

## تأثیر تمرین تناوبی پرشدت در موش صحرایی ماده چاق قبل از بارداری بر زمان خستگی، متیلاسیون ژن های PGC-1 $\alpha$ و سارکولپین در عضله دوقلوی زاده های موش

سمانه کنشلو<sup>۱</sup>، مریم نورشاهی<sup>۲</sup>، مهدی هدایتی<sup>۳</sup>، رعنا فیاض میلانی<sup>۴</sup>

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۲. دانشیار فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران\*

۳. دانشیار بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۴. استادیار فیزیولوژی ورزشی دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۸/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۵/۱۳

### چکیده

چاقی و نیاز به کنترل انرژی، درسراسر جهان به عنوان یکی از بزرگترین عوامل در بروز بیماری های مزمن محسوب می شوند و به دلیل انتقال مضرات آن از مادر به فرزند بسیار اهمیت دارند؛ بنابراین، هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی تأثیر تمرین تناوبی پرشدت در موش صحرایی ماده چاق قبل از بارداری بر زمان خستگی، متیلاسیون ژن های Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 $\alpha$ ) و سارکولپین در عضله دوقلوی زاده های موش بود؛ برای این اساس، ۴۰ موش صحرایی سه ماهه ماده نژاد ویستار خریداری شدند و به چهار گروه مساوی تغذیه پرچرب، (گرم  $22 \pm$  ۲۵۰) کنترل (گرم  $30 \pm 170$ )، تمرین + تغذیه پرچرب (گرم  $30 \pm 240$ ) و تمرین (گرم  $33 \pm 190$ ) تقسیم شدند. بعد از انجام شش هفته پروتکل تمرین تناوبی شدید، موش های ماده باردار شدند و پس از تولد نوزادان، آن ها به دو گروه تقسیم شدند. گروه اول برای بررسی متیلاسیون PGC-1 $\alpha$  و سارکولپین، به روش واکنش زنجیره ای پلی مراز اختصاصی تشریح شدند و گروه دوم بعد از دوماه، پروتکل شنا برای سنجش خستگی را انجام دادند. نتایج آزمون آنوای یک طرفه نشان داد که کاهش معناداری ( $P = 0.001$ ) در مقادیر متیلاسیون ژن PGC-1 $\alpha$  و افزایش معناداری ( $P = 0.001$ ) در آزمون سنجش مقاومت به خستگی، بین گروه تمرین با گروه های دیگر و گروه تمرین + تغذیه پرچرب با گروه تغذیه پرچرب وجود داشتند؛ بنابراین، انجام تمرین های تناوبی شدید قبل از بارداری بر متیلاسیون ژن PGC-1 $\alpha$  و عملکرد ورزشی نوزادان موش صحرایی در مقاومت به خستگی نقش دارد. همچنین، تمرین تناوبی شدید می تواند تأثیر ناشی از مصرف غذای پرچرب را کاهش دهد.

**واژگان کلیدی:** سارکولپین، اپی ژنتیک، تمرین تناوبی پرشدت، PGC-1 $\alpha$

## مقدمه

چاقی یک مشکل عمده سلامت است که در جامعه کنونی به شدت در حال افزایش است و با بسیاری از بیماری‌های سندرم متابولیک در ارتباط است (۱) و به دلیل انتقال مضرات آن از مادر به فرزند، بسیار اهمیت دارد (۲)؛ به طوری که میانگین شاخص توده بدنی بالای مادر با چاقی فرزندان در کودکی (۳)، (۴) و بزرگسالی (۵) در ارتباط است و به واسطه فاکتورهای ژنتیکی و محیطی به نوزاد منتقل می‌شود؛ به گونه‌ای که ممکن است یک نسل در معرض واقعه یا رخدادی قرار گیرند و این رخداد در ژن‌های آن نسل نشان‌گذاری شود و همین الگو برای نسل بعد یا بیشتر ادامه یابد؛ به این ترتیب، الگوی بیان ژن تغییر می‌کند؛ بدون اینکه توالی DNA تغییر کند. این فرایند را «اپیژنتیک» می‌نامند (۶). افزایش برخی از فاکتورهای محیطی همچون فعالیت بدنی تغییراتی را روی ژنوم ایجاد می‌کنند که با کنترل وزن و افزایش در بیان ژن‌های کنترل‌کننده متابولیسم همراه است. به همین دلیل، فعالیت بدنی را یکی از فاکتورهای مؤثر در اپیژنتیک می‌دانند (۷).

در عضله اسکلتی، تعادل انرژی و کنترل متابولیسم به تغییرات میتوکندریایی وابسته هستند. تنظیم سوخت‌وساز میتوکندری توسط شبکه‌های رونویسی متعدد کنترل می‌شود. در این میان،  $PGC-1\alpha$  از تنظیم‌کننده‌های اصلی معرفی شده است که از یک سو، در کنترل (تعدیل) محتویات و عملکرد میتوکندری (۸) و از سوی دیگر، در مقاومت عضله نسبت به خستگی نقش مهمی دارد (۹)؛ به طوری که کاهش مقادیر  $PGC-1\alpha$  به افزایش خستگی، کاهش عملکرد و ظرفیت ورزشی منجر می‌شود (۱۰). از طرفی، متیلاسیون  $PGC-1\alpha$  تحت تأثیر شدت فعالیت بدنی است. در این راستا، بارس<sup>۱</sup> و همکاران (۷) نشان دادند که تمرین‌های ورزشی پر شدت با افزایش بیشتر در رهایش کلسیم همراه هستند. افزایش غلظت کلسیم در سلول عضلانی، از یک سو به فعال شدن مسیر سیگنالی بیوزن میتوکندری توسط فاکتورهای رونویسی همچون  $PGC-1\alpha$  منجر می‌شود و از سوی دیگر، با کاهش متیلاسیون ژن‌های متابولیک همراه است (۱۰). یکی از مسیرهای دیگر که باعث افزایش غلظت کلسیمی سیتوپلاسم می‌شود، توسط پروتئین کوچکی به نام سارکولپیین صورت می‌گیرد (۱۱). نقش این دو پروتئین در کنترل متابولیسم، به واسطه تأثیر افزایش غلظت کلسیم سیتوپلاسمی در فعالیت ورزشی است.

سارکولپیین دارای ۳۱ اسیدآمینه است که به سه ناحیه N-ترمینال (هفت اسیدآمینه)، ماریچ آلفا (۱۹ اسیدآمینه) و C-ترمینال (پنج اسیدآمینه) تقسیم می‌شود (۱۲). این پروتئین یک تنظیم‌کننده اصلی در متابولیسم پایه است که بدون کاهش در مصرف آدنوزین تری فسفات توسط سرکا مانع از انتقال کلسیم به داخل شبکه سارکوپلاسمی می‌شود (۱۳). اهمیت سارکولپیین موجود در عضله

1. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha

2. Barres

اسکلتی در کنترل ترموژنز و تنظیم انرژی به گونه‌ای است که آن را «تنظیم‌کننده کلیدی سوخت‌وساز» می‌نامند؛ به طوری که مستقل از چربی قهوه‌ای در تنظیم دمای بدن نقش دارد (۱۴). همچنین، نشان داده شده است که سارکولپین نه تنها از طریق سرکا، بلکه با افزایش آنزیم کارنتین پالمیتیل ترانسفراز، نقش ویژه‌ای را در انتقال اسید چرب به میتوکندری ایفا می‌کند و در فعالیت‌های ورزشی با تنظیم پمپ کلسیم شبکه سارکوپلاسمی<sup>۱</sup> خستگی را به تعویق می‌اندازد (۱۵). از طرفی، PGC-1 $\alpha$  نیز با افزایش تولید میتوکندری در بهبود عملکرد زنجیره تنفسی و کاهش خستگی نقش دارد؛ بنابراین، به نظر می‌رسد که با افزایش این دو پروتئین خستگی ناشی از فعالیت به تعویق افتد (۱۷-۱۵).

به طور کلی، با توجه به مبانی تأثیر تمرین‌های پرشدت بر افزایش رهایش کلسیم و تأثیر این افزایش بر بیان پروتئین‌های مرتبط با سندرم متبولیک همچون PGC-1 $\alpha$  و سارکولپین، فرض پژوهش حاضر این است که الگوی تمرینی پرشدت می‌تواند بر متیلاسیون این پروتئین‌ها و انتقال آن به نسل بعد مؤثر باشد. امروزه، به دلیل اهمیت تأثیر فاکتورهای اپی‌ژنتیک بر فرد، پژوهش‌های بسیاری در این زمینه با صرف هزینه‌های زیاد انجام می‌شوند؛ با وجود این، با توجه به اهمیت انتقال فاکتورهای اپی‌ژنتیک از طریق توارث، پژوهش‌های اندکی در زمینه تأثیر فعالیت بدنی مادر بر متیلاسیون DNA و بیان ژن‌های مرتبط با کنترل متابولیسم همچون PGC-1 $\alpha$  و سارکولپین در نوزادان انجام شده‌اند. از طرفی، میانگین شاخص توده بدنی قبل از بارداری نشان‌دهنده روند روبه‌رشد اضافه‌وزن در مادران باردار است (۱۸). همچنین، با توجه به اهمیت پروتئین سارکولپین در کنترل وزن و کشف جدید آن، پژوهش‌های ورزشی کمتری در این زمینه مشاهده می‌شوند؛ بنابراین، هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی تأثیر تمرین تناوبی پرشدت در موش ماده چاق قبل از بارداری، بر زمان خستگی، متیلاسیون ژن‌های PGC-1 $\alpha$  و سارکولپین در زاده‌های موش است.

## روش پژوهش

در این پژوهش، ابتدا ۴۰ موش صحرائی سه‌ماهه ماده نژاد ویستار از انیستیتوی پاستور خریداری شدند و به خانه حیوانات دانشگاه بهشتی انتقال داده شدند. سن سه ماه برای سن بلوغ و زمان باروری موش‌های ماده در نظر گرفته شد (۱۹). سپس، آن‌ها به چهار گروه تغذیه پرچرب، (گرم  $22 \pm 250$ ) کنترل (گرم  $30 \pm 170$ )، تمرین + تغذیه پرچرب (گرم  $30 \pm 240$ ) و تمرین (گرم  $33 \pm 190$ ) تقسیم شدند. تعداد نمونه‌ها در هر گروه ۱۰ تا بود. گروه‌های حاوی غذای پرچرب برای افزایش وزن، به مدت دو ماه قبل از شروع پروتکل تمرین، به صورت دسترسی آزاد غذا حیوانات از رژیم غذایی در

جدول شماره یک استفاده کردند. رژیم غذایی گروه پرچرب بر مبنای فرمول تهیه رژیم غذایی پرچرب (۶۰ درصد کالری از چربی)، ساخت کمپانی Research Dite تولید کشور آمریکا<sup>۱</sup> تهیه شد. در پژوهش‌های بسیاری، تأثیر این محصول بر افزایش وزن و چاقی تأیید شده است (۲۰، ۲۱). همچنین، ۱۶ موش نر سه‌ماهه با وزن نرمال و همسان برای جفت‌گیری تهیه شدند.

جدول ۱- محتویات غذای پرچرب

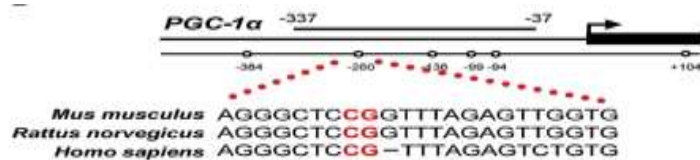
محصول	گرم	کیلوکالری %
پروتئین	۲۶/۲	۲۰
کربوهیدرات	۲۶/۳	۲۰
چربی	۳۴/۹	۶۰
مجموع	-	۱۰۰
کیلوکالری/گرم	۵/۲۴	-
اجزای ترکیبی	گرم	کیلوکالری
کازئین	۲۰۰	۸۰۰
ال-سیستین	۳	۱۲
نشاسته ذرت	۰	۰
مالتودکسترین ۱۰	۱۲۵	۵۰۰
ساکاروز	۶۸/۸	۲۷۵/۲
سلولز BW200	۵۰	۰
روغن سویا	۲۵	۲۲۵
چربی حیوانی	۲۴۵	۲۲۰/۵
ترکیبات معدنی	۱۰	۰
S10026	۱۳	۰
دی‌کلسیم فسفات	۵/۵	۰
کلسیم کربنات	۱۶/۵	۰
پتاسیم سترات	۱۰	۴۰
ترکیبات ویتامینی	۲	۰
کولین بیتارات	۰/۰۵	۰
مجموع	۷۷۳/۸۵	۴۰۵۷

1. HFD; 60% energy from fat, D12492; Research Diets, New Brunswick, NJ, USA

شش هفته پروتکل تمرین تناوبی شدید شامل سه روز در هفته تمرین اینتروال شدید بود (۲۲) که براساس این پروتکل، شدت حداکثر اکسیژن مصرفی موش‌ها ۸۵ تا ۹۰ درصد بود (۲۳). سرعت آزمودنی‌ها روی تردمیل، ۴۰ متر در دقیقه و تعداد اینتروال‌ها در هفته اول، دو و در پایان هفته ششم، به شش رسید. فاصله استراحت بین ست‌ها یک دقیقه و با سرعت ۱۶ متر در دقیقه بود و در طی یک هفته آشناسازی، سرعت ۱۰ متر در دقیقه بود (۲۲). موش‌های گروه تمرین از سه‌ماهگی به مدت شش هفته تمرین تناوبی انجام دادند و در چهارونیم‌ماهگی با موش نر بالغ جفت‌گیری کردند (تشخیص جفت‌گیری از طریق مشاهده پلاک واژنی تعیین می‌شود). موش‌های گروه کنترل هیچ‌گونه فعالیتی نداشتند و در چهارونیم‌ماهگی با موش نر بالغ جفت‌گیری کردند. سپس، نوزادان هر چهار گروه به دو قسمت تقسیم شدند: یک قسمت بعد از تولد تشریح شدند و متیلاسیون ژن‌های PGC-1 $\alpha$  و سارکولپین در عضله دوقلوی آن‌ها بررسی شد؛ قسمت دوم، برای انجام پروتکل مقاومت به خستگی، تا دو ماهگی در شرایطی یکسان نگهداری شدند. همه مراحل پژوهش زیر نظر کمیته اخلاق پژوهشگاه با کد IR.SSRI.REC.1397.279 انجام گرفت.

برای بررسی متیلاسیون در ژن PGC-1 $\alpha$  در ناحیه ۲۶۰-CPG، از DNA موجود در نمونه بافتی عضله دوقلو (۲۴) استفاده شد (شکل شماره یک). DNA نمونه‌ها به کمک کیت استخراج DNA کمپانی کیاژن، استخراج شد.

به‌طور خلاصه، مطابق دستورالعمل مربوط به بافت حیوانی در صفحه‌های ۲۸ تا ۳۰ بروشور کیت، میزان دو میلی‌گرم بافت در میکروتیوب ۲/۵ میلی‌لیتری منتقل شد و میزان ۱۸۰ میکرولیتر بافر اول به آن افزوده شد. پس از افزودن ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز کا، میکروتیوب به مدت سه ساعت در دمای ۵۶ درجه برای لیز کامل بافت انکوبه شد. سپس، ۲۰۰ میکرولیتر بافر دوم و ۲۰۰ میکرولیتر اتانل مطلق به نمونه لیز شده اضافه شد. به کمک پیپت، نمونه ذکر شده به ستون‌های مینی موجود در کیت (فاقد دی. ان. آژ.) اضافه شد. محلول عبور کرده از ستون به مدت یک دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس، به ستون ۵۰۰ میکرولیتر بافر افزوده شد و مرحله سانتریفیوژ به مدت سه دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه تکرار شد. از بافر سوم ۲۰۰ میکرولیتر به ستون ذکر شده افزوده شد و یک دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. طی این مراحل، DNA از بافت حیوانی ذکر شده با راندمان بالا استخراج شد.



شکل ۱- بررسی متیلاسیون در ناحیه CPG-260

پس از استخراج DNA، برای ارزیابی کمیت و کیفیت DNA، جذب نوری نمونه‌ها با اسپکتروفتومتر در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر خوانده شد. غلظت مناسب برای نمونه‌های DNA در این مطالعه، ۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر محاسبه شد.

سپس وضعیت متیلاسیون جزایر CpG در نواحی مورد بررسی ژن PGC-1α، با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز اختصاصی متیلاسیون انجام شد. در این روش، ابتدا DNA به وسیله بی‌سولفیت سدیم تیمار شد. به این ترتیب، سیتوزین‌های غیرمتیله به اوراسیل تبدیل شدند؛ ولی سیتوزین‌های متیله شده موقعیت پنج تحت‌تأثیر این واکنش قرار نگرفتند و در واقع، دست‌نخورده باقی ماندند. در این روش، از دو جفت پرایمر اختصاصی توالی‌های هدف در حالت سیتوزین‌های متیله و غیرمتیله استفاده شد. واکنش PCR جداگانه‌ای برای هر دو حالت انجام شد. سپس، پرایمرهای اختصاصی به توالی هدف متصل شدند و محصول PCR تولید شد.

مراحل تیمار DNA با بی‌سولفیت سدیم: برای بررسی متیلاسیون DNA، بی‌سولفیت‌کردن نمونه‌های DNA طبق پروتکل کیت اپی‌تک فست بی‌سولفیت با کد ۵۹۸۲۴، با شرایط دمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد، زمان پنج دقیقه، دمای انکوباسیون ۶۰ درجه سانتی‌گراد و زمان ۱۰ دقیقه برای دوسیکل انجام شد. سپس، DNA بی‌سولفیت‌شده توسط کیت ذکر شده خالص‌سازی شد. یک جفت پرایمر برای تکثیر DNA غیرمتیله و یک جفت پرایمر برای تکثیر DNA متیله طراحی شدند (شکل‌های شماره دو، شماره سه، شماره چهار و شماره پنج). واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با استفاده از کیت پلاس هات استار تگ<sup>۱</sup> و مقادیر ۱۰ میکرولیتر مستر میکس، ۰/۰۵ میکرومول از هر پرایمر، CoralLoad به میزان دو میکرولیتر، DNA به میزان ۵۰ نانوگرم و آب فاقد تجزیه RNA به میزان شش میکرولیتر انجام شد. شرایط PCR نیز شامل دمای واسرشت شدن اولیه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد و زمان پنج دقیقه، دمای واسرشت شدن، ۹۴ درجه سانتی‌گراد و زمان یک دقیقه، دمای اتصال پرایمرها، ۵۷ درجه سانتی‌گراد و زمان یک دقیقه، دمای تکثیر، ۷۲ درجه سانتی‌گراد و زمان یک دقیقه، دمای

تکثیر نهایی، ۷۲ درجه سانتی‌گراد و زمان ۱۰ دقیقه و تعداد سیکل‌های ۳۰ عدد بودند. سپس، محصولات PCR روی ژل آگارز الکتروفورز شدند و به وسیله سیف استین<sup>۱</sup> رنگ‌آمیزی شدند.

جدول ۲- توالی پرایمرهای متیله و غیرمتیله برای ژن **PGC-1 $\alpha$** 

Amplicon size (Un methylated): 234bp	Amplicon size (methylated): 171bp
Forward primer: GAGTTATTATATGACCAGGGCTCCG (Tm: 61.8, 25bp)	Forward primer: TTGAGTTATTATATGATTAGGGTTTC G (Tm: 60, 27bp)
Reverse primer: TAAAAAGTAGGCTGGGCTGTCACCTC (Tm: 62.7, 25bp)	Reverse primer: CACTCCGAAACAACCCTCTACCTCAA (Tm: 58, 23bp)
UCSC In-Silico PCR >chr14:63095478+63095720 243bp GAGTTATTATATGACCAGGGCTCCG TAAAAAGTAGGCTGGGCTGTCACCTC GAGTTATTATATGACCAGGGCTCCGgtttagagtgtggcattcaaaagc tggcttagtcacagtgtgatgctgaagcctccaaagccaagtgtt cctttcttctctattttttctctcttaagcgttacttactgagg cagagggctgcctcggagtgcagtcaggagttgagcagcaagctgcaca ggagaaggaggctgggtGAGTGACAGCCCAGCCTACTTTTA	

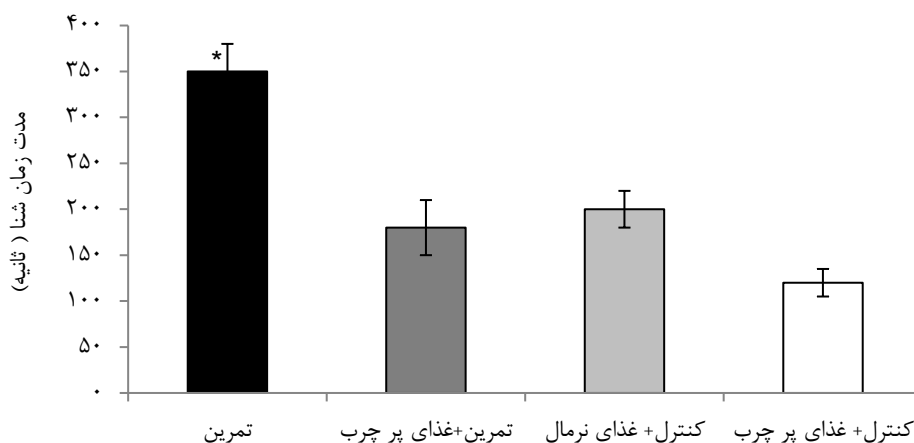
جدول ۳- توالی پرایمرهای متیله و غیرمتیله برای ژن سارکولپین

Amplicon size (Un methylated): 257bp	Amplicon size (methylated): 177 bp
Forward primer: TATTAGCTTACTGACCTCTTGGACG (Tm; 59,25bp)	Forward primer: TTATATTAGTTTATTGATTTTTTGGAC G (Tm: 56, 28bp)
Reverse Primer: AGGACTTCTGAGTGCACACCAAG (Tm: 61.5,23bp)	Reverse Primer: ATTCCTAAAAAATATTAATCTCTCT TC (Tm: 55, 29bp)
UCSC In-Silico PCR >chr8:58435168+58435424 257bp TATTAGCTTACTGACCTCTTGGACG AGGACTTCTGAGTGCACACCAAG TATTAGCTTACTGACCTCTTGGACGatcctatctccaaaccagtcatat tcttagacattgggatcaaggttcaatgataagttggaggaaaggt tgggaagtcagcacaagctctctctccataatttctatttcttg aagagagacttaacatctccaggaacattcacctatctctcatgctatc tctctgttagacgtgaagacgagccaggtcCTTGGTGTGCACTCAG AAGTCCT	

پروتکل انجام آزمون مقاومت به خستگی در نوزادان دوماهه بدین صورت بود که نوزادان دوماهه بعد از سه جلسه آشناسازی با تانک آب (استخر موش)، درون حوضچه آب با دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد با مقاومت (آویختن وزنه‌هایی به دم آزمودنی‌ها که ۱۳ درصد از وزن بدن آن‌ها بود)، شنا کردند. پروتکل به صورت وامانده‌ساز طراحی شد. در صورتی که حیوان قادر نبود در سطح آب باقی بماند و به مدت ۱۰ ثانیه در حالت غوطه‌ور (غرق شدن) در آب می‌ماند، یعنی به ناتوانی رسیده است و از آب خارج می‌شد. سنجش خستگی در این پروتکل بدین صورت بود که زمان فرارگرفتن موش در آب تا رسیدن به واماندگی ثبت شد و بین چهار گروه بررسی شد (۲۵).

## نتایج

نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه برای سنجش آزمون خستگی نشان داد که تفاوت معناداری بین گروه‌ها با یکدیگر وجود دارد ( $F_{3,36} = 721.56$ ،  $P = 0.001$ ). برای بررسی این تفاوت‌ها از آزمون تعقیبی بونفرونی<sup>۱</sup> استفاده شد. نتایج نشان داد که مدت زمان رسیدن به خستگی در گروه تمرین به طور معناداری ( $P = 0.001$ ) بیشتر از سایر گروه‌ها است. همچنین، کاهش معناداری ( $P = 0.001$ ) در مدت زمان رسیدن به خستگی در گروه‌های تمرین + غذای پرچرب و کنترل پرچرب نسبت به گروه کنترل نرمال وجود دارد (شکل شماره دو)؛ هرچند در گروه تمرین + غذای پرچرب نسبت به کنترل پرچرب، زمان رسیدن به خستگی به طور معناداری افزایش یافت ( $P = 0.001$ ).



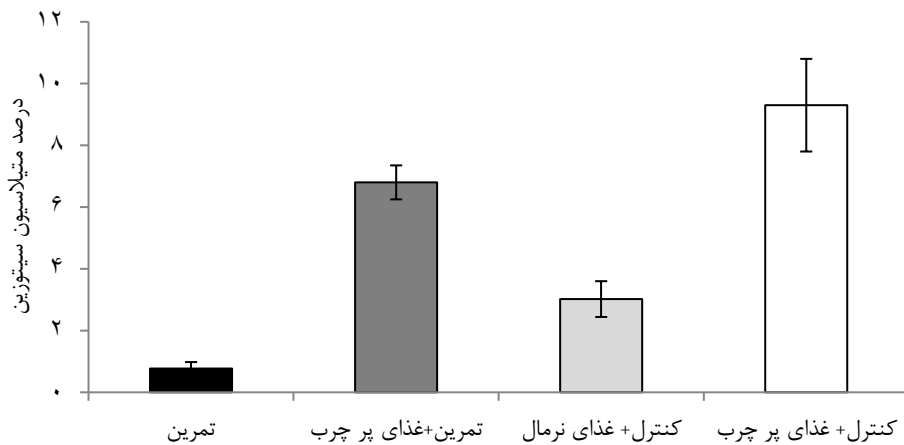
شکل ۲- مدت زمان رسیدن به خستگی در آزمون شنا بین چهار گروه

\* تفاوت معنادار بین گروه تمرین با گروه‌های دیگر ( $P < 0.05$ )

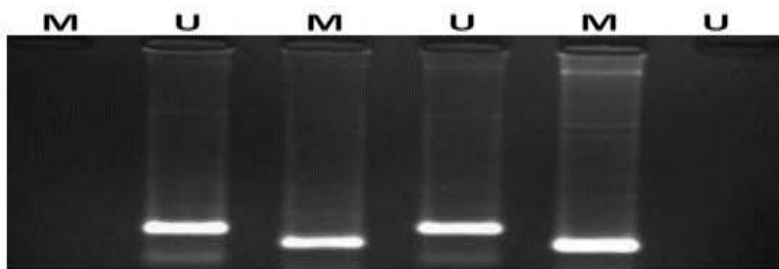
1. Bonferroni



همچنین، نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان داد که تفاوت معناداری ( $F_{3,36} = 213.67$ )،  $P = 0.000$ ) در متیلاسیون ژن PGC-1 $\alpha$  بین گروه‌ها وجود دارد. برای بررسی این تفاوت از آزمون بونفرونی استفاده شد. نتایج این آزمون نشان داد که تفاوت معناداری بین همه گروه‌ها با یکدیگر وجود دارد ( $P = 0.001$ ) (شکل‌های شماره سه و شماره چهار). نتایج این پژوهش نشان داد که کاهش معناداری در متیلاسیون PGC-1 $\alpha$  در گروه تمرین نسبت به کنترل وجود دارد ( $P = 0.001$ ). همچنین، متیلاسیون PGC-1 $\alpha$  در گروه‌های تمرین + غذای پرچرب و کنترل پرچرب نسبت به گروه کنترل، افزایش معناداری را نشان می‌دهد ( $P = 0.001$ )؛ هرچند افزایش متیلاسیون در گروه کنترل پرچرب نسبت به گروه تمرین + غذای پرچرب به‌طور معناداری بیشتر است ( $P = 0.000$ ).



شکل ۳- آنالیز متیلاسیون پروموتور PGC-1 $\alpha$  توسط توالی بی‌سولفیت (درصد سیتوزین‌های متیله \* تفاوت معنادار بین گروه تمرین با گروه‌های دیگر ( $P < 0.05$ ))



شکل ۴- نتایج حاصل از بررسی وضعیت متیلاسیون ژن PGC-1 $\alpha$  به روش MSP  
M (وضعیت‌های متیله) U (وضعیت‌های غیرمتیله)

در انجام پژوهش حاضر، مراحل متیلاسیون ژن سارکولیپین بادقت در پژوهشگاه غدد و متابولیسم انجام شدند؛ باوجوداین، داده‌ای به‌دست نیامد. به‌نظر می‌رسد که علت اصلی این مسئله در طراحی پرایمر باشد. با توجه به اینکه مقالات بسیار اندکی در این زمینه انجام شده‌اند و توالی پرایمرهای ذکر شده گزارش نشده است، باوجود طراحی‌های متعددی که متخصص ژنتیک انجام داد، تکثیر ژن سارکولیپین با مشکل مواجه شد؛ به‌گونه‌ای که باندهای روی ژل تشکیل نشد.

### بحث و نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تمرین مادر قبل از بارداری بر کاهش متیلاسیون ژن PGC-1 $\alpha$  تأثیری معنادار دارد. همچنین، تمرین تناوبی پرشدت می‌تواند تأثیرات مصرف غذای پرچرب بر افزایش متیلاسیون ژن PGC-1 $\alpha$  را تا حدودی تعدیل کند. نتایج این پژوهش موافق با مطالعات لاکر<sup>۱</sup> (۲۶)، شلدون<sup>۲</sup> (۲۷) و استنفورد<sup>۳</sup> (۲۸) بود. لاکر در پژوهش خود از پروتکل تمرینی چرخ گردان استفاده کرده بود؛ اما در این پژوهش از تمرین به‌عنوان یک مداخله قوی در کنترل تغذیه پرچرب بر متیلاسیون ژن PGC-1 $\alpha$  در نوزادان یاد کرد (۲۶). شلدون نیز نشان داد که تمرین مادر در بارداری می‌تواند تأثیرات غذای پرچرب در نوزادان را به‌واسطه افزایش فاکتورهای مرتبط با بیوژنز میتوکندی همچون PGC-1 $\alpha$  کنترل کند (۲۷). پژوهشی در زمینه تأثیر تمرین مادر قبل از بارداری و تأثیرنداشتن آن بر PGC-1 $\alpha$  مشاهده نشده است؛ هرچند وگا<sup>۴</sup> (۲۹) نشان داد که تمرین مادر قبل و در دوران بارداری اثرهایی مفید بر متابولیسم و غدد درون‌ریز در مادران و فرزندان دارد. همچنین، باوجود انجام تمرین در قبل از بارداری، تغییری در وزن مادران و فرزندان آنها مشاهده نشد که این نبود تغییر نشان‌دهنده اهمیت تأثیر تمرین بر ترکیب بدن به‌جای وزن در ارزیابی وضعیت متابولیک است. در پژوهش حاضر نیز مشاهده شد که در زمان تشریح، وزن عضلات در موش‌های تمرین‌کرده بیشتر از موش‌هایی بود که در گروه تغذیه پرچرب قرار داشتند. به‌طور کلی، مصرف غذای پرچرب رابطه‌ای مستقیم با افزایش متیلاسیون ژن‌های کنترل‌کننده متابولیسم همچون PGC-1 $\alpha$  دارد (۲۹). در شدت‌های بالای تمرین همچون تمرین‌های تناوبی پرشدت، مقادیر ریزش کلسیم طی انقباض عضلانی افزایش می‌یابد و به‌دنبال آن، به افزایش تولید PGC-1 $\alpha$  و سیگنال‌های مسیر آن همچون AMPK<sup>۵</sup> و MAPK<sup>۶</sup> منجر

- 
1. Laker
  2. Sheldon
  3. Stanford
  4. Vega
  5. AMP-Activated Protein Kinase
  6. Mitogen-Activated Protein Kinase

می‌شود (۳۰). از طرفی، یکی از متابولیت‌های مهم که بعد از انجام تمرین‌های پرشدت افزایش پیدا می‌کند، مقادیر لاکتات است. لاکتات نیز یکی از مسیرهای اصلی در تولید PGC-1 $\alpha$  است (۲۹)؛ بنابراین، در این پژوهش، تمرین‌های پرشدت مادر با توجه به مکانیسم‌هایی سلولی که بیان شدند، توانسته‌اند بر متیلاسیون ژن PGC-1 $\alpha$  در نوزادان مؤثر باشند.

علاوه‌براین، در گروه‌های پرچرب که تمرین نداشته‌اند، متیلاسیون PGC-1 $\alpha$  افزایش یافته بود؛ بنابراین، با توجه به همبستگی منفی بین متیلاسیون و بیان ژن PGC-1 $\alpha$  (۳۱)، احتمالاً این امر موجب کاهش بیان ژن PGC-1 $\alpha$  در پژوهش حاضر می‌شود. در این راستا، برونگاسر<sup>۱</sup> (۳۲) نشان داد که فرزندان متولدشده از مادران چاق با کاهش مقدار PGC-1 $\alpha$  مواجه هستند و این کاهش به اختلال در عملکرد میتوکندری و در ادامه، به کاهش اکسیداسیون اسیدهای چرب و افزایش چاقی در نوزادان منجر می‌شود. همچنین، هاستی<sup>۲</sup> (۳۳) به مقایسه محتویات میتوکندری جفت، در مادران دارای اضافه‌وزن و مادران با وزن نرمال پرداخت. نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم‌های زنجیره تنفسی میتوکندری در جفت مادران دارای اضافه‌وزن نسبت به جفت مادران با وزن نرمال، کاهش معناداری نشان داده است که این فرایند احتمالاً موجب اختلال در رشد و احتمالاً چاقی در نوزاد خواهد شد. در این راستا، فانتی<sup>۳</sup> (۳۴) نشان داد که از مادران چاق، نوزادانی چاق و مبتلا به بیماری‌های متابولیک متولد خواهند شد؛ بنابراین، به نظر می‌رسد که مطابق با پژوهش حاضر، مصرف غذای پرچرب و به دنبال آن چاقی در مادران به دلیل افزایش متیلاسیون ژن PGC-1 $\alpha$  در جنین، به تولد نوزادانی مستعد بیماری‌های سندرم متابولیک منجر می‌شود.

همچنین، نتایج این پژوهش نشان داد که انجام تمرین‌های پرشدت مادر قبل از بارداری بر زمان رسیدن خستگی نوزادان در حین فعالیت ورزشی شنا مؤثر است. نوزادانی که از مادران تمرین‌کرده متولد شده بودند، زمان رسیدن به خستگی آن‌ها بیشتر از سایر گروه‌ها بود. همچنین، انجام تمرین پرشدت مادر قبل از بارداری توانسته بود، تأثیرات ناشی از تغذیه پرچرب را کاهش دهد. در زمینه تأثیر تمرین تناوبی پرشدت مادر قبل از بارداری بر عملکرد ورزشی نوزادان متولدشده از آن‌ها، پژوهشی مشاهده نشد؛ با وجود این، پروتکل شنا در پژوهش حاضر براساس پژوهش‌های لیما<sup>۴</sup> و همکاران (۲۵) و آرجو<sup>۵</sup> و همکاران (۳۵) براساس سنجش خستگی با تأکید بر مقادیر لاکتات طراحی شد. با توجه به اینکه مقادیر لاکتات با تمرین‌های پرشدت تناوبی افزایش پیدا می‌کنند و این افزایش موجب افزایش

- 
1. Borengasser
  2. Hastie
  3. Fante
  4. Lima
  5. Araujo

مقادیر PGC-1 $\alpha$  می‌شود، به‌نظر می‌رسد که انجام تمرین‌های پرشدت مادر قبل از بارداری با بهبود این مسیرها به افزایش زمان رسیدن به خستگی در نوزادان منجر شده باشد. تمرین‌های پرشدت از مسیرهای متفاوتی می‌توانند در بهبود خستگی مؤثر باشند. بوچرا<sup>۱</sup> در مقاله مروری خود به بررسی تأثیرات تمرین تناوبی پرشدت بر کنترل وزن پرداخت. نتایج پژوهش وی نشان داد که این الگوی تمرین در کنترل چاقی، بهبود حساسیت انسولین، ظرفیت بی‌هوازی و هوازی مؤثر است (۳۶) همچنین، شواهدی وجود دارند که نشان می‌دهند تمرین‌های پرشدت تناوبی این تأثیر را از طریق افزایش مقادیر PGC-1 $\alpha$  اعمال می‌کنند (۳۷).

**پیام مقاله:** به‌طور کلی، سبک زندگی ناسالم همچون مصرف غذای پرچرب و فقدان فعالیت بدنی پیش از بارداری می‌توانند در افزایش فاکتورهای مرتبط با سندم متابولیک همچون افزایش متیلاسیون PGC-1 $\alpha$  در نوزادان موش صحرایی مؤثر باشند؛ باین‌حال، انجام تمرین تناوبی پرشدت به‌دلیل کسب مزایای فیزیولوژیک زیاد در مادر، توانسته است در بهبود این شرایط و حتی عملکرد ورزشی نوزادان (به‌تأخیرانداختن زمان رسیدن به خستگی) مؤثر باشد. در این پژوهش، به بررسی متیلاسیون ژن سارکولپین نیز پرداخته شد؛ ولی با توجه به تلاش‌های یک‌ساله برای مشاهده این متیلاسیون و طراحی پرایمرهای مختلف، با توجه به اینکه این پروتئین به‌تازگی کشف شده است و هیچ پژوهش آزمایشگاهی در زمینه متیلاسیون سارکولپین انجام نشده است، داده‌ای در این زمینه به‌دست نیامد؛ بنابراین، پیشنهاد می‌شود که در سال‌های آینده پژوهش‌هایی روی این پروتئین کلیدی که از آن به‌عنوان کنترل‌کننده متابولیسم یاد می‌شود، انجام شوند.

## تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از رساله دکتری در دانشگاه شهید بهشتی است. بدین‌وسیله از پژوهشگاه غدد و متابولیسم ایران و بخش ژنتیک این پژوهشگاه کمال تشکر و قدردانی دارم.

## منابع

1. Adair LS, Fall CH, Osmond C, Stein AD, Martorell R, Ramirez-Zea M, et al. Associations of linear growth and relative weight gain during early life with adult health and human capital in countries of low and middle income: findings from five birth cohort studies. *Lancet*. 2013;382(9891):525-34.
2. Cedergren M, Brynhildsen J, Josefsson A, Sydsjo A, Sydsjo G. Hyperemesis gravidarum that requires hospitalization and the use of antiemetic drugs in relation to

- maternal body composition. *Am J Obstet Gynecol*. 2008 Apr;198(4):412.e1-5. doi: 10.1016/j.ajog.2007.09.029. Epub 2008 Jan 25
3. Mesman I, Roseboom TJ, Bonsel GJ, Gemke RJ, van der Wal MF, Vrijkotte TG. Maternal pre-pregnancy body mass index explains infant's weight and BMI at 14 months: results from a multi-ethnic birth cohort study. *Arch Dis Child*. 2009 Aug;94(8):587-95. doi: 10.1136/adc.2008.137737. Epub 2009 Mar 29.
  4. Whitaker RC. Predicting preschooler obesity at birth: the role of maternal obesity in early pregnancy. *Pediatrics*. 2004;114(1):29-36.
  5. Tequeanes ALL, Gigante DP, Assunção MCF, Chica DAG, Horta BL. Maternal anthropometry is associated with the body mass index and waist: height ratio of offspring at 23 years of age. *J Nutr*. 2009;139(4):750-4.
  6. Laker RC, Lillard TS, Okutsu M, Zhang M, Hoehn KL, Connelly JJ, et al. Exercise prevents maternal high-fat diet-induced hypermethylation of the Pgc-1alpha gene and age-dependent metabolic dysfunction in the offspring. *Diabetes*. 2014;63(5):1605-11.
  7. Barres R, Yan J, Egan B, Treebak JT, Rasmussen M, Fritz T, et al. Acute exercise remodels promoter methylation in human skeletal muscle. *Cell Metab*. 2012;15(3):405-11.
  8. Scarpulla RC. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813(7):1269-78.
  9. Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang C-Y, Wu Z, Boss O, et al. Transcriptional co-activator PGC-1 $\alpha$  drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature*. 2002;418(6899):797.
  10. Leone TC, Lehman JJ, Finck BN, Schaeffer PJ, Wende AR, Boudina S, et al. PGC-1 $\alpha$  deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS biology*. 2005;3(4):101.
  11. Odermatt A, Becker S, Khanna VK, Kurzydowski K, Leisner E, Pette D, et al. Sarcoplipin regulates the activity of SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *J Biol Chem*. 1998;273(20):12360-9.
  12. Odermatt A, Taschner PE, Scherer SW, Beatty B, Khanna VK, Cornblath DR, et al. Characterization of the gene encoding human sarcolipin (SLN), (a proteolipid associated with SERCA1: absence of structural mutations in five patients with Brody disease. *Genomics*. 1997;45(3):541-53.
  13. Maurya SK, Bal NC, Sopariwala DH, Pant M, Rowland LA, Shaikh SA, et al. Sarcoplipin Is a Key Determinant of the Basal Metabolic Rate, and Its Overexpression Enhances Energy Expenditure and Resistance against Diet-induced Obesity. *J Biol Chem*. 2015;290(17):10840-9.
  14. Smith WS, Broadbridge R, East JM, Lee AG. Sarcoplipin uncouples hydrolysis of ATP from accumulation of Ca<sup>2+</sup> by the Ca<sup>2+</sup>-ATPase of skeletal-muscle sarcoplasmic reticulum. *Biochem J*. 2002;361(Pt 2):277-86.
  15. Sopariwala DH, Pant M, Shaikh SA, Goonasekera SA, Molckentin JD, Weisleder N, et al. Sarcoplipin overexpression improves muscle energetics and reduces fatigue. *J Appl Physiol*. 2015;118(8):1050-8.

16. Bruton JD, Aydin J, Yamada T, Shabalina IG, Ivarsson N, Zhang SJ, et al. Increased fatigue resistance linked to Ca<sup>2+</sup>-stimulated mitochondrial biogenesis in muscle fibres of cold-acclimated mice. *J Physiol*. 2010;588(21):4275-88.
17. Calvo JA, Daniels TG, Wang X, Paul A, Lin J, Spiegelman BM, et al. Muscle-specific expression of PPAR $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  improves exercise performance and increases peak oxygen uptake. *J Appl Physiol*. 2008;104(5):1304-12.
18. Castillo H, Santos IS, Matijasevich A. Relationship between maternal pre-pregnancy body mass index, gestational weight gain and childhood fatness at 6-7 years by air displacement plethysmography. *Matern Child Nutr*. 2015;11(4):606-17.
19. King HD. The relation of age to fertility in the rat. *The Anatomical Record*. 1916;11(5):269-87.
20. Hao Y-R, Tang F-J, Zhang X, Wang H. Suppression of NF- $\kappa$ B activation by PDLIM2 restrains hepatic lipogenesis and inflammation in high fat diet induced mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;503(2):564-71.
21. Zou T, Wang B, Yang Q, de Avila JM, Zhu M-J, You J, et al. Raspberry promotes brown and beige adipocyte development in mice fed high-fat diet through activation of AMP-activated protein kinase (AMPK)  $\alpha$ 1. *J Nutr Biochem*. 2018;55:157-64.
22. Afzalpour ME, Chadorneshin HT, Foadoddini M, Eivari HA. Comparing interval and continuous exercise training regimens on neurotrophic factors in rat brain. *Physiol Behav*. 2015;147:78-83.
23. Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen Ø. 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. Barres R, Osler ME, Yan J, Rune A, Fritz T, Caidahl K, et al. Non-CpG methylation of the PGC-1 $\alpha$  promoter through DNMT3B controls mitochondrial density. *Cell Metab*. 2009;10(3):189-98.
25. Lima F, Stamm D, Della Pace I, Ribeiro L, Rambo L, Bresciani G, et al. Ibuprofen intake increases exercise time to exhaustion: A possible role for preventing exercise-induced fatigue. *Scand J Med Sci Sports*. 2016;26(10):1160-70.
26. Laker RC, Lillard TS, Okutsu M, Zhang M, Hoehn KL, Connelly JJ, et al. Exercise prevents maternal high-fat diet-induced hypermethylation of the Pgc-1 $\alpha$  gene and age-dependent metabolic dysfunction in the offspring. *Diabetes*. 2014;DB\_131614.
27. Sheldon RD, Blaize AN, Fletcher JA, Pearson KJ, Donkin SS, Newcomer SC, et al. Gestational exercise protects adult male offspring from high-fat diet-induced hepatic steatosis. *J Hepatol*. 2016;64(1):171-8.
28. Stanford KI, Lee M-Y, Getchell KM, So K, Hirshman MF, Goodyear LJ. Exercise before and during pregnancy prevents the deleterious effects of maternal high-fat feeding on metabolic health of male offspring. *Diabetes*. 2014;DB\_131848.
29. Vega CC, Reyes-Castro LA, Bautista CJ, Larrea F, Nathanielsz PW, Zambrano E. Exercise in obese female rats has beneficial effects on maternal and male and female offspring metabolism. *Int J Obes (Lond)*. 2015;39(4):712.
30. Gibala M. Molecular responses to high-intensity interval exercise. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. 2009;34(3):428-32.

31. Nitert MD, Dayeh T, Volkov P, Elgzyri T, Hall E, Nilsson E, et al. Impact of an exercise intervention on DNA methylation in skeletal muscle from first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2012;61(12):3322-32.
32. Borengasser SJ, Lau F, Kang P, Blackburn ML, Ronis MJ, Badger TM, et al. Maternal obesity during gestation impairs fatty acid oxidation and mitochondrial SIRT3 expression in rat offspring at weaning. *PloS one*. 2011;6(8):24068.
33. Hastie R, Lappas M. The effect of pre-existing maternal obesity and diabetes on placental mitochondrial content and electron transport chain activity. *Placenta*. 2014;35(9):673-83.
34. De Fante T, Simino LA, Reginato A, Payolla TB, Vitoréli DCG, de Souza M, et al. Diet-induced maternal obesity alters insulin signalling in male mice offspring rechallenged with a high-fat diet in adulthood. *PloS one*. 2016;11(8):0160184.
35. De Araujo GG, Papoti M, de Barros Manchado F, de Mello MAR, Gobatto CA. Protocols for hyperlactatemia induction in the lactate minimum test adapted to swimming rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2007;148(4):888-92.
36. Boutcher SH. High-intensity intermittent exercise and fat loss. *J Obes*. 2011;2011:868305.161-10
37. Little JP, Safdar A, Cermak N, Tarnopolsky MA, Gibala MJ. Acute endurance exercise increases the nuclear abundance of PGC-1alpha in trained human skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;298(4):912-7.

## ارجاع دهی

کنشلو سمانه، نورشاهی مریم، هدایتی مهدی، فیاض میلانی رضا. تأثیر تمرین تناوبی پرشدت در موش صحرائی ماده چاق قبل از بارداری بر زمان خستگی، متیلاسیون ژن‌های PGC-1 $\alpha$  و سارکولپین در عضله دوقلوی زاده‌های موش. *فیزیولوژی ورزشی*. تابستان ۱۳۹۸؛ ۱۱(۴۲): ۷۹-۹۴. شناسه دیجیتال: 10.22089/spj.2018.6188.1799

Koneshlou S, Nourshahi M, Hedayati M, Fayaz Milani R. The Effect of High-Intensity Interval Training in Obese Female Rats before Pregnancy on Fatigue Time, Methylation of PGC-1 $\alpha$  and Sarcolipin Genes in the Gastrocnemius Muscles of Their Offspring. *Summer 2019*; 11(42): 79-94. (In Persian). DOI: 10.22089/spj.2018.6188.1799

## **The Effect of High-Intensity Interval Training in Obese Female Rats before Pregnancy on Fatigue Time, Methylation of PGC-1 $\alpha$ and Sarcolipin Genes in the Gastrocnemius Muscles of Their Offspring**

**S. Koneshlou<sup>1</sup>, M. Nourshahi<sup>2</sup>, M. Hedayati<sup>3</sup>, R. Fayaz milani<sup>4</sup>**

1. Ph.D. Student of Exercise Physiology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
2. Associate Professor of Exercise Physiology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran\*
3. Associate Professor of Biochemistry, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Assistant Professor of Exercise Physiology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

**Received: 2018/08/04**

**Accepted: 2018/11/11**

---

### **Abstract**

Obesity and the need to control energy is considered to be one of the most important factors in the outbreak of chronic diseases all over the world. It must be taken into account due to transmission of its adverse effects from mother to offspring. Accordingly, the present study aims to investigate the effect of high-intensity periodic training in obese female rats before pregnancy on fatigue time, methylation of Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 $\alpha$ ) and sarcolipin genes in the Gastrocnemius Muscles of their offspring. To achieve this goal, 40 three-month-old Wistar female rats were bought and categorized into four groups: high-fat diet (250 $\pm$ 22 g), control (170 $\pm$ 30 g), training with high-fat diet (240 $\pm$ 30 g) and training (190 $\pm$ 33 g). The female rats became pregnant after six weeks of HIIT protocol. Their offsprings were divided, after birth, into two groups. By using specific PCR method, the first group were dissected to examine methylation of PGC-1 $\alpha$  and sarcolipin. The second group performed swimming protocol after two months to assess fatigue level. One-way ANOVA test results demonstrated a significant decrease (P=0.001) in PGC-1 $\alpha$  gene methylation amounts and a significant increase (P=0.001) in resistance to fatigue test between training group and the other groups and between training with high-fat diet group and high-fat diet group. Hence, HIIT before pregnancy is influential on PGC-1 $\alpha$  gene methylation and the performance of rats' offsprings (resistance to fatigue). Additionally, HIIT can reduce the effects of high-fat foods.

**Keywords:** Sarcolipin, Epigenetic, High-Intensity Interval Training, PGC-1 $\alpha$

---

\*Corresponding Author

Email: m-nourshahi@sbu.ac.ir