

تأثیر فعالیت استقامتی بر بیان ژن *sox6* بطن چپ رت‌های نر نژاد ویستار

محمد فتحی^{۱*}، سعید آبرون^۲

خلاصه

مقدمه: بیان ژن عضله میوکارڈ تحت تأثیر فعالیت استقامتی قرار دارد و از طرف دیگر، فاکتور رونویسی *sox6* بر شکل‌گیری آن تأثیرگذار است. بنابراین، هدف از انجام این پژوهش، بررسی تأثیر ۱۴ هفته فعالیت استقامتی بر بیان ژن *sox6* بطن چپ رت‌های نر نژاد ویستار بود.

روش: در مطالعه حاضر، ۱۴ سر موش صحرایی تحت شرایط کنترل شده نگهداری و بعد از آشناسازی با برنامه تمرینی، به صورت تصادفی به دو گروه شاهد و مورد تقسیم شدند. گروه مورد یک برنامه ۱۴ هفته‌ای (۶ روز در هفته، هر روز یک ساعت با سرعت ۳۰ متر در دقیقه) استقامتی را روی نوار گردان اجرا کردند و ۴۸ ساعت پس از پایان آخرین جلسه تمرینی، بیهوش و تشریح شدند. بطن چپ آن‌ها خارج و میزان بیان ژن *sox6* قلب آن‌ها با استفاده از روش Real time PCR (Real time polymerase chain reaction) اندازه‌گیری گردید. در پایان، داده‌های به دست آمده با استفاده از آزمون t مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نسبت وزن بطن چپ (Left ventricular weight یا LVW) به سطح رویه بدن (Body surface area یا BSA) در گروه مورد ($0/168 \pm 0/008$ گرم بر مترمربع) در مقایسه با گروه شاهد ($0/153 \pm 0/006$ گرم بر مترمربع) بیشتر و معنی‌دار بود ($P = 0/010$). نسبت وزن قلب (Heart weight یا HW) به سطح رویه بدن گروه مورد ($0/270 \pm 0/014$ گرم بر مترمربع) در مقایسه با گروه شاهد ($0/240 \pm 0/019$ گرم بر مترمربع) افزایش نشان داد و بین دو گروه رابطه معنی‌داری مشاهده شد ($P = 0/002$). میانگین بیان ژن *sox6* بطن چپ گروه مورد نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری بیشتر بود ($P = 0/001$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد فعالیت استقامتی با افزایش بیان ژن *sox6* موجب بهبود شاخص‌های عملکردی قلب (نسبت وزن بطن چپ و وزن قلب به سطح رویه بدن) به خصوص بطن چپ می‌شود. واژه‌های کلیدی: فاکتور رونویسی *sox6*، فعالیت بدنی، بطن چپ

۱- استادیار گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران ۲- دانشیار، گروه هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

* نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک: fathi.m@lu.ac.ir

پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۳/۲۷

دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۴/۲/۵

دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۱/۱۵

مقدمه

تمرین جسمانی باعث تغییراتی در ساختار و عملکرد انواع بافت‌های مختلف بدن از جمله قلب می‌شود (۴-۱)؛ در حالی که فعالیت مقاومتی منجر به افزایش ضخامت دیواره‌های قلب می‌گردد و فعالیت استقامتی حجم‌های داخلی و همچنین، دیواره‌های آن را افزایش می‌دهد (۵). هرچند افزایش دیواره‌ها در فعالیت استقامتی به اندازه‌ای نیست که در فعالیت مقاومتی رخ می‌دهد (۶، ۷). همچنین، مشخص شده است که بین هایپرتروفی فیزیولوژیک (ناشی از فعالیت‌های ورزشی) با نوع پاتولوژیک آن تفاوت وجود دارد (۸). هایپرتروفی پاتولوژیک قلب موجب کاهش کارایی آن می‌شود (۹)، اما نوع فیزیولوژیک، کارایی آن را بهبود می‌دهد (۱۰).

زنجیره سنگین میوزین (Myosin heavy chain یا MHC)، نوعی حرکت مولکولی را برای انقباض عضله ایجاد می‌کند. در عضله قلب دو ایزوفرم بیان می‌شود که آن‌ها را MHC آلفا (با فعالیت ATPase بالا) و MHC بتا (با فعالیت ATPase پایین) می‌نامند. بنابراین، سرعت انقباض در آن‌ها متفاوت است. این دو ایزوفرم به وسیله دو ژن مجزا که در مجاورت هم و روی یک کروموزوم قرار دارند، کد می‌شوند. ژنی‌هایی که نوع ایزوفرم آلفا و بتا را کد می‌کنند، به ترتیب myh6 و myh7 نام دارند (۱۱). یکی از ژن‌هایی که بر بافت عضله و ایزوفرم‌های آن تأثیر می‌گذارد، ژن *sox6* (Sry type high mobility group box) می‌باشد و تحقیقات نشان داده‌اند که حذف آن، موجب تأخیر در رشد و مرگ (دو هفته بعد از تولد) موش‌هایی می‌شود که شکل عضلات در آن‌ها غیر طبیعی گزارش شده و کاردیومیوپاتی نیز در آن‌ها گسترش یافته است (۱۲)؛ ضمن این که، *sox6* در رشد، تعادل و تمایز دقیق بیان ایزوفرم‌های عضله درگیر

است (۱۳) و رونویسی بیان MHC نوع بتا و در نتیجه ایزوفرمی را که سرعت انقباض پایین‌تری دارد، سرکوب می‌کند (۱۴). کانال‌های کلسیمی نوع L که برای انقباض قلب ضروری هستند، به وسیله این ژن بیان می‌شوند (۱۵). با توجه به تأثیر فعالیت‌های استقامتی بر عضله میوکارد و مشارکت ژن *sox6* در شکل‌گیری این عضله، هدف از انجام تحقیق حاضر، بررسی تأثیر ۱۴ هفته فعالیت استقامتی بر بیان ژن *sox6* بطن چپ رت‌های نر نژاد ویستار بود.

روش بررسی

مجوز این پژوهش توسط کمیته اخلاق دفتر حمایت از طرح‌های پژوهشی دفتر ریاست جمهوری به شماره ۹۰۰۷۰۱۴ صادر شد. پژوهش به صورت تجربی، اثر ۱۴ هفته فعالیت استقامتی بر بیان ژن *sox6* عضله قلب را در قالب طرح‌های دو گروهی پس‌آزمون ارزیابی کرد. بدین منظور ۲۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با سن ۵ هفته و وزن 20 ± 113 گرم از انستیتو پاستور تهیه شد. برای همه موش‌ها شرایط مناسب آزمایشگاهی (دسترسی آزاد به آب و غذا مخصوص موش صحرایی، چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته و میانگین دمای 3 ± 22 درجه سانتی‌گراد) به صورت یکسان در آزمایشگاه حیوانات تا رسیدن به سن بلوغ فراهم گردید. آن‌ها در این مدت در ۴ قفس یکسان نگهداری شدند. در پایان این مرحله، میانگین وزن آن‌ها 24 ± 231 گرم بود. سپس یک دوره آشناسازی (۱۰ روزه، ۵ جلسه) با تمرینات استقامتی (دویدن روی نوار گردان) آغاز شد. در پایان جلسات آشناسازی، موش‌ها به صورت تصادفی به دو گروه (۱۰ سر به عنوان گروه شاهد و ۱۰ سر دیگر به عنوان گروه مورد) تقسیم‌بندی شدند. از گروه مورد، ۳ موش نتوانستند برنامه تمرینی را به پایان برسانند. از

سرعت ۳۰ متر در دقیقه و 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 ۱۴ حفظ شد. ابتدا و انتهای برنامه در پایان فاز تاریکی از سیکل روشنایی انجام گرفت.

در نهایت، ۴۸ ساعت پس از پایان آخرین جلسه تمرینی، موش‌ها با ترکیبی از کتامین (۸۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) بیهوش شدند. پس از بیهوشی کامل (به طوری که به تحریک اعمال شده پاسخ ندهند)، قلب آن‌ها تحت شرایط استریل خارج و بطن چپ آن‌ها توسط متخصص آناتومی جدا شد. بافت مورد نظر (بطن چپ) بلافاصله در میکروتیوب‌هایی با حجم ۱/۵ میلی لیتر با برچسب متناسب با بافت موش صحرایی و ساعت تشریح جاسازی و وارد تانک نیتروژن گردید. بعد از اتمام تشریح و تا شروع هموژن بافت‌ها، همه آن‌ها در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. با استفاده از هاون و نیتروژن مایع، بافت‌ها هموژن و در میکروتیوب‌هایی با حجم ۱/۵ میلی لیتر با برچسب مناسب نگهداری شدند.

پژوهش‌های متعددی برای ارزیابی میزان هایپرتروفی قلب، از ارزیابی نسبت وزن بطن چپ (Left ventricular weight یا LVW) به وزن کل قلب، وزن بدن (۱۸) و سطح رویه بدن (Body surface area یا BSA) استفاده کرده‌اند (۱۹). بنابراین، جهت تأیید میزان هایپرتروفی در پژوهش حاضر، از دو شاخص جهت نسبی کردن LVW (نرمالایز) استفاده شد. بدین منظور، وزن و طول بدن حیوان (از دهان تا ابتدای دم) در حالت بیهوشی برای محاسبه BSA اندازه گیری شد (۲۰). سپس، قلب حیوان خارج و بطن چپ نیز جدا شد که هر دوی آن‌ها (قلب و بطن) به طور

آن‌جایی که در روش Real time PCR (Real time polymerase chain reaction) (نسبی) باید تعداد گروه شاهد و مورد مساوی باشند، با حذف سه سر از گروه شاهد (به طور تصادفی)، تعداد نهایی آن‌ها به ۱۴ سر (۷ سر شاهد و ۷ سر مورد) کاهش یافت.

برنامه تمرینی

با استفاده از منابع پیشین (۱۶، ۱۷)، یک برنامه تمرینی استقامتی که منجر به هایپرتروفی قلب و بطن چپ ناشی از تمرینات شود، طراحی گردید. برنامه تمرینی ۱۴ هفته‌ای (هفته‌ای ۶ روز) گروه مورد با دویدن روی نوار گردان که سرعت و شیب و زمان آن قابل برنامه‌ریزی بود و در انتهای آن یک شوکر برای جلوگیری از توقف تعبیه شده بود، شروع گردید. هر جلسه با یک بخش ۵ دقیقه‌ای با سرعت ۱۲ متر در دقیقه برای گرم کردن ادامه یافت. در جلسه اول، بخش اصلی برنامه تمرینی ۱۲ دقیقه در نظر گرفته شد و مدت زمان بخش اصلی برنامه تمرینی به طور هفتگی افزایش یافت. بدین صورت که در هفته ۳-۱، هر روز ۲ دقیقه به مدت زمان اجرای بخش اصلی برنامه اضافه شد و در پایان روز ۲۳، مدت بخش اصلی برنامه تمرینی به ۵۰ دقیقه رسید که با احتساب ۵ دقیقه گرم کردن و ۵ دقیقه سرد کردن، مدت زمان کلی ۶۰ دقیقه بود. شدت تمرین با سرعت ۲۰ متر در دقیقه شروع شد. سپس، هر هفته ۲ متر بر دقیقه به سرعت اضافه گردید؛ به طوری که در پایان هفته ششم، سرعت به ۳۰ متر در دقیقه رسید. در نهایت، طی هفته‌های ۱۰-۷، به تدریج ۵ درجه شیب (ابتدای هر هفته حدود ۱/۲ درجه شیب) نیز اضافه گردید. این برنامه [۶۰ دقیقه دویدن (شامل ۵ دقیقه گرم کردن با سرعت ۱۲ متر در دقیقه، ۵۰ دقیقه دویدن با

سانتی گراد با سرعت ۷۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. در ادامه مایع رویی به دقت تخلیه گردید و ۱۰ دقیقه فرصت داده شد تا باقی مانده اتانول تبخیر و داخل میکروتیوب خشک شود. بعد از این مرحله، ۵۰ لاند آب تزریقی به هر نمونه اضافه گردید و چند بار به آرامی پیتاژ صورت گرفت.

در نهایت، غلظت و نسبت جذبی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (شرکت Eppendorf، آلمان) ارزیابی شد که نسبت جذبی ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر، برای تمام نمونه‌ها بین ۱/۶ تا ۱/۸ بود. غیر از مراحل که نیاز بود میکروتیوب‌های حاوی مواد سانتریفوژ و یا ورتکس شوند، تمام مراحل کار زیر هودی که از قبل آماده شده بود (استریل شده با الکل ۷۵ درصد و نور UV) انجام گرفت. در طی مراحل از دستکش لاتکس بدون پودر استفاده گردید و به محض نیاز به تعویض، دستکش‌ها تعویض می‌شد. کیت‌ها قبل از استفاده به دقت از یخچال با دمای ۲۰- درجه سانتی گراد خارج می‌شد و بعد از استفاده به داخل یخچال منتقل می‌گردید. تمام سمپلرها طبق زمان بندی‌های گروه کالیبره شده بودند.

سنتر cDNA

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

رزیابی بیان ژن

قبل از ارزیابی نهایی بیان ژن و طبق دستورالعمل تکنیک Real time PCR، نیاز بود میزان کارایی (Efficiency)

جدداً گانه با دقتی تا ۴ رقم اعشار به وسیله ترازوی دیجیتال (شرکت A&D، ژاپن) وزن شدند. میزان BSA موش‌ها با استفاده از فرمول ۱ (۲۰) محاسبه گردید که در آن، L طول بدن بر حسب سانتی متر و W وزن بدن بر حسب گرم می‌باشد. برای محاسبات مورد نظر، برنامه Excel مورد استفاده قرار گرفت.

$$BSA = 6/67 \times W^{0.7} \times [0.34 / (\sqrt[3]{W/L})] \quad \text{فرمول ۱}$$

استخراج RNA از بافت

جهت استخراج RNA از بافت‌های هموژن شده، به ۱۰۰ میلی گرم از بافت داخل میکروتیوب، ۱ میلی لیتر تریزول (Invitrogen) اضافه شد و پس از مخلوط کردن کامل (پیتاژ کردن)، به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری (انکوبه) شد. سپس، ۰/۲ میلی لیتر کلروفرم سرد به آن اضافه و پس از پیتاژ (۱۵ ثانیه)، حدود ۲ تا ۳ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. در ادامه، میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ (شرکت Eppendorf، آلمان) شدند و مایع رویی به دقت برداشته شد و به یک میکروتیوب RNAase free انتقال داده شد (از این مرحله به بعد با سر سمپلر فیلتردار کار شد). سپس ۰/۵ میلی لیتر ایزوپروپانول سرد اضافه گردید و بعد از مخلوط کردن ملایم در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد باقی ماندند (Overnight). روز بعد میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه دوباره سانتریفوژ شدند که در این مرحله یک رسوب سفید رنگ در ته اکثر میکروتیوب‌ها قابل مشاهده بود. با سمپلر (شرکت Eppendorf، آلمان) مایع رویی به دقت خارج و ۱ میلی لیتر اتانول خالص سرد به آن اضافه شد و بعد از تکان دادن مختصر به مدت ۵ دقیقه، در دمای ۴ درجه

R = GCTCACGAAGGCAGGAGATG و
GCCATAGTAATAGCACCAGGATACA طبق فرمول
 $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد (۲۲).

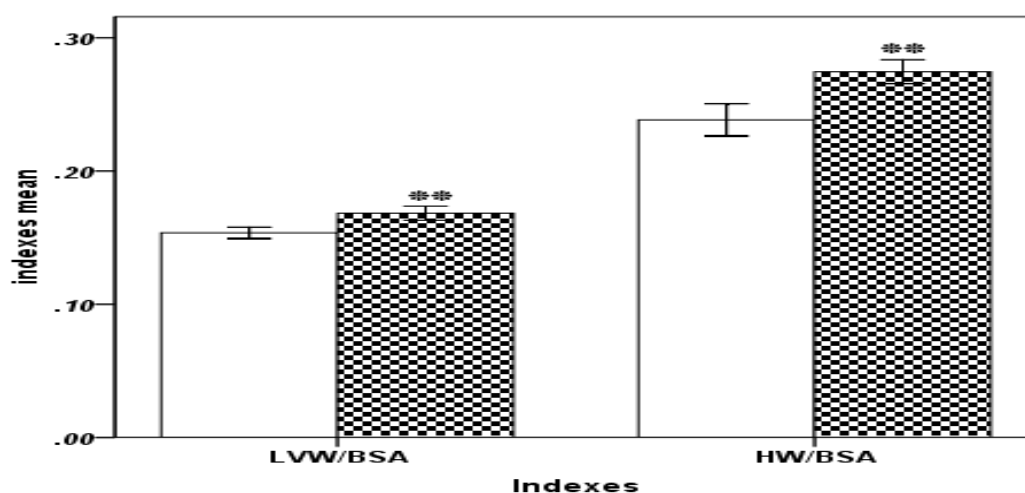
داده‌های به دست آمده از دستگاه Real time PCR که به صورت CT (میانگین CT برای هر نمونه) بود (۲۳-۲۵)، با استفاده از نرم‌افزار Excel به $\Delta\Delta CT$ تبدیل شد و اعداد نهایی با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ به دست آمد (۲۶). نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk ارزیابی شد و برای تعیین اختلاف میانگین‌ها نیز از آزمون Independent t در نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) استفاده گردید.

نتایج

نسبت LVW به BSA در گروه مورد ($0/168 \pm 0/008$)
گرم بر مترمربع) در مقایسه با گروه شاهد ($0/006 \pm$
 $0/153$ گرم بر مترمربع) بیشتر و معنی‌دار بود ($P = 0/010$).
نسبت وزن قلب (Heart weight یا HW) به BSA در گروه
مورد ($0/270 \pm 0/014$ گرم بر مترمربع) در مقایسه با
گروه شاهد ($0/240 \pm 0/019$) افزایش داشت و بین دو
گروه نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید ($P = 0/002$)
(شکل ۱). نتایج آزمون Independent t ($t = 15/75$) نیز نشان
داد که میانگین بیان ژن *sox6* بطن چپ گروه مورد نسبت
به گروه شاهد در اثر ۱۴ هفته تمرین استقامتی، حدود ۶۹
برابر بیشتر و در سطح $P = 0/001$ معنی‌دار بود (شکل ۲).

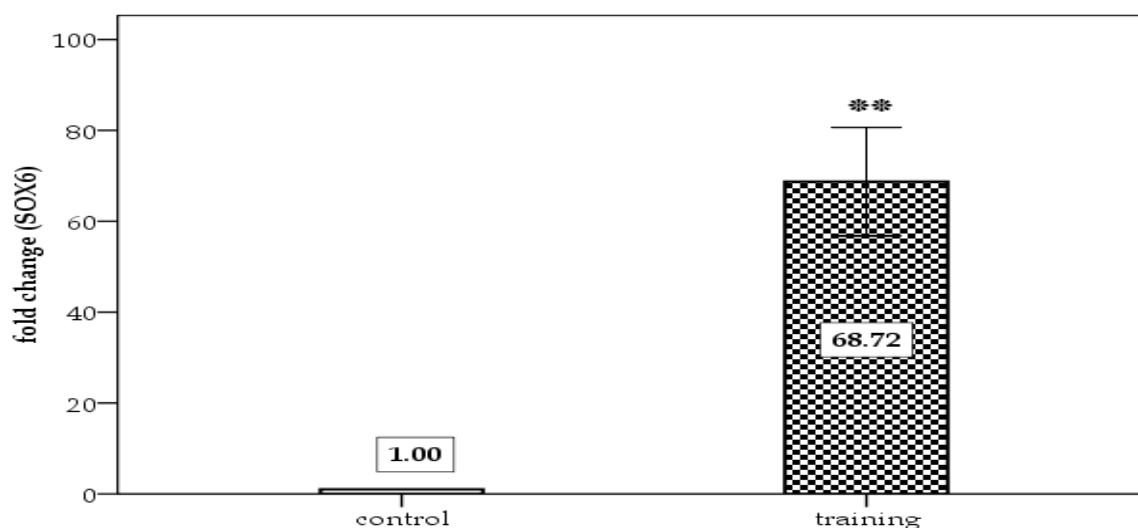
ژن مرجع (Housekeeping) (GAPDH) و ژن هدف (*sox6*) بررسی شود که میزان کارایی برای این دو ژن در بالاترین میزان خود (یعنی ۱) بود. در ادامه، از تکنیک Real time PCR و دستگاه شرکت Applied Biosystem (آمریکا) استفاده شد. SYBR green master mix استفاده شده در این مرحله متعلق به شرکت Takara (ژاپن) با Cat # RR820L بود. طبق دستورالعمل کیت و بررسی میزان کارایی ژن مرجع و هدف، برای یک نمونه ۱۰ لاندایی، ترکیبی از Master mix (۵ لاندای) پرایمر (۱ لاندای)، cDNA (۱ لاندای) و آب مقطر (۳ لاندای) در نظر گرفته شد و میزان بیان ژن با استفاده از روش نسبی مورد ارزیابی قرار گرفت. در هر Run (۴۰ سیکل)، یک نمونه به عنوان کنترل منفی برای تعیین آلودگی Master mix [طبق دستورالعمل شرکت Applied Biosystem (آمریکا) نباید CT (Cycle threshold) آن کمتر از ۳۵ باشد] در نظر گرفته شد. کنترل داخلی (GAPDH) (NM_017008.4) (پرایمر ۷۴ نوکلئوتیدی F = AACCCATCACCATCTTCCAG و R = CACGACATACTCAGCACCAG) (۲۱)، کنترل مثبت (گروه شاهد) و *sox6* هم‌زمان (در یک Run) ارزیابی گردید. نمونه‌ها به صورت دوتایی (Duplicate) مورد ارزیابی قرار گرفتند. پس از به دست آوردن CT دوتایی برای هر نمونه، میانگین آن‌ها محاسبه شد.

بعد از انتقال داده‌ها به نرم‌افزار Excel، میزان بیان ژن *sox6* (NM_001024751.1) (با پرایمر ۱۰۶ نوکلئوتیدی F =



شکل ۱. نسبت (LVW) Left ventricular weight و (HW) Heart weight به (BSA) Body surface area در گروه مورد (ستون‌های شطرنجی) نسبت به گروه شاهد (ستون‌های سفید)

** تفاوت میانگین گروه‌ها (مورد و شاهد) در سطح $P \leq 0.010$



شکل ۲. بیان ژن $sox6$ عضله قلب در گروه‌های شاهد و مورد (ستون شطرنجی)

** تفاوت میانگین گروه‌ها (مورد و شاهد) در سطح $P \leq 0.010$

بحث

کند، انجام نشده است. بنابراین، نمی‌توان نتیجه این پژوهش را با پژوهش‌های دیگر (با رویکرد فعالیت بدنی) مقایسه کرد. در نتیجه، بحث و بررسی این پژوهش با توجه به نتایج پژوهش‌هایی صورت می‌گیرد که بر شناسایی و عملکرد این ژن متمرکز شده‌اند.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که فعالیت استقامتی ضمن القای هایپرتروفی بطن چپ، موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن $sox6$ قلب می‌شود. لازم به ذکر است، هنوز پژوهشی که واکنش این ژن را در اثر فعالیت‌های استقامتی ارزیابی

تغییرات دیگر فاکتورهای تنظیمی که در تغییر فنوتیپ عضله مانند *PGC-1 α* و *AMPK* (فاکتورهای مرتبط با متابولیک) درگیر هستند، رخ می‌دهد. میزان *sox6* عضلات تندانقباض نسبت به عضله کندانقباض حدود ۳ برابر بالاتر است (۳۳). با توجه به نقش *sox6* (سرکوب عضله نوع کندانقباض) و تأثیری که از فعالیت استقامتی می‌گیرد، به نظر می‌رسد که تفاوت ایجاد شده در دو نوع هایپرتروفی (پاتولوژیک و فیزیولوژیک) و بهبود کارایی قلب، ناشی از افزایش بیان این ژن می‌باشد، هرچند در این مورد باید جانب احتیاط را نگه داشت؛ چرا که مشاهده شده است که چهار جایگاه اتصالی برای *miR-499* بر روی ناحیه ۳ پریم غیر ترجمه‌ای *3sox6 mRNA* (3-Untranslated region) قرار دارد (۳۴، ۱۴)؛ بدین معنی که افزایش بیان این ژن، به طور قطع به معنای افزایش پروتئین *sox6* (واحد عملکردی آن) نمی‌باشد.

برخی پژوهش‌های دیگر به نقش دوگانه *sox6* (فعال کننده و سرکوبگر) اشاره کرده (۳۶، ۳۵) و بیان نموده‌اند که رونویسی آن در عضله کندانقباض سرکوب می‌شود و این در صورتی است که پروتئین *sox6* محدود به عضلات تندانقباض باقی می‌ماند (۳۷). به نظر می‌رسد که این ژن نه تنها در تجدید ساختار عضله، بلکه بر شکل ظاهری آن نیز تأثیر می‌گذارد؛ چرا که مشخص شده است، حذف ژن *sox6* در عضله درشت‌نی و *EDL* (*Extensor digitorum longus*) (عضلات تندانقباض) موجب می‌شود که شکل ظاهری این عضله مشابه عضله کندانقباض شود (مانند قرمز تر شدن رنگ عضله و کمتر شدن وزن عضله نسبت به گروه شاهد). همچنین، بررسی‌های بافتی نشان داد که توزیع سطح مقطع این عضلات کاهش یافته و مانند عضله کندانقباض شده است، اما تعداد سلول‌ها در این عضلات مانند گروه

خانواده *sox* کد کننده گروه مهمی از فاکتورهای تنظیمی می‌باشند که در رشد و تمایز سلول‌ها نقش دارند (۲۷). ژن *sox6* نوعی سرکوب کننده رونویسی است که بیان β MHC در عضلات کندانقباض را سرکوب می‌نماید (۱۴). یکی از واکنش‌های بافت قلبی که دچار نارسایی شده است، افزایش بیان ژن β MHC یا در حقیقت برنامه‌ریزی مجدد دوران جنینی در قلب می‌باشد که با هایپرتروفی نوع پاتولوژیک همراه است (۲۸). فعالیت استقامتی ضمن هایپرتروفی فیزیولوژیک (۲۹)، موجب القای بیان α MHC می‌گردد (۳۰). همچنین، گزارش شده است که حذف *sox6* موجب گسترش کاردیومیوپاتی می‌شود (۱۲) و در تنظیم بیان کانال‌های کلسیمی نوع L (کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ) قلب (۱۵) و تعادل دقیق بیان ایزوفرم‌های مختلف (۱۳)، رشد سیستم عصبی (۳۱)، حفظ سلول‌های عضلانی، قلبی و عملکرد طبیعی فیزیولوژی بافت عضلات (۳۲) نقش مهمی دارد. بیشتر موارد ذکر شده با فعالیت‌های استقامتی مرتبط می‌باشند. به نظر می‌رسد که فعالیت‌های استقامتی با تأثیر بر بیان *sox6* بخشی از سازگاری‌های ایجاد شده را تولید می‌کند.

در عضلات اسکلتی که ژن *sox6* در آن‌ها سرکوب شده بود، بیان β MHC ۲۵ برابر افزایش یافت (۱۲). علاوه بر این، *sox6* برای حفظ میوفیبریل‌ها در عضلات بالغ ضروری است و کاهش آن، موجب تغییر بیان در عضلات تندانقباض و گرایش به سمت عضله کندانقباض می‌شود (۳۳). پژوهش‌ها نشان می‌دهند که این ژن در حفظ ساختار و تعیین نوع عضله درگیر است؛ به طوری که سرکوب کردن *sox6* موجب افزایش ایزوفرم پروتئین‌های کندانقباض و کاهش ایزوفرم پروتئین‌های تندانقباض در عضلات اسکلتی و قلب می‌گردد (۱۲). تنظیم *sox6* در عضلات، مستقل از

مهم‌ترین محدودیت مطالعه حاضر، عدم پژوهش‌های مشابه بود؛ به طوری که پژوهشی یافت نشد که بتوان تفسیر دقیق‌تری از یافته‌های این مطالعه داشت. همچنین، این موضوع نیز مورد سؤال است که آیا پروتئین این ژن در پی فعالیت‌های استقامتی در بافت عضله (به خصوص قلب) تحت تأثیر قرار می‌گیرد؟ بنابراین، انجام پژوهشی که تأثیر فعالیت استقامتی بر بیان پروتئین این ژن را در بافت قلب ارزیابی کند، پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد که فعالیت استقامتی با افزایش بیان ژن *sox6* موجب بهبود شاخص‌های عملکردی (نسبت LVW و HW به سطح رویه بدن) قلب به خصوص بطن چپ می‌شود.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر با حمایت مالی دفتر حمایت از طرح‌های پژوهشی ریاست جمهوری انجام شد.

شاهد می‌باشد که بیانگر کاهش توده عضله، ناشی از کاهش اندازه تارچه‌ها است. سرعت کوتاه شدن بیشینه در عضله EDL سرکوب شده برای *sox6* (نه در نعلی) در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت که با عملکرد عضله در ارتباط است؛ چرا که ارزیابی استقامت عضله با استفاده از آزمون «زمان رسیدن به خستگی» نشان داد که زمان رسیدن به خستگی در عضله EDL و نعلی سرکوب شده برای *sox6* به ترتیب ۵۰ و ۱۰۰ درصد بیشتر از عضلات گروه شاهد است (۳۳).

علاوه بر نقش‌های ذکر شده برای *sox6*، مشخص شده است که این فاکتور به طور مستقیم بیان ژن‌های انتقال دهنده کلسیمی و انقباضی آهسته را سرکوب می‌کند و میزان بیان پروتئین PGC-1 α و AMPK فسفوریله در موش‌های سرکوب شده تغییری نکرد که فاکتور اول موجب شکل‌گیری عضله کندانقباض می‌شود و فاکتور دوم یک تنظیم‌کننده متابولیکی تغییر نوع عضلانی در پاسخ به تمرینات استقامتی است (۳۳).

References

1. Chen SR, Lee YJ, Chiu HW, Jeng C. Impact of physical activity on heart rate variability in children with type 1 diabetes. *Childs Nerv Syst* 2008; 24(6): 741-7.
2. Chaunchaiyakul R, Groeller H, Clarke JR, Taylor NA. The impact of aging and habitual physical activity on static respiratory work at rest and during exercise. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 287(6): L1098-L1106.
3. Cawley J, Meyerhoefer C, Newhouse D. The impact of state physical education requirements on youth physical activity and overweight. *Health Econ* 2007; 16(12): 1287-301.
4. King G, Wood MJ. The heart of the endurance athlete assessed by echocardiography and its modalities: "embracing the delicate balance". *Curr Cardiol Rep* 2013; 15(8): 383.
5. Fathi M, Gharakanlou R, Abroun S, Mokhtari-Dizaji M, Rezaei R. The evaluation of cardiac changes following endurance training in male Wistar rats. *Yafteh* 2014; 15(5): 112-23. [In Persian].

6. Weiner RB, Baggish AL. Exercise-induced cardiac remodeling. *Prog Cardiovasc Dis* 2012; 54(5): 380-6.
7. Pluim BM, Zwinderman AH, van der Laarse A, van der Wall EE. The athlete's heart. A meta-analysis of cardiac structure and function. *Circulation* 2000; 101(3): 336-44.
8. Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol* 2003; 65: 45-79.
9. Takahashi T, Schunkert H, Isoyama S, Wei JY, Nadal-Ginard B, Grossman W, et al. Age-related differences in the expression of proto-oncogene and contractile protein genes in response to pressure overload in the rat myocardium. *J Clin Invest* 1992; 89(3): 939-46.
10. Pelliccia A, Maron MS, Maron BJ. Assessment of left ventricular hypertrophy in a trained athlete: differential diagnosis of physiologic athlete's heart from pathologic hypertrophy. *Prog Cardiovasc Dis* 2012; 54(5): 387-96.
11. Matsakas A. Molecular advances shed light on cardiac myosin heavy chain expression in health and disease. *Exp Physiol* 2009; 94(12): 1161-2.
12. Hagiwara N, Ma B, Ly A. Slow and fast fiber isoform gene expression is systematically altered in skeletal muscle of the *sox6* mutant, p100H. *Dev Dyn* 2005; 234(2): 301-11.
13. Sluijter JP, van Mil A, Korfage TH, Metz CH, Doevendans PA, Goumans MJ. MicroRNA-1 Regulates cardiomyocyte differentiation and proliferation in human-derived cardiomyocyte progenitor cells. *Circulation* 2007; 116: 223.
14. van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J, Olson EN. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a micro RNA. *Science* 2007; 316(5824): 575-9.
15. Cohen-Barak O, Yi Z, Hagiwara N, Monzen K, Komuro I, Brilliant MH. *sox6* regulation of cardiac myocyte development. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(20): 5941-8.
16. 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): H2994-H3002.
17. 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.
18. Zhu SS, Ma JZ, Yong YH, Niu J, Zhang JN. Left ventricular function in physiologic and pathologic hypertrophy in Sprague–Dawley rats. *Science and Sports* 2008; 23(6): 299-305.
19. Seo JS, Lee SY, Won KJ, Kim DJ, Sohn DS, Yang KM, et al. Relationship between normal heart size and body indices in Korean. *J Korean Med Sci* 2000; 15(6): 641-6.
20. Farriol M, Rosselló J, Schwartz S. Body surface area in Sprague-Dawley rats. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 1997; 77(1-5): 61-5.
21. Silver N, Cotroneo E, Proctor G, Osailan S, Paterson KL, Carpenter GH. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in the adult rat

- submandibular gland under normal, inflamed, atrophic and regenerative states. *BMC Mol Biol* 2008; 9: 64.
22. 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.
 23. Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* 2006; 7: 85.
 24. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 2005; 39(1): 75-85.
 25. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008; 3(6): 1101-8.
 26. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(9): e45.
 27. Kamachi Y, Uchikawa M, Kondoh H. Pairing *sox* off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet* 2000; 16(4): 182-7.
 28. Reiser PJ, Portman MA, Ning XH, Schomisch MC. Human cardiac myosin heavy chain isoforms in fetal and failing adult atria and ventricles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280(4): H1814-H1820.
 29. 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-H1310.
 30. Rohini A, Agrawal N, Koyani CN, Singh R. Molecular targets and regulators of cardiac hypertrophy. *Pharmacol Res* 2010; 61(4): 269-80.
 31. Connor F, Wright E, Denny P, Koopman P, Ashworth A. The Sry-related HMG box-containing gene *sox6* is expressed in the adult testis and developing nervous system of the mouse. *Nucleic Acids Res* 1995; 23(17): 3365-72.
 32. Hagiwara N, Klewer SE, Samson RA, Erickson DT, Lyon MF, Brilliant MH. *sox6* is a candidate gene for p100H myopathy, heart block, and sudden neonatal death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(8): 4180-5.
 33. Quiat D, Voelker KA, Pei J, Grishin NV, Grange RW, Bassel-Duby R, et al. Concerted regulation of myofiber-specific gene expression and muscle performance by the transcriptional repressor *sox6*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(25): 10196-201.
 34. Zacharewicz E, Lamon S, Russell AP. MicroRNAs in skeletal muscle and their regulation with exercise, ageing, and disease. *Front Physiol* 2013; 4: 266.
 35. Lefebvre V. Toward understanding the functions of the two highly related *sox5* and *sox6* genes. *J Bone Miner Metab* 2002; 20(3): 121-30.
 36. Lefebvre V, Li P, de Crombrughe B. A new long form of *sox5* (L-*sox5*), *sox6* and *sox9* are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J* 1998; 17(19): 5718-33.
 37. Wang X, Ono Y, Tan SC, Chai RJ, Parkin C, Ingham PW. Prdm1a and miR-499 act sequentially to restrict *sox6* activity to the fast-twitch muscle lineage in the zebrafish embryo. *Development* 2011; 138(20): 4399-404.

The Effect of Endurance Activity on Expression of *sox6* Gene of Left Ventricle in Male Wistar Rat

Mohammad Fathi, Ph.D.^{1*}, Saeid Abroun, Ph.D.²

1. Assistant Professor, Physical Education Department, Lorestan University, Khorramabad, Iran

2. Associate Professor, hematology Department, Medical Sciences Faculty, TarbiatModares University, Tehran, Iran

* Corresponding author; e-mail: fathi.m@lu.ac.ir

(Received: 5 Jan. 2015 Accepted: 17 June 2015)

Abstract

Background & Aims: The expression of myocardium gene can be affected by endurance activity; besides, *sox6* transcription factor influences its formation. This study aimed to investigate the effect of 14 weeks of endurance activity on expression of *sox6* gene of left ventricle in male Wistar rats.

Methods: Fourteen rats were housed under the controlled conditions and after adjusting with endurance program, were randomly assigned into two groups of control and experimental. For the experimental group, an endurance program (14 weeks, 6 days/week, 60 minutes/day, and velocity of 30 m/minutes) on motorized treadmill was performed. Then, the rats were anesthetized and sacrificed 48 hours after the end of the last session and the left ventricle was removed. Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) method was used to determine the expression levels of *sox6* gene in the left ventricle. The collected data were evaluated using t-test.

Results: The ratio of left ventricle weight (LVW) to the body surface area (BSA) was significantly ($P=0.010$) higher in experimental group ($0.168 \pm 0.008 \text{ g/m}^2$) compared to the control group ($0.153 \pm 0.006 \text{ g/m}^2$). The ratio of heart weight (HW) to the body surface area was significantly ($P = 0.002$) higher in experimental group (0.270 ± 0.014) compared to the control group (0.240 ± 0.019), too. In addition, the mean expression value of *sox6* gene of left ventricle was significantly higher in experimental group ($P = 0.001$), too.

Conclusion: It seems that physical activity improves heart functional indices (the ratio of left ventricle and heart weight to body surface area), especial in left ventricle, via increasing the expression of *sox6* gene.

Keywords: *sox6* transcription factor, Physical activity, Left ventricle