



The aerobic maternal exercise increases PDK4 gene expression in slow and fast twitch muscles of rat male offspring.

Setareh Beyhaghi ¹ | Neda Khaledi ² | Hossein Askari ²

1. master of exercise physiology, department of exercise physiology, Kharazmi University, Tehran, Iran.
2. assistant professor, faculty of sport sciences, department of exercise physiology, Kharazmi University, Tehran, Iran.
3. assistant professor, faculty of life sciences, department of plant sciences and biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.



CrossMark

corresponding author: Neda Khaledi; neda_khaledi@hotmail.com

ARTICLE INFO

Article type:

Research Article

Article history:

Received 2021/05/06

Revised: 2021/10/19

Accepted: 2021/11/21

Keywords:

Gene expression, metabolic factors, Epigenetics, Pyruvate Dehydrogenase Complex.

How to Cite:

Beyhaghi, S., Khaledi, N., Askari, H. The aerobic maternal exercise increases PDK4 gene expression in slow and fast twitch muscles of rat male offspring. *Research In Sport Medicine and Technology*,. 2022: 12(23): 13-23.

Recent studies indicate that environment can modify skeletal muscle gene expression and transcriptional factors in offspring genes. Therefore, exercising can lead to changes in the gene expression of the future generations. One of the important metabolic factors is PDK4, which is known as the main factor in Pyruvate Dehydrogenase Complex (PDC). This study examined the effects of maternal exercise on PDK4 expression in slow and fast twitch (soleus and EDL) muscles of male offspring. Twenty Sprague-Dawley rats were divided to three training groups: before pregnancy (TBP), during pregnancy (TDP) and before and during pregnancy (TBDP) and pregnancy without training (control) group. Training groups were running on a treadmill for four, three and seven weeks, respectively. Two months after the birth of the offspring, 6 male rats were chosen randomly from the offspring of each group. The samples were anesthetized using Ketamine (90 mg/kg) and Xylazine (10 mg/kg) and their soleus and EDL muscles were removed immediately for examine. Gene expression of offspring muscles were analyzed using real-time RT-PCR. Fisher test were used to analyze the difference between the training and the control group. PDK4 expression of offspring were significantly increased in all groups except for EDL muscle of the TBP group. According to the results, it seems likely maternal exercise training can affect the metabolic regulation in the offspring by increasing the expression of some metabolic genes.

Published by Kharazmi University, Tehran, Iran. Copyright(c) The author(s) This is an open access article under e: CC BY-NC license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) DOI: 10.29252/jsmt.12.1.13.



<https://jsmt.khu.ac.ir/>



پژوهش در طب ورزشی و فناوری

شاپا چاپی: ۰۷۰۸-۲۲۵۲ شاپا الکترونیک: ۳۹۲۵-۲۵۸۸

Homepage: <https://jsmt.khu.ac.ir>



تمرین ورزشی هوازی مادری بیان ژن PDK4 را در عضله اسکلتی تند و کند نسل اول فرزندان نر

موش‌های صحرایی افزایش می‌دهد

ستاره بیهقی^۱ | ندا خالدی^{۲*} | حسین عسکری^۲

۱. کارشناس ارشد فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.
۲. دانشیار فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.
۳. استادیار دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی.

نویسنده مسئول: ندا خالدی neda_khaledi@hotmail.com

اطلاعات مقاله:

نوع مقاله: مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۲/۱۶

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۰/۷/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۸/۳۰

واژه‌های کلیدی:

اپی ژنتیک، تنظیم متابولیکی، بیان ژن، چرخه پیروات دهیدروژناز

ارجاع:

ستاره بیهقی، ندا خالدی، حسین عسکری. تمرین ورزشی هوازی مادری بیان ژن PDK4 را در عضله اسکلتی تند و کند نسل اول فرزندان نر موش‌های صحرایی افزایش می‌دهد. پژوهش در طب ورزشی و فناوری. ۱۲ (۲۳): ۱۳-۲۳.

چکیده

پژوهش‌های اخیر نشان دادند که محیط می‌تواند اصلاح کننده ژن‌ها از طریق اپی ژنتیک باشد، بر همین اساس مداخله ورزش می‌تواند منجر به تغییر بیان ژن در نسل‌های آینده گردد. از جمله عوامل مهم سوخت و ساز می‌توان به PDK4 که یک عامل اصلی چرخه پیروات دهیدروژناز است اشاره کرد. این پژوهش اثر تمرین ورزشی مادری را بر بیان ژن PDK4 در عضلات نعلی و باز کننده طویل انگشتان پا در فرزندان نسل اول مورد بررسی قرار داد. ۲۰ سر موش صحرایی نر نژاد اسپراگ داوولی دو ماهه در ۳ گروه تمرینی قبل بارداری، حین بارداری و قبل و حین بارداری و یک گروه کنترل بدون تمرین ورزشی تقسیم شدند. گروه‌های تمرینی به ترتیب تحت پروتکل ۴، ۳ و ۷ هفته ای تمرین هوازی قرار گرفتند. بعد از گذشت ۲ ماه از تولد نوزادان، به طور تصادفی ساده از هر گروه ۶ سر موش صحرایی نر به منظور نمونه برداری انتخاب شدند. آزمودنی‌ها بوسیله ترکیب کتامین (90 mg/kg) و زایلوزین (10 mg/kg) بیهوش و بلافاصله عضله نعلی و عضله طویل بازکننده انگشتان (EDL) برای بررسی برداشته شد. سنجش بیان ژن‌ها با روش Real time PCR انجام شد. با آزمون آماری فیشر، اختلاف بین گروه‌های تمرینی و کنترل اندازه گیری شد. بیان ژن PDK4 فرزندان نسل اول تمامی گروه‌ها و عضلات به جز گروه تمرین قبل از بارداری و در عضله اسکلتی باز کننده طویل انگشتان پا، افزایش یافت. با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد احتمالا تمرین ورزشی مادری با افزایش بیان ژن‌های متابولیکی می‌تواند تنظیم متابولیکی نسل اول فرزندان را تحت تأثیر قرار دهد.

مقدمه

تحقیقات اخیر بیانگر این موضوع است که فاکتورهای محیطی می‌توانند ژنوم را از طریق اپی‌ژنتیک در طی نسل‌ها اصلاح کنند (۱). اخیراً با بررسی تأثیرات اپی‌ژنتیک، متوجه شدند که اپی‌ژنتیک نقش مهمی را به وسیله تغییرات قابل بازگشت ساختار کروماتینی در بیان ژن ایفا می‌کند که این تغییرات بدون ایجاد تغییر در توالی ژن است (۲). در حال حاضر یکی از جدیدترین علوم نوین وابسته به ژنتیک بررسی ارث‌پذیری آثار تمرین ورزشی، یعنی اپی‌ژنتیک فعالیت ورزشی است. به‌طور کلی اپی‌ژنتیک تغییراتی است که در DNA یا ساختار کروماتین اتفاق می‌افتد و می‌تواند رونویسی از چند ژن را به‌طور مستقل تحت تأثیر قرار دهد. شایع‌ترین تغییرات اپی‌ژنتیک ناشی از فعالیت ورزشی، تغییرات هیستونی شامل متیلاسیون و استیلاسیون هیستونی و تغییرات DNA شامل متیلاسیون DNA و بیان انواع مختلف micro RNA ها است (۳)(۳)(۳)(۳)(۳). (Ntanasis-Stathopoulos et al., 2013) (اپی‌ژنتیک تغییرات مستقل از تغییر در ساختار DNA یا جهش است. محصول تغییرات اپی‌ژنتیک، تغییر در فنوتیپ بدون تغییر در ژنوتیپ است. اپی‌ژنتیک توانایی اصلاح کردن تغییرات ناخوشایند در کدهای ژنتیکی را توسط فاکتورهای تغذیه‌ای دارد (۴). مکانیزم‌های اپی‌ژنتیک که سبب افزایش بی‌تنظیمی و آغاز بیماری‌های متابولیکی می‌شوند توسط عوامل محیطی مؤثر بر تکامل جنین همچون تمرین ورزشی، روال معکوس پیدا می‌کنند (۵). رفتارهای مادر در حین بارداری بر روی سلامت فرزند در بزرگسالی تأثیر می‌گذارد (۶). از این رو شیوع و گسترش اختلالات و بیماری‌های مادران منجر به مستعد شدن فرزندان در ابتلا به بیماری‌های متابولیکی در زندگی آینده‌شان خواهد شد (۷)؛ اما از طرفی فعالیت ورزشی مادری اثرات مثبتی روی سلامت فرزندان از جمله بهبود عملکرد متابولیکی آن‌ها می‌گذارد (۸). فعالیت ورزشی تغییرات را در بیان ژن ایجاد می‌کند که آغازکننده سازگاری‌های متابولیکی و ساختاری در عضله اسکلتی می‌شود. یکی از مکانیزم‌های سلامتی و تأثیر ورزش بر تغییرات اپی‌ژنتیک کاهش خطر چاقی و بیماری‌ها است. فعالیت بسیاری از آنزیم‌ها بیانگر تغییر در متیلاسیون DNA و اصلاحات هیستونی و فرایند بعد از ترجمه و نسخه‌برداری در متابولیت‌ها در طول ورزش و بعد از ورزش است. مکانیزم‌های اپی‌ژنتیک که سبب توسعه بی‌تنظیمی متابولیکی و آغاز بیماری‌های متابولیکی چاقی می‌شود توسط عوامل محیطی مانند برنامه فعالیت ورزشی و مداخلات دارویی مؤثر بر تکامل جنین، روال معکوس میابد و برعکس می‌شود (۹). فعالیت ورزشی هوازی بیان mRNA تعداد زیادی از ژن‌های تنظیم‌کننده عملکرد میتوکندریایی را افزایش می‌دهد که از این جمله می‌توان به PDK4 اشاره کرد (۱۰). PDK4 یکی از چهار ایزوفرم آنزیم تنظیمی PDK است که با فسفوریله شدن منجر به غیرفعال شدن PDC در پاسخ به شرایط فیزیولوژیکی می‌شود که با تغییر منبع انرژی از گلوکز به اسید چرب اتفاق می‌افتد (۲). PDC یک مجموعه چند آنزیمی است از ۳ آنزیم کاتابولیکی (E1، پیروات دهیدروژناز) (E2، دی

هیدرولیوآمید استیل ترانسفراز) و دی هیدرولیوآمید دهیدروژناز (E3) و یک پروتئین ساختاری اتصالی E3 و ۲ آنزیم تنظیمی PDK و پیرووات دهیدروژناز فسفاتاز (PDP) است. PDK4 به عنوان یکی از فاکتورهای دخیل در متابولیسم میتوکندریایی تولید ATP را به وسیله فسفوریلاسیون اکسیداتیو حمایت می کند (۱۱). پس احتمالاً تغییرات بیان ژن PDK4 در عضله کند انقباض نعلی به عنوان یک عضله اکسیداتیو که حاوی تعداد بیشتری میتوکندری است (۱۲) بیشتر خواهد بود رونویسی PDK4 و mRNA PDK4 طی فعالیت ورزشی بلندمدت و پس از فعالیت ورزشی کوتاه مدت شدید و بلندمدت با شدت پایین به صورت معنی دار افزایش می یابد. پاسخ رونویسی ناشی از فعالیت ورزشی PDK4 زمانی بالا می رود که گلیکوژن عضله قبل از فعالیت ورزشی کاهش یابد و رژیم پرچرب کم کربوهیدرات مصرف شود. در طی ریکاوری بعد از فعالیت ورزشی رونویسی و میزان RNA، PDK4 در مقایسه با زمانی که رژیم پرکربوهیدرات مصرف می شود افزایش می یابد (۱۱). مشخص است که فعالیت ورزشی فواید متعددی بر سلامتی دارد اما اثرات فعالیت ورزشی مادری روی فوتوتایپ متابولیکی فرزندان هنوز به خوبی شناخته نشده است (۱۳). در تنها مطالعه مشابه، استفورد و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که فعالیت ورزشی داوطلبانه موش ها قبل و حین بارداری می تواند از نیمرخ متابولیکی فرزندان در مقابل اثرات مضر رژیم غذایی پرچرب مادران محافظت کند (۱۳). تغییر سبک زندگی مادران امروزی به سمت کاهش فعالیت های بدنی روزانه، کاهش شرکت در فعالیت های منظم ورزشی و مصرف رژیم غذایی پرچرب و پرکالری تهدیدی برای سلامتی و تندرستی مادر و نسل های بعدی است. بر این اساس، با توجه به مطالعات انجام شده درباره اپی ژنتیک و تأیید تأثیر عوامل محیطی در بیان ژن های نسل بعد، به نظر می رسد تأثیر مداخله های ورزشی به عنوان یک مداخله محیطی مؤثر خیلی کم مورد مطالعه قرار گرفته است؛ بنابراین آنچه مورد مطالعه قرار نگرفته است این است که آیا فعالیت ورزشی منظم قبل از بارداری، حین بارداری می تواند موجب افزایش تأثیر فاکتور متابولیکی PDK4 در فرزندان نسل بعد شود که در نتیجه باعث بهبودی در نسل های آینده گردد. پژوهش حاضر با مطالعات حیوانی به تعیین اثر فعالیت ورزشی مادری (مستقل از فعالیت ورزشی پدری)، روی بیان ژن متابولیکی PDK4 عضلات تند و کند انقباض نسل اول فرزندان نر، پرداخته است. سؤال پژوهش نیز این گونه بیان می گردد که آیا فعالیت ورزشی هوازی مادری قبل بارداری، حین بارداری و قبل و حین بارداری می تواند موجب بهبود بیان ژن PDK4 در فرزندان نسل اول شود؟

روش شناسی پژوهش

روش پژوهش حاضر از نوع تجربی - آزمایشگاهی و با مدل حیوانی و طرح پژوهش، طرح پس آزمون با گروه کنترل است.

این پژوهش با دریافت کد اخلاق "IR.QUMS.REC.1396.288" از کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی قزوین مورد تأیید قرار گرفت. جامعه آماری را فرزندان نر ۲۰ سر موش صحرایی ماده نژاد اسپراگ داوولی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی تشکیل دادند. نمونه های این جامعه آماری فرزندان نر ۲ ماهه ای بودند که به صورت تصادفی ساده به منظور تشریح و نمونه برداری از هر گروه انتخاب شدند. این پژوهش در آزمایشگاه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی قزوین انجام شد. حجم نمونه برای هر گروه برابر با ۶ در نظر گرفته شد. ۲۰ سر موش صحرایی ماده نژاد اسپراگ داوولی ۶ هفته ای که تجربه بارداری را نداشتند، پس از یک هفته آشناسازی با محیط آزمایشگاه به طور تصادفی ساده در ۴ گروه: (۱) تمرین قبل از بارداری ($n=5$)، (۲) تمرین حین بارداری ($n=5$)، (۳) تمرین قبل و حین بارداری ($n=5$) و (۴) کنترل (بدون هیچ گونه فعالیت ورزشی) ($n=5$) تقسیم شدند. بعد از اتمام پروتکل ۴ هفته تمرین هوازی قبل از بارداری (که فقط گروه های ۱ و ۳ تحت آن قرار گرفتند)، به مدت ۳ روز یک موش صحرایی نر با دو موش صحرایی ماده در یک قفس جهت جفت گیری قرار داده شدند. تشخیص و تأیید بارداری در موش های صحرایی ماده با مشاهده پلاک واژنی صورت پذیرفت. سپس تا پایان دوران بارداری که ۱۹-۲۱ روز بود، موش های صحرایی ماده گروه های ۲ و ۳ تحت پروتکل تمرینی هوازی مخصوص آن دوره قرار گرفتند. پس از زایمان، نوزادان دوره ۲۱ روزه شیردهی را طی کردند. سپس نوزادان نر جدا شدند و بر اساس گروه هایی که مادرانشان در آنها حضور داشتند در ۴ گروه: (۱) تمرین قبل از بارداری، (۲) تمرین حین بارداری، (۳) تمرین قبل و حین بارداری و (۴) کنترل (بدون هیچ گونه فعالیت ورزشی) تقسیم شدند. این گروه ها در قفس و با دسترسی آزاد به آب و غذا برای مدت ۲ ماه نگهداری شدند. در این دوران وزن موش های صحرایی و میزان غذای مصرفی آنها به صورت هفتگی اندازه گیری گردید. بعد از ۲ ماه از هر گروه به صورت تصادفی ۶ موش صحرایی به منظور نمونه گیری انتخاب شد. حیوانات در آزمایشگاه با دمای محیط 22 ± 2 درجه سانتی گراد و میزان رطوبت ۵۵ تا ۶۰ درصد کنترل شده نگهداری شدند. برای تنظیم چرخه روشنایی-تاریکی (۱۲:۱۲) از تایمر خودکار استفاده شد.

پروتکل فعالیت ورزشی: در ابتدا تمامی گروه ها (تمرین و کنترل) به مدت یک هفته با نحوه فعالیت روی نوار گردان آشنا شدند. آزمودنی های گروه ۱ (تمرین قبل از بارداری) به مدت ۴ هفته و گروه ۲ (تمرین حین بارداری) به مدت ۳ هفته گروه ۳ (تمرین قبل و حین بارداری) به مدت ۷ هفته تحت برنامه تمرین هوازی با شدت متوسط (۶۵-۵۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی) قرار گرفتند. پروتکل تمرین هوازی با شدت متوسط در تحقیق حاضر با رعایت اصل اضافه بار شامل هفته های تمرینی تردمیل، ۵ روز در هفته صورت پذیرفت. ابتدا آزمودنی ها به منظور گرم کردن ۳ دقیقه با سرعت ۱۶ متر بر دقیقه روی نوار گردان می دویند و سپس بدنه اصلی تمرین اجرا می گردید (۱۴). دوران بارداری آزمودنی ها بین ۲۱-

۱۹ روز بود که برنامه تمرینی بر اساس این مدت طرح ریزی شد و آزمودنی‌های گروه ۲ (تمرین در حین بارداری) و گروه ۳ (تمرین قبل و در حین بارداری) این تمرین را برای ۵ روز در هفته انجام دادند (۱۵) (شکل ۱). ۴۸ ساعت قبل از زایمان فعالیت ورزشی متوقف شد تا زایمان صورت گیرد.

شکل ۱- طرح آزمایش

نمونه برداری (بعد از ۲ ماه)	زایمان نوزاد و شیردهی (۲۱ روز)	پروتکل تمرین ورزشی حین بارداری			جلسات گزین با موزن بر (۵ روز)	پروتکل تمرین ورزشی قبل از بارداری				سازگاری با ترمیدل (یک هفته)	آشنایی با محیط (یک هفته)
		هفته ۱	هفته ۲	هفته ۳		هفته ۱	هفته ۲	هفته ۳	هفته ۴		
		جلسه ۵	جلسه ۵	جلسه ۵		جلسه ۵	جلسه ۵	جلسه ۵	جلسه ۵		
		۱۰-۱۸ دقیقه	۲۰-۲۸ دقیقه	۳۰ دقیقه		۵۲-۶۰ دقیقه	۴۰-۴۸ دقیقه	۳۰-۳۸ دقیقه	۲۰-۲۸ دقیقه		
		۱۰ متر بر دقیقه	۱۰-۱۲ متر بر دقیقه	۱۲ متر بر دقیقه		۲۰ متر بر دقیقه	۲۰ متر بر دقیقه	۱۸ متر بر دقیقه	۱۸ متر بر دقیقه		
		۱ ست	۱ ست	۱ ست		۱ ست	۱ ست	۱ ست	۱ ست		

استخراج و سنجش بیان ژن

آماده سازی نمونه: ابتدا آزمودنی‌ها به وسیله ترکیب کتامین (90 mg/kg) و زایلوزین (10 mg/kg) بیهوش شدند (۱۶). سپس برای اطمینان از کمترین آزار حیوان، ابتدا فوراً با جدا کردن قلب، حیوانات معدوم شدند و بلافاصله عضله نعلی و عضله طویل بازکننده انگشتان (EDL) آن‌ها جهت بررسی برداشته شدند و سریعاً بعد از قرارگیری در کرایوتیوب-DNA Free درون ایزت مایع قرار داده شدند. عضلات تا زمان سنجش بیان ژنی درون فریز با دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند RNA. کل با استفاده از کیت ترایزول استخراج گردید. به منظور بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده از دو روش UV اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد RNA. استخراج شده، با استفاده از دستگاه NanoDrop 2000 UV-Vis spectrophotometer شرکت Thermo scientific, USA غلظت سنجی شد. غلظت RNA با استفاده از خاصیت جذب نور در طول موج ۲۶۰ نانومتر به دست آمد. برای ژن موردنظر آغازگرهای رفت و برگشتی به کمک نرم افزار (Primer 3) و بر اساس توالی کد کننده ژن‌ها (CDS) آغازگرهای انتخابی طراحی گردید. پرایمر رفت ژن PDK4، با توالی ۵' CACCTTCACCACATGCTCTT ۳' و پرایمر برگشت ژن PDK4، با توالی ۵' CCACCTCGGTCAGAAATCTTGA ۳' و با سایز ۱۴۹ bp طراحی گردید. همچنین پرایمر رفت ژن GAPDH، با توالی ۵' AACTCCATTCTTCCACCTTTGAT ۳' و پرایمر برگشت ژن GAPDH، با توالی ۵' AGCCATATTCATTGTCATACCAGGA ۳' و با سایز ۹۴ bp طراحی گردید.

به منظور ارزیابی بیان ژن‌های مورد مطالعه آزمون qRT-PCR در ۳ تکرار آزمایشی و ۲ تکرار دستگاهی انجام گرفت. آزمون qRT-PCR با استفاده از معرف سایبرگرین شرکت Bioneer انجام گرفت. دستگاه مورد استفاده، دستگاه ترمال سایکلر مدل ABI StepOne ساخت شرکت Applied Biosystems بود و واکنش qRT-PCR در میکروپلیت‌های ۴۸ چاهکی و در حجم نهایی ۱۰ میکرو لیتر انجام شد. کمیت سنجی بیان ژن در آزمون QRT-PCR به صورت Relative انجام گرفت.

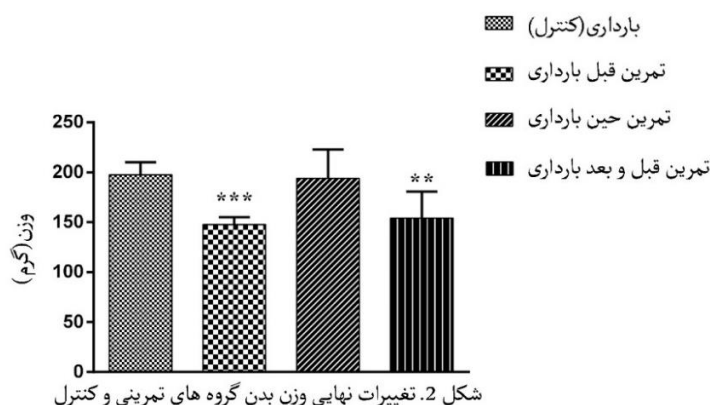
در کمیت سنجی نسبی ارزیابی میزان بازده PCR بسیار حائز اهمیت است. پس از اندازه‌گیری میزان Ct ، برای ژن‌های مورد مطالعه در نمونه‌های تحت بررسی، کارایی PCR با استفاده از نرم‌افزار LinRegPCR (Ruijter et al. 2009) تعیین و پس از محاسبات آماری با استفاده از برنامه Excell، میزان نسبت بیان (FC) و یا طبق فرمول pfaffl محاسبه شد:

$$FC = Ratio = \frac{(E_{ref})^{Ct_{Sample}}}{(E_{target})^{Ct_{Sample}}} \div \frac{(E_{ref})^{Ct_{calibrator}}}{(E_{target})^{Ct_{calibrator}}}$$

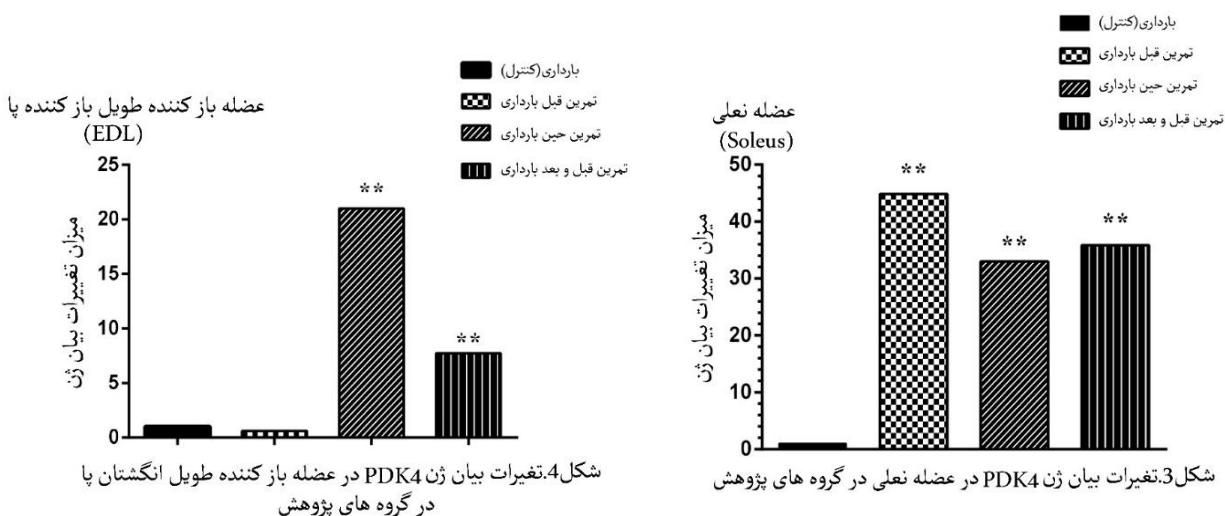
از آمار توصیفی برای دسته‌بندی داده‌های خام و تنظیم جدول‌ها و از برنامه‌های excel و Ms tat c برای تنظیم نمودارها و انجام محاسبات استفاده شد. آزمون نرمال بودن توزیع خطاهای آزمایشی با استفاده از نرم‌افزار MSTATC و آزمون بارتلت برای بررسی فرض یکنواختی واریانس‌ها انجام شدند. از روش $\Delta\Delta CT-2$ برای محاسبه کمی میزان افزایش یا کاهش بیان ژن هدف در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل استفاده شد. از آزمون فیشر (F-test) با سطح معنی‌داری $P \geq 0.01$ برای تعیین معنی‌داری فرض صفر استفاده شد.

یافته‌ها

میانگین و انحراف معیار وزن بدن گروه‌های کنترل و تمرینی بعد از اتمام دوره‌های تمرین در شکل ۲ آمده است.



تغییرات بیان ژن PDK4 در عضله نعلی، سطح بیان mRNA PDK4 در سه گروه تمرینی نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری بالاتر بود (تمرین قبل از بارداری: $84/44$ برابر و $p=0/0078$ ، تمرین حین بارداری: 33 برابر و $p=0/0028$ ، تمرین قبل و حین بارداری: $84/35$ برابر و $p=0/0033$) (شکل ۳) در عضله EDL، بیان mRNA PDK4 به طور معنی داری در گروه تمرین حین بارداری (21 برابر و $p=0/0031$) و گروه قبل و حین بارداری ($7/73$ برابر و $p=0/0089$) در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت، ولی تغییر معنی داری بین گروه تمرین قبل از بارداری و گروه کنترل ($0/61$ برابر و $p=0/086$) مشاهده نشد (شکل ۴).



بحث

این پژوهش نشان داد تمرین هوازی مادری قبل و حین بارداری بیان ژن PDK4 را در دو عضله تند و کند انقباض بازکننده طویل انگشتان پا و نعلی فرزندان نر دوماهه افزایش داد؛ اما تمرین قبل از بارداری فقط موجب افزایش بیان این ژن در عضله کند انقباض نعلی فرزندان شد. در اواخر بارداری مصرف گلوکز رحم تقریباً ۳۰-۵۰٪ از ذخیره گلوکز مادری را تشکیل می دهد که این مقدار به وسیله مجموعه ای از سازگاری های متابولیکی در بافت های مادری حمایت می شود (۱۷). بعلاوه تغییراتی در سوسبترهای موجود در جریان خون زنان بارداری که فعالیت ورزشی می کنند رخ می دهد. سطوح کاهش یافته گلوکز در حین بارداری هیچ منافاتی با مصرف شتاب گرفته گلوکز در حین فعالیت ورزشی ندارد که این ممکن است ناشی از نیازهای بیشتر به ذخیره گلوکز در جریان خون باشد که به وسیله مصرف هم زمان گلوکز توسط جنین در حال رشد و همچنین برداشت بیشتر در عضلات فعال صورت می گیرد (۱۸). در نتیجه غلظت اسیدهای چرب به منظور فراهم کردن انرژی افزایش می یابد (۱۷). با نگاه به این سازگاری ها احتمالاً تفاوت های معناداری در ژن های متابولیکی فرزندان با فعالیت ورزشی مادری و فرزندان بدون فعالیت ورزشی مادری باید وجود داشته باشد.

نتایج ما نشان داد که وزن فرزندان در گروه تمرین ورزشی قبل از بارداری و گروه تمرین ورزشی قبل و حین بارداری به طور معناداری کاهش یافت، اما هیچ تغییری در فرزندان گروه تمرین ورزشی حین بارداری رخ نداد. نشان داده شده است که فعالیت ورزشی مادری درصد توده چربی و وزن فرزندان را کاهش می دهد و در مطالعه دیگر نشان داده شد که وزن هنگام تولد فرزندان را کاهش یافته است (۱۳، ۱۹) و در نتیجه موجب بهبود نیمرخ متابولیکی فرزندان می شود. این نتایج همسو با نتایج ما در گروه های تمرین ورزشی قبل، قبل و حین بارداری هستند. نتایج این پژوهش نشان داد که فعالیت های ورزشی با شدت بیشتر و تعداد تکرارهای بالاتر در دوره بارداری ممکن است منجر به کاهش وزن فرزندان شود (۲۰). در مطالعه حاضر از آنجایی که شدت فعالیت ورزشی مادری در حین بارداری کاهش یافته بود، این احتمال وجود دارد که تغییری در وزن فرزندان گروه تمرین ورزشی حین بارداری ایجاد نشود.

پژوهش های اندکی به بررسی تأثیر تمرین ورزشی مادری قبل، حین و قبل و حین بارداری بر بیان ژن PDK4 در عضلات تند و کند انقباض (بازکننده طویل انگشتان پا و نعلی) فرزندان در دوماهه پرداخته است. وگا و همکاران ۲۰۱۵ نشان دادند که فعالیت ورزشی مادری گلوکز، شاخص HOMA، تری گلیسرید بالا و لپتین فرزندان مادران چاق را کاهش می دهد (۲۱). لاکر و همکاران ۲۰۱۴ نشان دادند که ۶ هفته تمرین ورزشی مادری قبل و حین بارداری از اختلالات متابولیکی ناشی از رژیم غذایی پرچرب مادران در فرزندان جلوگیری کرد و بیان ژن های همچون PGC1- α را افزایش داد و همچنین عملکرد متابولیکی فرزندان را حفظ کرد (۷). از طرف دیگر مویو و همکاران ۲۰۰۷ در نمونه های انسانی و حیوانی نشان دادند که تمرین ورزشی موجب افزایش بیان ژن PDK4 در عضله اسکلتی شده است (۱۲، ۲۲) که با بهبود متابولیسم اکسیداتیو همراه می شود (۲۳). بلیز و همکاران ۲۰۱۵ یافتند که فعالیت ورزشی مادری عملکرد متابولیکی فرزندان را به وسیله افزایش بیان ژن های متابولیکی و کاهش وزن بدن فرزندان بهبود می بخشد (۶). پیلگارد و همکاران ۲۰۰۱ یافتند القا ژن PDK4 به عنوان تنظیم کننده مجموعه پروتئین دئیدروژناز (PDC) منجر به غیرفعال شدن آن و جلوگیری از ورود کربوهیدرات به درون میتوکندری جهت اکسیداسیون می کند؛ که در نتیجه اکسیداسیون اسیدهای چرب را افزایش می دهد و در نهایت به سمت کاهش وزن می رود (۱۱). با توجه به نتایج پژوهش حاضر می توان گفت تمرین ورزشی مادری قبل، حین و قبل و حین بارداری می تواند وزن فرزندان را کاهش دهد و احتمالاً به وسیله افزایش بیان ژن PDK4 موجب بهبود عملکرد متابولیکی شود.

از طرفی نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تمرین ورزشی قبل از بارداری بیان ژن PDK4 را در عضله تند انقباض بازکننده طویل انگشتان پا تغییر نیافته و تنها موجب افزایش بیان آن در عضله کند انقباض نعلی شد. از آنجایی که PDK4 به عنوان یک تنظیم کننده میتوکندریایی شناخته می شود (۱۱) و عضله EDL بیشتر از تارهای نوع II تشکیل شده است (۲۴)، این احتمال وجود دارد که عضله EDL محتوی میتوکندریای کمتری دارد و در نتیجه بیان PDK4 نیز کمتر خواهد بود.

از محدودیت های پژوهش حاضر عدم اجرای فعالیت ورزشی با شدت بالا بود؛ زیرا طبق مطالعات بلیز و همکاران ۲۰۱۵ نشان داده شد که شدت متوسط برای زنان باردار مناسب تر است (۶). از طرفی، با توجه به محدودیت های زمان و امکانات،

پژوهش بر روی نسل دوم انجام نشد؛ بنابراین مطالعات بعدی نیاز دارند تا تغییرات ناشی از تمرین ورزشی مادری را بر روی فرزندان نسل دوم بررسی کنند.

نتیجه‌گیری

در نتیجه، یافته‌های این مطالعه مشخص کرد که تمرین ورزشی مادری منجر به افزایش بیان PDK4 به عنوان یک ژن متابولیکی مهم در عضلات تند و کند انقباض (بازکننده طولیل انگشتان پا و نعلی) فرزندان نر می‌شود. بعلاوه، وزن فرزندان مادرانی که تمرین ورزشی قبل و قبل و حین بارداری داشتند کاهش پیدا می‌کند. به نظر می‌رسد مسیرهای اصلاح نسخه‌برداری متأثر از انواع تمرینات ورزشی می‌توانند بیان ژن‌های متابولیسم عضله اسکلتی را در نسل‌های بعد تحت تأثیر قرار دهد. تغییرات بیان ژن PDK4 در عضله تند و کند نشان داد هر دو عضله علی‌رغم تفاوت‌های متابولیکی تحت تأثیر تمرین هوازی مادری قرار گرفته‌اند. ویژگی‌های متابولیکی عضلات کودکان با ماهیت هوازی احتمالاً می‌تواند اثر تمرین هوازی مادری بر قابلیت‌های هوازی عضلات نسل بعد را تقویت کند. پیشنهاد می‌شود در جهت تأیید تأثیر تمرین مادری بر فرآیندهای پس نسخه‌برداری و نسخه‌برداری ژن‌های متابولیکی عضله اسکلتی پژوهش‌های بیشتری در نسل‌های دوم و سوم موش‌ها صورت گیرد.

References

1. Barres, R., Yan, J., Egan, B., Treebak, J.T., Rasmussen, M., Fritz, T., Caidahl, K., Krook, A., O'Gorman, D.J., Zierath, J.R. (2012). Acute exercise remodels promoter methylation in human skeletal muscle. *Cell Metabolism*. 15(3): 405-411.
2. Araki, M., Nozaki, Y., Motojima, K. (2007). Transcriptional regulation of metabolic switching PDK4 gene under various physiological conditions. *Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*. 127(1): 153-162.
3. Ntanasios-Stathopoulos, J., Tzanninis, J.G., Philippou, A., Koutsilieris, M. (2013). Epigenetic regulation on gene expression induced by physical exercise. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*. 13(2): 133-146.
4. Prather, H., Spitznagle, T., Hunt, D. (2012). Benefits of exercise during pregnancy. *PM&R*. 4(11): 845-850.
5. Knowler, W.C., Barrett-Connor, E., Fowler, S.E., Hamman, R.F., Lachin, J.M., Walker, E.A., Nathan, D.M. (2002). Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *The New England Journal of Medicine*. 346(6): 393-403.
6. Blaize, A.N., Pearson, K.J., Newcomer, S. (2015). Impact of maternal exercise during pregnancy on offspring chronic disease susceptibility. *Exercise and Sport Sciences Reviews*. 43(4): 198-203.
7. Laker, R.C., Lillard, T.S., Okutsu, M., Zhang, M., Hoehn, K.L., Connelly, J.J., Yan, Z. (2014). Exercise prevents maternal high-fat diet-induced hypermethylation of the Pgc-1α gene and age-dependent metabolic dysfunction in the offspring. *Diabetes*. 63(5):1605-1611.
8. Wolfe, L.A., Mottola, M.F. (1993). Aerobic exercise in pregnancy: an update. *Canadian Journal of Applied Physiology*. 18(2): 119-147.
9. Dhasarathy, A., Roemmich, J.N., Claycombe, K.J. (2017). Influence of maternal obesity, diet and exercise on epigenetic regulation of adipocytes. *Molecular Aspects of Medicine*. 54: 37-49. doi:10.1016/j.mam.2016.10.003.

10. Oberg, E. (2007). Physical activity prescription: our best medicine. *Integrative Medicine*. 6(5): 18-22.
11. Pilegaard, H., Neufer, P.D. (2004). Transcriptional regulation of pyruvate dehydrogenase kinase 4 in skeletal muscle during and after exercise. *Proceedings of the Nutrition Society*. 63(2): 221-226.
12. Luginbuhl, A., Dudley, G., Staron, R. (1984). Fiber type changes in rat skeletal muscle after intense interval training. *Histochemistry*. 81(1): 55-58.
13. Stanford, K.I., Lee, M.-Y., Getchell, K.M., So, K., Hirshman, M.F., Goodyear, L.J. (2015). Exercise before and during pregnancy prevents the deleterious effects of maternal high-fat feeding on metabolic health of male offspring. *Diabetes*. 64(2): 427-433.
14. Carter, L.G., Qi, N.R., De Cabo, R., Pearson, K.J. (2013). Maternal exercise improves insulin sensitivity in mature rat offspring. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 45(5): 832-840.
15. Roger, V.L., Go, A.S., Lloyd-Jones, D.M., Adams, R.J., Berry, J.D., Brown, T.M., Carnethon, M.R., Dai, S., De Simone, G., Ford, E.S. (2011). Heart disease and stroke statistics—2011 update. *Circulation*. 123 (4): e18-e209.
16. Hau, J., Schapiro, S.J. (2002). *Handbook of laboratory animal science: essential principles and practices*, CRC Press.
17. Li, G., Wang, J., Ye, J., Zhang, Y., Zhang, Y. (2015). PPAR α protein expression was increased by four weeks of intermittent hypoxic training via AMPK α 2-dependent manner in mouse skeletal muscle. *PLoS one*. 10 (4): e0122593.
18. Burri, L., Thoresen, G.H., Berge, R.K. (2010). The role of PPAR activation in liver and muscle. *PPAR Research*. 2010. doi:10.1155/2010/542359.
19. Raipuria, M., Bahari, H., Morris, M.J. (2015). Effects of maternal diet and exercise during pregnancy on glucose metabolism in skeletal muscle and fat of weanling rats. *PLoS One*. 10(4): e0120980.
20. Oliveira, V., Silva Junior, S.D., de Carvalho, M.H., Akamine, E.H., Michelini, L.C., Franco, M.C. (2017). Intrauterine growth restriction increases circulating mitochondrial DNA and Toll-like receptor 9 expression in adult offspring: could aerobic training counteract these adaptations? *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*. 8(2): 236-243.
21. Vega, C.C., Reyes-Castro, L.A., Bautista, C.J., Larrea, F., Nathanielsz, P.W., Zambrano, E. (2015). Exercise in obese female rats has beneficial effects on maternal and male and female offspring metabolism. *International Journal of Obesity*. 39(4): 712-719.
22. Horowitz, J.F., Leone, T.C., Feng, W., Kelly, D.P., Klein, S. (2000). Effect of endurance training on lipid metabolism in women: a potential role for PPAR α in the metabolic response to training. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*. 279(2): E348-E355.
23. Muoio, D.M., Koves, T.R. (2007). Skeletal muscle adaptation to fatty acid depends on coordinated actions of the PPARs and PGC1 α : implications for metabolic disease. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. 32(5): 874-883
24. Bobinac, D., Malnar-Dragojevic, D., Bajek, S., Soic-Vranic, T., Jerkovic, R. (2000). Muscle fiber type composition and morphometric properties of denervated rat extensor digitorum longus muscle. *Croatian Medical Journal*. 41(3): 294-297.