور تصادفی) تعداد نهایی به ۱۴ سر (۷ سر شاهد و ۷ سر تجربی) کاهش یافت. با استفاده از منابع معتبر قبلی یک برنامه تمرین استقامتی طراحی شد (۱۴، ۱۵). برنامه تمرینی (۱۴ هفته، هفته ای ۶ روز) گروه تجربی عبارت بود از دویدن روی تردمیل که سرعت و شیب و زمان آن قابل برنامه ریزی بود و در انتهای آن 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 می شد. در جلسه اول، بخش اصلی برنامه ۱۲ دقیقه بود. به طور هفتگی مدت زمان بخش اصلی برنامه افزایش یافت؛ (در هفته ۱-۳ هر روز ۲ دقیقه به مدت زمان اجرای بخش اصلی برنامه اضافه می شد) به طوری که در پایان روز ۲۳ مدت بخش اصلی برنامه به ۵۰ دقیقه رسید که با احتساب ۵ دقیقه گرم کردن و ۵ دقیقه سرد کردن، مدت زمان

جدول شماره ۱: برنامه فعالیت استقامتی

شاخص	بخش گرم کردن	بدنه اصلی تمرین	سرد کردن	چگونگی تغییرات شاخص ها طی ۱۴ هفته فعالیت استقامتی
زمان	۵ دقیقه	۵۰ دقیقه	۵ دقیقه	از ۱۲ دقیقه طی ۲۳ روز به ۵۰ دقیقه رسید
سرعت	۱۲ متر در دقیقه	۳۰ متر در دقیقه	۹ متر در دقیقه	از ۲۰ متر در دقیقه طی ۵ هفته به ۳۰ متر در دقیقه رسید
شیب	صفر	۵ درجه	صفر	به تدریج ۵ درجه شیب از هفته هفتم تا دهم اضافه شد

در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. با استفاده از هاون و نیتروژن مایع بافت ها هموزن و در میکروتیوب هایی با حجم ۱/۵ میلی لیتر با برچسب مناسب نگهداری شدند. برای استخراج RNA از بافت های هموزن شده، به ۱۰۰ میلی گرم از هر بافت داخل میکروتیوب، ۱ میلی لیتر تریزول (Invitrogen) اضافه شد و پس از مخلوط کردن کامل (پیپتاژ کردن) به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری (انکوبه) شد، سپس ۰/۲ میلی لیتر به آن کلروفرم سرد اضافه و پس از پیپتاژ (۱۵ ثانیه) حدود ۲ تا ۳ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. در ادامه

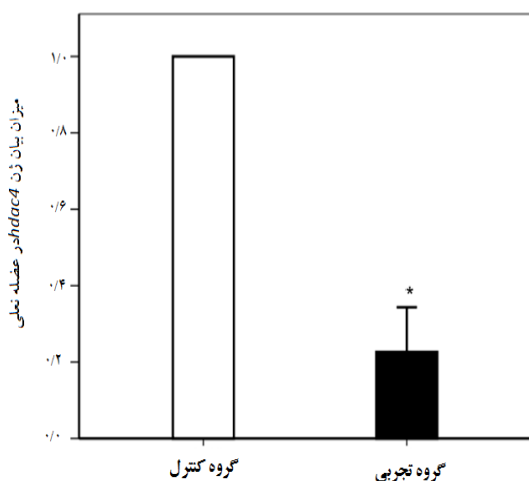
بعد از پایان برنامه استقامتی و ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی موش ها با ترکیبی از کتامین (۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) بیهوش شدند. بعد از بیهوشی کامل (به طوری که موش به تحریک اعمال شده پاسخ ندهد)، عضلات نعلی و بازکننده بلند انگشتان تحت شرایط استریل خارج شد. بافت های مورد نظر بلافاصله در میکروتیوب هایی با حجم ۱/۵ میلی لیتر با برچسب متناسب با بافت و موش جاسازی و وارد تانک نیتروژن شدند. بعد از اتمام تشریح و تا شروع هموزن بافت ها، همه آن ها

میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (شرکت eppendorff) شدند سپس مایع رویی به دقت برداشته شد و به یک میکروتیوب RNAase free انتقال داده شد (از این مرحله به بعد با سرسمپلر فیلتر دار کار شد) سپس ۰/۵ میلی‌لیتر ایزوپروپانول سرد اضافه شد و بعد از هم زدن ملایم در دمای ۲۰- باقی ماندند (overnight). روز بعد میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت 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) 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 با سرعت 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 میکرولیتر آب تزریقی به هر نمونه اضافه شد و چند بار به آرامی پیتاژ صورت گرفت. در پایان غلظت و نسبت جذبی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (شرکت eppendorff) ارزیابی شد که نسبت جذبی ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر برای تمام نمونه‌ها بین ۱/۶ تا ۱/۸ بود. تمام مراحل کار زیر هودی که از قبل آماده شده بود (استریل شده با الکل ۷۵٪ و نور UV) انجام می‌شد، برای رونویسی RNA به cDNA از کیت شرکت thermo scientific با Cat # K1621 استفاده شد. تمام مراحل مطابق دستورالعمل شرکت سازنده با استفاده از

میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (شرکت eppendorff) شدند سپس مایع رویی به دقت برداشته شد و به یک میکروتیوب RNAase free انتقال داده شد (از این مرحله به بعد با سرسمپلر فیلتر دار کار شد) سپس ۰/۵ میلی‌لیتر ایزوپروپانول سرد اضافه شد و بعد از هم زدن ملایم در دمای ۲۰- باقی ماندند (overnight). روز بعد میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت 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) 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 با سرعت 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 میکرولیتر آب تزریقی به هر نمونه اضافه شد و چند بار به آرامی پیتاژ صورت گرفت. در پایان غلظت و نسبت جذبی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (شرکت eppendorff) ارزیابی شد که نسبت جذبی ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر برای تمام نمونه‌ها بین ۱/۶ تا ۱/۸ بود. تمام مراحل کار زیر هودی که از قبل آماده شده بود (استریل شده با الکل ۷۵٪ و نور UV) انجام می‌شد، برای رونویسی RNA به cDNA از کیت شرکت thermo scientific با Cat # K1621 استفاده شد. تمام مراحل مطابق دستورالعمل شرکت سازنده با استفاده از

جدول شماره ۲: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش

نام ژن	Sequence 5-3	NCBI Reference Sequence	اندازه محصول
<i>gapdh</i>	F AACCCATCACCATCTTCCAG	NM_017008.4	۷۴
	R CACGACATACTCAGCACCAG		
<i>hdac4</i>	F AACCTAACCTGAAATTACGGTC	NM_053449.1	۱۳۷
	R ACATGCGGAGTCTGTAACATC		



نمودار شماره ۲: تأثیر یک دوره (۱۴ هفته) تمرین استقامتی بر بیان ژن *hdac4* عضله نعلی در گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل.
* معنی داری در سطح $P < 0.01$

بحث:

بر اساس نتایج پژوهش در اثر فعالیت‌های استقامتی بیان ژن *hdac4* در عضلات نعلی تغییر می‌کند و میزان بیان آن در عضله نعلی که عضله ای است کند انقباض شدیداً کاهش می‌یابد، اما در عضله EDL که عضله ای است تند انقباض تغییر معنی داری در بیان آن مشاهده نشد.

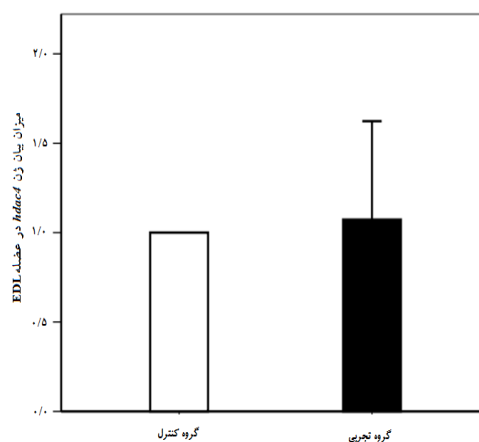
در توجیه یافته‌های این پژوهش ابتدا باید اشاره کرد که پژوهش‌ها نشان داده‌اند که هیستون‌داستیلازهای کلاس II (HDAC4، HDAC5، HDAC7، HDAC9) در عضلات اسکلتی به مقدار بالایی بیان می‌شوند (۲۳) و فعالیت آن‌ها به شدت توسط فسفوریلاسیون کنترل می‌شود که سیگنال‌های رسیده از پروتئین‌کیناز وابسته به کلسیم کالمودولین (CaMK) و AMPK موجب فسفوریلاسیون HDACs کلاس II و در نتیجه حرکت آن‌ها از هسته به سیتوپلاسم می‌شود (۲۴-۲۶). از این طریق زمینه برای بیان ژن‌ها پاسخگو به فعالیت‌های بدنی از جمله فعالیت استقامتی افزایش می‌یابد. پژوهش‌های

داده‌های به دست آمده از دستگاه Real Time PCR

که به صورت Cycle threshold (CT) (میانگین CT) برای هر نمونه بودند (۲۱-۱۹). با استفاده از نرم افزار Excel به $\Delta\Delta Ct$ تبدیل شدند و سپس با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ اعداد نهایی به دست آمد (۲۲). با انتقال این اعداد به نرم افزار SPSS، ابتدا نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون Shapiro-Wilks ارزیابی شد و مشخص شد که داده‌ها دارای توزیع طبیعی هستند. بعد از تعیین نرمال بودن، برای تعیین اختلاف میانگین‌ها از آزمون t تک نمونه‌ای استفاده شد.

یافته‌ها:

بیان ژن *hdac4* در عضله EDL به طور معنی داری پس از ۱۴ هفته فعالیت استقامتی تغییر معنی داری نداشت ($P < 0.076$) (نمودار شماره ۱).



نمودار شماره ۱: تأثیر یک دوره (۱۴ هفته) فعالیت استقامتی بر بیان ژن *hdac4* عضله EDL در گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل

اما در عضله نعلی پس از ۱۴ هفته فعالیت استقامتی بیان این ژن به طور معنی داری ($P < 0.0001$) نسبت به گروه کنترل تقریباً ۸۰٪ کاهش داشت و به کمتر از ۲۰٪ رسید (نمودار شماره ۲).

سواری با تقریباً ۷۵٪ VO2peak برای یک ساعت - عضله پهن جانبی) نشان دادند که به دنبال ۶۰ دقیقه دوچرخه سواری علیرغم عدم تغییر در میزان mRNA تام ایزوفرم های ۴،۵،۷ و ۹ فاکتور HDAC کلاس IIa درون عضله (پهن جانبی) با تمرین، میزان ایزوفرم های ۴ و ۵ هسته ای آن کاهش یافت (۳۳). لزوماً تغییر در بیان یک ژن منعکس کننده میزان پروتئین آن ژن نیست زیرا تعدیلات پس رونویسی تغییرات زیادی ایجاد می کنند. بنابراین افزایش یا کاهش یک ژن نمی تواند نشان دهنده تغییرات نهایی در میزان پروتئین نیز باشد. باید اشاره کرد که این پژوهش نتوانست میزان پروتئین این ژن را اندازه گیری کند؛ بنابراین پیشنهاد می شود که در مطالعات آتی تغییرات پس رونویسی این ژن بعد از فعالیتهای استقامتی در عضلات تند و کند انقباض بررسی گردد.

نتیجه گیری:

نتیجه این پژوهش نشان داد که علیرغم یکسان بودن شدت و مدت فعالیت استقامتی در عضلات تند و کند انقباض، بیان ژن *hdac4* در این عضلات متفاوت است، به نظر می رسد کاهش میزان بیان ژن *hdac4* در اثر فعالیت استقامتی در عضله نعلی زمینه را برای رفع فشردگی کروماتین و احتمالاً آغاز بیان ژن های درگیر در فعالیت استقامتی در عضله اسکلتی کند انقباض را فراهم کند، در صورتی این پدیده در عضله EDL رخ نمی دهد و احتمالاً روند بیان ژن در این عضله به گونه ای متفاوت از عضله کند انقباض رخ می دهد.

تشکر و قدردانی:

از معاونت پژوهشی دانشگاه لرستان جهت تأمین منابع مالی طرح پژوهشی به شماره .گ.ت/۹۰۰ در تاریخ ۱۳۹۳/۱۰/۲۰ در قالب گرنت سپاسگزاری می شود.

بسیار کمی بیان *hdac4* به فعالیت های استقامتی بلند مدت را بررسی کرده بودند، هر چند برخی پژوهش ها پاسخ این فاکتور به یک جلسه فعالیت مقاومتی در عضلات اسکلتی را بررسی کرده است، به عنوان مثال Drummond و همکاران نشان داد که میزان پروتئین HDAC4 در عضلات اسکلتی بر اثر یک جلسه فعالیت مقاومتی در مردان جوان و مسن به طور معنی داری کاهش می یابد (۲۷). چالش های متابولیکی در اثر فعالیت های استقامتی در عضله موجب فعال سازی مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با مسیرهای متابولیک می شود از جمله عناصر مهم پاسخ گو به این چالش ها، فاکتور AMP-activated protein kinase (AMPK) است (۲۸)، همچنین مشخص شده که فعالیت استقامتی موجب افزایش بیان فاکتور رونویسی AMPK می شود که بسیاری از فرآیندهای عضله مانند عملکرد میتوکندریایی را تنظیم می کند (۲۹، ۳۰)، از طرف دیگر در پایین دست AMPK ژن *hdac4* قرار دارد (۳۱). دلیل احتمال کاهش بیان این ژن در عضله نعلی ممکن است، ناشی از این واقعیت باشد که فعالیت استقامتی با ایجاد شرایط متابولیکی موجب افزایش فعالیت AMPK می شود (۳۲) (فاکتوری که در پاسخ به چالش های متابولیکی مانند افزایش AMP به ATP فعال می شود)، افزایش این فاکتور موجب کاهش بیان ژن *hdac4* می شود. در پایان دست فاکتور HDAC4 فاکتور رونویسی MEF2C قرار دارد که القا کننده پروتئین های درگیر در فعالیت های استقامتی است و کاهش بیان HDAC4 زمینه برای فعال شدن MEF2C فراهم می آورد (۱۲).

اما در توجیه عدم تغییر بیان ژن *hdac4* در عضله EDL در این پژوهش می توان گفت تعدیلات پس رونویسی و تغییر در بخش های زیرسلولی مانند سیتوپلاسم و هسته ممکن است نقش داشته باشند، زیرا McGee و همکاران در پژوهشی (دوچرخه

منابع:

1. Fathi M, Gharakanlou R, Rezaei R. The effect of endurance training on left ventricle serum response factor gene expression in Wistar male rats. *J Shahrekord Univ Med Sci.* 2015;17(1):78-86.
2. Fathi M, Gharakanlou R. The effect of endurance Activity on left ventricle *Hand2* gene expression in wistar male rat. *Sport physiol.* 2015;7(25): 57-68.
3. Fathi M, Rahmani Nia F, Moradpoorian MR, Asgari M, Rezaee R. The relationship between maximum aerobic power and coronary heart disease risk factors. *World J Sport Sci* 2009; 2(1): 101-6.
4. 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.
5. Liu Y, Randall WR, Schneider MF. Activity-dependent and- independent nuclear fluxes of HDAC4 mediated by different kinases in adult skeletal muscle. *J Cell Biol.* 2005; 168(6): 887-97.
6. Feng J, Fouse S, Fan G. Epigenetic regulation of neural gene expression and neuronal function. *Pediatr Res.* 2007; 61(5 Pt 2): 58R-63R.
7. 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.
8. Dressel U, Bailey PJ, Wang SC, Downes M, Evans RM, Muscat GE. A dynamic role for HDAC7 in MEF2-mediated muscle differentiation. *J Biol Chem.* 2001; 276(20): 17007-13.
9. 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.
10. 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.
11. Zhao X, Ito A, Kane CD, Liao TS, Bolger TA, Lemrow SM, et al. The modular nature of histone deacetylase HDAC4 confers phosphorylation-dependent intracellular trafficking. *J Biol Chem.* 2001; 276(37): 35042-8.
12. 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.
13. Potthoff MJ, Olson EN. MEF2: A central regulator of diverse developmental programs. *Development.* 2007; 134(23): 4131-40.
14. 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.
15. 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.
16. Wisloff U, Helgerud J, Kemi OJ, Ellingsen O. Intensity-controlled treadmill running in rats: VO (2 max) and cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 280(3): H1301-10.
17. 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.
18. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25(4): 402-8.
19. Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN, Jr. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics.* 2006; 7: 85.
20. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques.* 2005; 39(1): 75-85.
21. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008; 3(6): 1101-8.

22. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29(9): e45.
23. McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN. Control of muscle development by dueling HATs and HDACs. *Curr Opin Genet Dev.* 2001; 11(5): 497-504.
24. Saleem A, Safdar A. Exercise-induced histone acetylation - playing tag with the genome. *J Physiol.* 2010; 588(Pt 6): 905-6.
25. McKinsey TA, Zhang CL, Lu J, Olson EN. Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. *Nature.* 2000; 408(6808): 106-11.
26. McGee SL. Exercise and MEF2-HDAC interactions. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, Appl Physiol Nutr Metab.* 2007; 32(5): 852-6.
27. Drummond MJ, McCarthy JJ, Fry CS, Esser KA, Rasmussen BB. Aging differentially affects human skeletal muscle microRNA expression at rest and after an anabolic stimulus of resistance exercise and essential amino acids. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008; 295(6): 1333-40.
28. Hardie DG, Carling D. The AMP-activated protein kinase-fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem/FEBS.* 1997; 246(2): 259-73.
29. Atherton PJ, Babraj J, Smith K, Singh J, Rennie MJ, Wackerhage H. Selective activation of AMPK-PGC-1alpha or PKB-TSC2-mTOR signaling can explain specific adaptive responses to endurance or resistance training-like electrical muscle stimulation. *FASEB J.* 2005; 19(7): 786-8.
30. Zaha VG, Young LH. AMP-activated protein kinase regulation and biological actions in the heart. *Circ Res.* 2012; 111(6): 800-14.
31. Smith JA, Kohn TA, Chetty AK, Ojuka EO. CaMK activation during exercise is required for histone hyperacetylation and MEF2A binding at the MEF2 site on the *Glut4* gene. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008; 295(3): 698-704.
32. Kemp BE, Mitchelhill KI, Stapleton D, Michell BJ, Chen ZP, Witters LA. Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase. *Trends Biochem Sci.* 1999; 24(1): 22-5.
33. McGee SL, Fairlie E, Garnham AP, Hargreaves M. Exercise-induced histone modifications in human skeletal muscle. *J Physiol.* 2009; 587(Pt 24): 5951-8.

The study of *hdac4* gene expression pattern after endurance exercises in animal model

Fathi M*

Physical Education Dept., Lorestan University, Khorramabad, I.R. Iran.

Received: 20/Nov/2015 Accepted: 20/Apr/2016

Background and aims: The most of endurance activity induced changes occur by epigenetic processes which Histone deacetylase 4 transcription factor plays a central role in that. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of endurance activity on slow and fast twitch muscles *hdac4* gene expression.

Methods: The subjects of this experimental study were 14 rats (231±24 gr) that housed under standard conditions. After familiarization with training protocol, there were randomly assigned into control (n=7) and experimental (n=7) groups. The experimental group performed an endurance program (30 m/min, 50 min, 6 session per week for 14-weeks) on motorized treadmill, and then 48 hours after the end of the last session of training with control group were anesthetized and sacrificed. Then, the EDL and soleus muscles were removed. Real time RT-PCR method was used to determine of expression levels of *hdac4* gene in EDL and soleus muscles. Finally, t-test was used to compare and evaluate the means of *hdac4* gene expression in control and experimental groups.

Results: The results showed 14 weeks endurance activity decrease *hdac4* gene expression in soleus muscle, so that the rate of expression of this gene in soleus muscle of experimental group was significantly (P=0.0001) less compared to control group, but in EDL muscle in compared with control group there was not seen a significant difference (P=0.76) in *hdac4* gene expression in experimental group.

Conclusion: The result of this study showed that despite the equal intensity and duration of endurance training, the *hdac4* gene expression of fast and slow twitch muscles was different. Decreasing in the rate of *hdac4* gene expression in soleus muscle is probably the sign of uncondensed chromatin, which is the begin of genes expression that involves in the endurance activity in slow twitch skeletal muscle.

Keywords: *hdac4* gene, Endurance exercise, Muscle.

Cite this article as: Fathi M. The study of *hdac4* gene expression pattern after endurance exercises in animal model. J Shahrekord Univ Med Sci. 2017; 18(6): 26-34.

***Corresponding author:**

Physical education Dept., Lorestan University, Khorramabad, I.R. Iran. Tel: 00989163972041,
E-mail: fathi.m@lu.ac.ir