Effect of regular treadmill exercise on miR-10b and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in the hippocampus of female rats

Lily Mohammadipoor-ghasemabad[1], Mohammad Hossein Sangtarash[2], Saeed Esmaeili-Mahani[3], Vahid Sheibani[4], Hosein Ali Sasan[2]

Background and Aim: The positive effects of exercise on brain function and increased expression of neuronal growth factors, including brain-derived neurotrophic factor or (BDNF), have been proven. To the further investigate the molecular mechanisms of these changes, As well as knowing that miR-10b is one of the BDNF expression regulators, the effect of exercise on the relative expression of miR-10b (microRNA-10) in female rats was evaluated. Since they have shown in previous studies, Exercise through the interaction with estrogen hormone increases the expression of BDNF, The effect of exercise on the expression of miR-10b in rats without ovarian was also measured.

Materials and Methods: In this study, 42 female Wistar rats were selected and divided into two groups: intact and without ovarian. The rats without ovarian have spent ovariectomy surgery and were used in the experiments after a month. The exercise protocol was four weeks running on the treadmill. Real time PCR was used to determine the relative expression of miR-10b in the hippocampus of rats.

Results: The expression of miR-10b in the Sham-exercise group didn't show any significant difference as compared to the control group in both intact and OVX rats. Compulsive exercise with treadmill did not make any significant changes in the expression of this gene in both types intact and OVX rats ($P > 0.05$). But the BDNF expression of OVX rats was significantly increased ($P < 0.05$). In fact, there was no correlation between miR-10b expression and exercise-induced BDNF expression changes.

Conclusion: In fact, this study failed to prove the association of expression of miR-10b with the increase of BDNF expression which is the result of the interaction of exercise and estrogen hormone and this miRNA can't be as a regulator of BDNF expression.

Key Words: Regular Treadmill Exercise; Female Rats; Hippocampus; MiR-10b

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2018; 25(4): 276-285.

Received: June 14, 2018 ***Accepted: August 26, 2018***

[1] *Department of Biology, Faculty of Science, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran.*
[2] ***Corresponding author;*** *Department of Biology, Faculty of Science, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran.*
Tel: +98 5431136356 *Email:* sangtarash@usb.ac.ir
[3] *Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.*
[4] *Laboratory of Molecular Neuroscience, Neuroscience Research Center, Institute of Neuropharmacology, Kerman University of Medical science, Kerman, Iran.*

مقاله اصیل پژوهشی

تأثیر ورزش منظم با تردمیل بر بیان میکروآر ان ای 10b (miR-10b) و فاکتور نوروترفیک مشتق‌شده از مغز (BDNF) در هیپوکامپ موش‌های صحرایی ماده

لیلی محمدی‌پور قاسم‌آباد[1]، محمدحسین سنگتراش[2]، سعید اسماعیلی ماهانی[3]، وحید شیبانی[4]، حسینعلی ساسان[2]

چکیده

زمینه و هدف: تأثیرات مثبت ورزش بر عملکرد مغز و همچنین افزایش بیان برخی از عوامل رشد نورونی از جمله فاکتور نوروترفیک مشتق‌شده از مغز یا BDNF (Brain-derived neurotrophic factor)، اثبات شده است. برای بررسی بیشتر مکانیزم‌های مولکولی این تغییرات و همچنین با اطلاع از این موضوع که miR-10b یکی از تنظیم‌کننده‌های بیان BDNF است، تأثیر ورزش بر بیان نسبی miR-10b (microRNA-10) در موش‌های صحرایی ماده ارزیابی گردید. از آنجا که مطالعات قبلی نشان داده‌اند، ورزش از طریق برهمکنش با هورمون استروژن باعث افزایش بیان BDNF می‌شود، اثر ورزش بر بیان miR-10b در موش‌های فاقد تخمدان نیز سنجیده شد.

روش تحقیق: در این مطالعه، تعداد ۴۲سر موش صحرایی ماده از نژاد ویستار، انتخاب و در قالب دو گروه دست‌نخورده و فاقد تخمدان بررسی شدند. موش‌های فاقد تخمدان، جراحی تخمدان‌برداری را سپری کرده و بعد از گذشت یک ماه برای انجام آزمایش استفاده شدند. پروتکل ورزش، چهار هفته دویدن بر روی تردمیل بود. برای تعیین بیان نسبی miR-10b در هیپوکامپ موش‌ها از روش Real time PCR استفاده شد.

یافته‌ها: بیان miR-10b در گروه شم- ورزش نسبت به گروه کنترل در هر دو نوع موش‌های دست‌نخورده و فاقد تخمدان، تفاوت معنی‌داری نشان نداد. ورزش اجباری با تردمیل، تغییرات معنی‌دار در بیان این ژن در هر دو نوع موش دست‌نخورده و فاقد تخمدان ایجاد نکرد ($P>0/05$)؛ اما بیان BDNF در موش‌های دست‌نخورده به‌طور معنی‌دار افزایش یافت ($P<0/05$). در واقع بیان miR-10b با تغییرات بیان BDNF در اثر ورزش، هیچ‌گونه همبستگی نداشت.

نتیجه‌گیری: در واقع این مطالعه نتوانست ارتباط بیان miR-10b با افزایش بیان BDNF که حاصل برهمکنش ورزش و هورمون استروژن است را اثبات نماید؛ بنابراینmiRNA نمی‌تواند جز عوامل تنظیم‌کننده بیان BDNF محسوب گردد.

واژه‌های کلیدی: ورزش منظم با تردمیل؛ موش صحرایی ماده؛ هیپوکامپ؛ MiR-10b

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۳۹۷؛ ۲۵(۴): ۲۷۶-۲۸۵.

دریافت: ۱۳۹۷/۰۳/۲۴ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۶/۰۴

[1] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران.

[2] **نویسنده مسؤول؛** گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران.

آدرس: زاهدان- دانشگاه سیستان و بلوچستان-دانشکده علوم- گروه زیست‌شناسی

تلفن: ۰۵۴۳۱۱۳۶۳۵۶ پست الکترونیکی: sangtarash@usb.ac.ir

[3] گروه زیست‌شناسی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

[4] مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان، پژوهشکده نوروفارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران.

مقدمه

امروزه ورزش یک عامل مهم برای داشتن زندگی با کیفیت بالاتر شناخته شده است که باعث تغییراتی در عملکرد سیستم‌های مختلف فیزیولوژیکی می‌شود؛ همچنین نشان داده شده است که ورزش یکی از قوی‌ترین تداخلات غیردارویی است که می‌تواند عملکردهای شناختی را به‌خصوص در دوران پس از یائسگی بهبود بخشد (۱).

ورزش می‌تواند برخی از انتقال‌دهنده‌های عصبی و بیان نوروتروفین‌ها را تغییر دهد (۲). مشخص شده است که تغییرات بیان عوامل نوروتروفیک به‌عنوان مثال BDNF[1]، نقش حیاتی در عملکردهای مربوط به هیپوکامپ، پلاستیسیته[2] سیناپسی و اختلال‌های روان‌پزشکی ایفا می‌کند (۳). علاوه بر این نشان داده شده است که ورزش منظم می‌تواند باعث افزایش mRNA و پروتئین BDNF در هیپوکامپ موش‌های صحرایی شود که ممکن است به حفظ سلامت مغز و انعطاف‌پذیری سیناپسی کمک کند (۴، ۵). در سال‌های اخیر مشخص شده است، بسیاری از این تغییرات ناشی از انواع ورزش و تمرین‌های فیزیکی، تغییرات اپی‌ژنتیکی بوده که در نهایت منجر به تغییر سطح بیان ژن‌های مختلف می‌شود. شایع‌ترین تغییرات اپی‌ژنتیکی ناشی از ورزش، تغییرات هیستونی مانند: متیلاسیون و استیلاسیون هیستون‌ها، متیلاسیون DNA و بیان انواع مختلف میکروRNAها (miRNAها) می‌باشد (۵).

miRNAها، توالی‌های RNA کوتاه (۲۲ bp)، بدون کدگذاری و تک‌رشته‌ای هستند که قادر به تنظیم بیان ژن در سطح بعد از رونویسی می‌باشند. به‌طور کلی، miRNA اثر مهاری خود را یا با تخریب mRNA یا با مهار عمل ترجمه از طریق اتصال به توالی بذر (Seed) در ناحیه ´۳ فاقد ترجمه (´3 UTR) در mRNA اعمال می‌کند (۶). از میان تعدادی از miRNAها که اثر مهاری آنها بر بیان BDNF اثبات شده است، می‌توان miR-1b، miR-155، miR-191 و miR-10b را نام برد. هر یک از این miRNAها به‌تازگی به‌عنوان یکی از تنظیم‌کننده‌های جدید BDNF گزارش شده‌اند که بیان BDNF را با اتصال به نواحی مورد انتظار خود در 3'UTR (3' Untranslated region) ژن BDNF کاهش می‌دهند؛ علاوه بر این، مطالعات مربوط به سنجش لوسیفرازی[3] (تست تأییدی که نشان می‌دهد بیان یک پروتئین خاص توسط یک miRNA مشخص کنترل می‌شود) هر یک از این miRNAها نشان داد که آن‌ها می‌توانند بیان BDNF درونی را در رده‌های سلولی HEK-293 و ARPE-19 مهار کنند؛ در حالی که کاهش این miRNAها باعث افزایش سطح BDNF می‌شود (۷)؛ علاوه بر این مطالعاتِ بسیاری؛ miR-182، miR-134، miR-16 و ... را به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های بیان BDNF در شرایط فیزیولوژیکی متفاوت معرفی نمودند (۱۰-۸).

از آنجا که نقش miR-10b در کاهش بیان BDNF در هیپوکامپ موش‌های صحرایی در شرایط محرومیت از خواب و افسردگی ناشی از استرس مزمن اثبات شده است (۱۱) و با توجه به این موضوع که در مطالعه‌ای اثبات شد که ورزش می‌تواند کاهش بیان BDNF در اثر کمبود خواب را جبران نماید (۱۲)؛ در این مطالعه، اثر ورزش منظم بر بیان miR-10b -یکی از تنظیم‌کننده‌های اثبات‌شده BDNF در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیک- در موش‌های صحرایی مادّه، مورد بررسی قرار گرفت.

روش تحقیق

حیوانات آزمایشگاهی:

در مطالعه حاضر موش‌های صحرایی از نژاد Wistar با وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم مورد استفاده قرار گرفتند. تعداد ۴۲سر موش با دسترسی آزادانه به غذا و آب، در یک قفس قرار داده شدند. موش‌ها در شرایط یک برنامه روشنی و تاریکی

[1] *Brain-derived neurotrophic factor*
[2] *Plasticity*
[3] *Luciferase assay*

۱۲ساعته (نور در ساعت ۰۷:۰۰–۱۹:۰۰) و دمای استاندارد (۱±۲۳ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند. حیوانات به‌صورت تصادفی به دو گروه دست‌نخورده (Intact) و فاقد تخمدان (OVX)[1] و در هر گروه ۳زیرگروه (در مجموع ۶گروه)، به این ترتیب تقسیم شدند: گروه کنترل (موش‌ها در این زیرگروه هیچ‌گونه تستی را انجام ندادند و تمامی شرایط نگهداری اعم از آب و غذا، شرایط دما و نور برای آنها با سایر زیرگروه‌ها یکسان بود)، گروه ورزش، گروه شم–ورزش (بر روی تردمیل قرار گرفتند بدون اینکه بدوند (صفر متر در دقیقه)). تعداد موش‌ها در هر زیرگروه ۷سر در نظر گرفته شد. اساس تعیین حجم نمونه در درجه اول مطالعات قبلی در این زمینه بود و سپس برآوردهایی که بر اساس نرم‌افزار G*power انجام پذیرفت. در این نرم‌افزار تعداد نمونه بر اساس میانگین‌ها در هر گروه و تعیین اندازه مؤثّر و انحراف‌معیار محاسبه می‌شود که حداقل تعداد حیوانات را برای مطالعه حاضر ۷سر محاسبه نمود).

تمام پروتکل‌ها و تیمارها به‌وسیله کمیته اخلاق مرکز تحقیقات علوم اعصاب و روان کرمان، با کد اخلاق به شماره EC/94-46 (IR.KMU.1394.94-46) تصویب شد. پژوهشگران این مطالعه نیز تلاش نمودند، ناراحتی و آسیب‌های حیوانات را در تمام مراحل مطالعه کاهش دهند.

جراحی تخمدان‌برداری:

ابتدا موش‌های صحرایی با تزریق داخل صفاقی مخلوط دو داروی کتامین ۱۰درصد (۶۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلازین ۳درصد (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) بیهوش شدند و یک شکاف در خط میانی شکم آنها ایجاد شد. اگر این شکاف از میان بافت همبند در خط میانی شکم باشد، یک ناحیه بدون خونریزی ایجاد می شود. سپس روده‌ها و چربی‌های ناحیه شکمی کنار زده شد و دو شاخ رحم مشخص گردید و رحم به سمت جلو تعقیب شد تا تخمدان در معرض دید قرار گیرد؛ آنگاه یک گره محکم به دور رحم، درست در زیر تخمدان زده شد و تخمدان تحت شرایط آسپتیک، جدا گردید. این روش برای تخمدان طرف دیگر نیز تکرار شد. در نهایت (پس از ریختن یک سی‌سی نرمال‌سالین در ناحیه شکم برای عدم چسبندگی) ابتدا عضله و لایه‌های داخلی و سپس پوست، با نخ قابل جذب بخیه کرومیک شماره ۳/۰ بخیه زده شد (۱۳).

پروتکل ورزش:

موش‌ها در گروه ورزش در طی دوره روشنایی، از روز در ساعت ۹صبح تا ۱۴:۳۰ به‌مدت چهار هفته از شنبه تا چهارشنبه، ورزش اجباری را بر روی تردمیل با شیب صفر درجه انجام دادند (هر بار که موش‌ها متوقف می‌شدند، شوک خفیف (۰/۲۵ میلی‌آمپر) دریافت می‌کردند). قبل از شروع دوره ورزش، به این موش‌ها اجازه داده شد تا با محیط تردمیل (شرکت پیشرو اندیشه صنعت، ایران) برای ۳۰دقیقه در طی ۲روز متوالی سازگاری یابند. این امر برای از بین بردن استرس احتمالی ناشی از محیط جدید بود.

پروتکل ورزش به این شرح بود: ۳۰دقیقه برای دو هفته اول (با سرعت ۱۰متر در دقیقه)، ۴۵دقیقه برای هفته سوم و ۶۰دقیقه برای هفته چهارم (هر دو با سرعت ۱۵متر در دقیقه). بعد از هر ۱۵دقیقه در هر جلسه، حیوانات به‌مدت پنج‌دقیقه استراحت داده می‌شدند. موش‌ها در گروه شم– ورزش بر روی تردمیل قرار گرفتند، بدون اینکه بدوند (صفر متر در دقیقه)(۱۴). موش‌های فاقد تخمدان، ورزش را یک‌ماه بعد از انجام عمل تخمدان‌برداری آغاز نمودند.

آزمایش‌های مولکولی:

برای آزمایش‌های مولکولی، حیوانات در دسیکاتور با فشار پایین جریان گاز CO_2 بیهوش شدند. پس از تقسیم‌بندی، دو هیپوکامپ به‌سرعت در سطح یخ جدا شده و در نیتروژن مایع منجمد، قرار داده شدند. هیپوکامپ‌های جدا شده از هر موش، تا زمان همگن‌شدن در دمای ۸۰– درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید.

[1] *Ovariectomized*

استخراج RNA:

RNA کل هیپوکامپ با استفاده از RNX Plus (Cinnagen، ایران) و بر اساس دستورالعمل شرکت تولیدکننده که یک روش اصلاح‌شده گوانیدینیوم- تیوسیانات-فنول- کلروفرم است، استخراج گردید (۱۵). RNA جدا شده در ۲۰میلی‌لیتر از آب تیمار شده با DEPC (Cinnagen، ایران) حل شد. برای اطمینان از کمیت و کیفیت RNAی استخراج‌شده، غلظت آن توسط نانودراپ 1000 UV (Midland, ON, Canada) اندازه‌گیری شد و نمونه‌ها روی ژل آگارز یک‌درصد مشاهده شدند. مقدار ۲/۰~ نسبت جذب نوری در طول موج ۲۶۰نانومتر به طول موج ۲۸۰نانومتر از RNAی استخراج شده، بیانگر خلوص نمونه‌های RNA در نظر گرفته شد و در مراحل بعدی آزمایش استفاده گردید.

Real-time polymerase chain reaction (PCR):

روش Real-time PCR برای اندازه‌گیری miR-10b و U6 (ژن مرجع) در هیپوکامپ موش صحرایی استفاده شد. رونویسی معکوس این ژن‌ها در گروه‌های مورد مطالعه با غلظت‌های یکسان RNAی کل استخراج‌شده، انجام شد. اندازه کوچک miR-10b و U6 (به عنوان کنترل داخلی استفاده شد)، کمّی‌سازی آنها را با تکنیک‌های معمول Real-time PCR دشوار می‌سازد؛ بنابراین، از روش آداپتور poly (A) به‌طور خاص برای اندازه‌گیری miRNA استفاده شد (۱۶). ابتدا cDNAها با استفاده از آنزیم ریورس‌ترانس‌کریپتاز[1] (Cinnagen، ایران)، dNTP[2] و بافر همراه آنزیم سنتز شدند؛ سپس تکثیر cDNAهای سنتزشده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی miRNA (طراحی‌شده توسط شرکت پارس‌ژنوم، ایران)، با استفاده مستر میکس[3] SYBR Green (پارس توس، ایران) در دستگاه بیومترا (آنالتیک ژنا ای-جی، ژنا، آلمان) انجام شد.

لیست آغازگرها برای ژن‌های BDNF، miR-10b و U6 که به‌وسیله شرکت سیناژن ساخته شده‌اند، در جدول یک نشان داده شده است. تمام آزمایش‌ها حداقل با دو بار تکرار در شرایط دمایی به این شرح انجام شد: ۹۵درجه سانتی‌گراد برای ۱۰دقیقه و ۴۰تکرار از سه سیکل دمایی: ۹۵درجه سانتی‌گراد به‌مدّت ۱۵ثانیه، ۶۰درجه سانتی‌گراد به‌مدّت ۳۰ثانیه و ۷۲درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ثانیه و منحنی ذوب در بازه دمایی از ۶۰درجه تا ۹۵درجه تعیین شد.

بیان نسبی ژن‌های نام‌برده با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد. برای انجام مطالعات آماری از نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۲۴) استفاده شد. اختلاف آماری بین گروه‌های مورد مطالعه با استفاده از آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (one-Way ANOVA) مورد بررسی قرار گرفت که در صورت معنی‌دار شدن نتایج حاصل از آنالیز واریانس، تست تکمیلی Tukey نیز انجام شد. مقادیر به‌دست‌آمده با $P<0/05$، از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

جدول ۱- توالی پرایمرها برای ژن‌های استفاده‌شده در Real time PCR

Gene name	Forward primer (5′⟶ 3′)	Reverse primer(5′⟶ 3′)
BDNF	GACGACGACGTCCCTGGCTGA	ACGACTGGGTAGTTCGGCCTGG
β-actin	CCCAGAGCAAGAGAGGCATC	GCCTTAGGGTTCAGAGGGGC
Rno-miR-10b	CCCUGUAACCGAAUUUGUGUAA	CCAGTGAGCAGAGTGACG
U6 RNA	CTCGCTTCGGCAGCACA	CCAGTGAGCAGAGTGACG

یافته‌ها

جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ لاندای نمونه‌های مختلف، به‌وسیله دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل به عدد ۲ نزدیک بود که نشان‌دهنده خلوص نمونه‌های RNA می‌باشد. در این مطالعه اثر ورزش بر بیان ژن miR-10b و BDNF در موش‌های صحرایی ماده مورد بررسی قرار گرفت. ارزیابی منحنی ذوب برای ژن‌های مورد مطالعه حاکی از ایجاد تک‌محصول در واکنش Real Time PCR بود که بیانگر

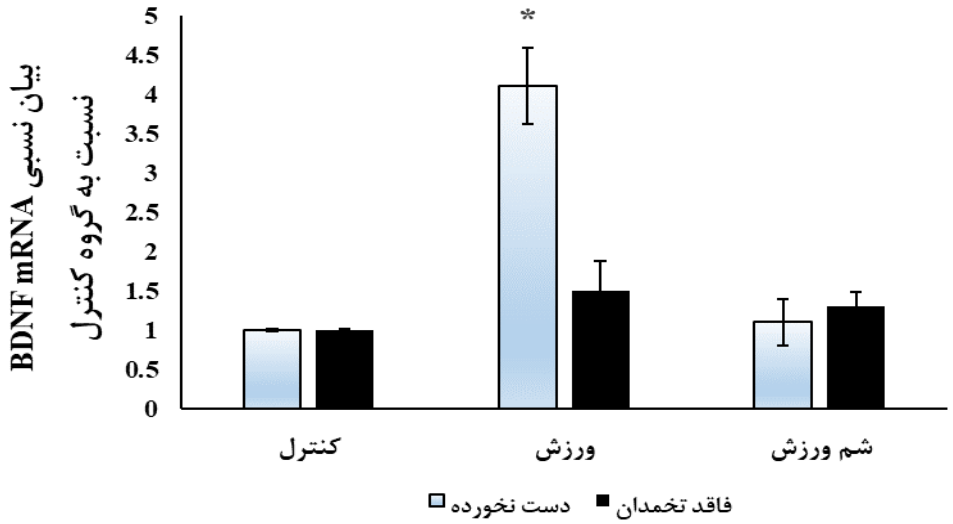
[1] *Reverse transcriptase*
[2] *Deoxynucleoside triphosphate*
[3] *MasterMix*

کیفیت مطلوب برای ارزیابی و آنالیز نتایج است (نمودارها نشان داده نشده‌اند).

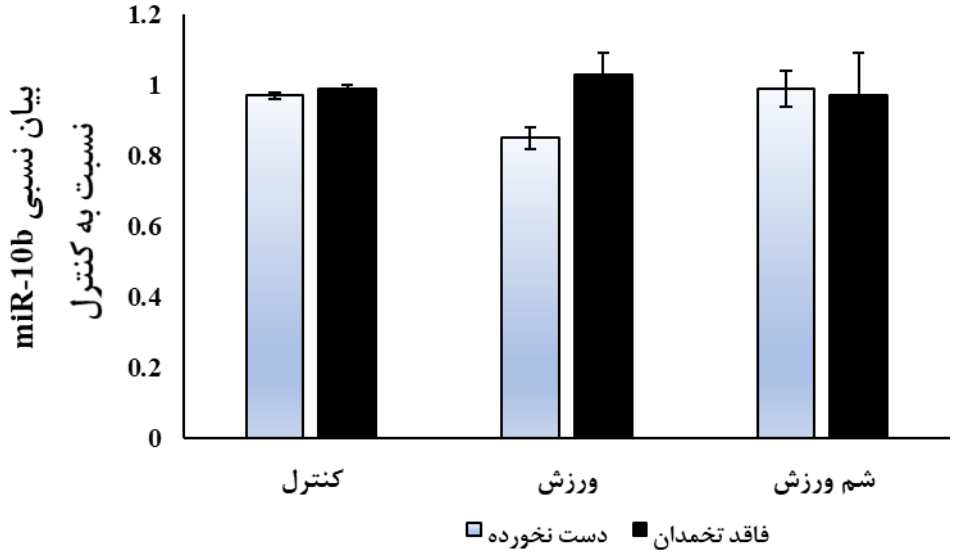
در ابتدا بیان BDNF mRNA در زیرگروه‌های موش‌های دست‌نخورده انجام شد. نتایج Real Time PCR نشان داد که ۴هفته ورزش با تردمیل، میزان بیان نسبی این ژن را در گروه موش‌های دست‌نخورده به‌طور معنی‌دار افزایش داد، اما در موش‌های فاقد تخمدان، تأثیری نداشت (نمودار ۱). نتایج آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه بیان نسبی miR-10b در هیپوکامپ موش‌های دست‌نخورده، با P=۰/۰۴ مشخص شد و سپس مقایسه بین گروه‌ها به‌وسیله تست تکمیلی Tukey انجام شد. همان‌طور که در نمودار ۲ نشان داده شده است، میزان بیان نسبی miR-10b در گروه شم- ورزش و گروه کنترل در گروه موش‌های دست‌نخورده نزدیک به هم بوده و تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشت (P=۰/۳۵۵). این میزان در گروه ورزش نسبت به گروه کنترل تغییر معنی‌داری نشان نداد (P=۰/۶۴۳). همچنین برای بررسی تأثیر هورمون استروژن بر بیان ژن miR-10b، بیان این ژن در موش‌های صحرایی فاقد تخمدان هم اندازه‌گیری شد. نتایج آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه در این گروه معنی‌دار نبود (P=۰/۸۳) و این نتیجه نیاز به انجام تست تکمیلی Tukey را منتفی نمود (نمودار ۲). میزان بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲- میزان بیان نسبی ژن‌های مورد مطالعه با استفاده از روش Real time PCR در گروه‌های مورد آزمایش

گروه‌های مورد مطالعه		میانگین بیان نسبی BDNF (Means±S.E.M.)	میانگین بیان نسبی miR-10b (Means±S.E.M.)
موش‌های دست نخورده (INTACT)	کنترل	۰/۹۹±۰/۰۱	۰/۹۷±۰/۰۱
	ورزش	۴/۱±۰/۴۸	۰/۸۵±۰/۰۳
	شم-ورزش	۱/۱ ±۰/۳	۰/۹۹±۰/۰۵
موش‌های فاقد تخمدان (OVX)	کنترل	---	۰/۹۹±۰/۰۲
	ورزش	۱/۷±۰/۳۷	۰/۹۷±۰/۱۲
	شم-ورزش	---	۰/۹۷±۰/۱۲



نمودار ۱- نمودار مقایسه بیان BDNF mRNA در گروه‌های مورد مطالعه با استفاده از روش Real time PCR. تعداد موش‌ها در هر گروه برابر با ۷سر بود. ورزش باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن BDNF mRNA در موش‌های دست‌نخورده شد (P<۰/۰۵)؛ اما ورزش با تردمیل باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن BDNF mRNA در موش‌های فاقد تخمدان نگردید (P<۰/۰۵ *).



نمودار ۲- نمودار مقایسه بیان miR-10b در گروه‌های مورد مطالعه در موش‌های دست‌نخورده (Intact) و فاقد تخمدان (OVX). ورزش بر بیان miR-10b در موش‌های دست‌نخورده و فاقد تخمدان تغییر معنی‌داری ایجاد نکرد (P>۰/۰۵). تعداد موش‌های مورد بررسی در هر گروه ۷ سر بود.

بحث

ورزش تأثیرات مثبت متعدّدی بر عملکرد مغز، از جمله افزایش پلاستیسیته، یادگیری و حافظه دارد. مطالعات قبلی نشان داده است که ورزش، بیان برخی از عوامل نوروترفیک از قبیل BDNF را در هیپوکامپ موش‌های صحرایی افزایش می‌دهد. BDNF به‌عنوان یکی از اعضای مهم خانواده فاکتورهای رشد نوروتروفین با سطح بالایی در هیپوکامپ که ناحیه حیاتی برای شکل‌گیری حافظه و یادگیری است، نقش مهمی در تکامل سیستم عصبی، پلاستیسیته سیناپسی، تحریک‌پذیری نورونی، سیناپتوژنز و عملکردهای شناختی مغز دارد (۱۲).

نتایج بررسی بیان BDNF mRNA در مطالعه حاضر نشان داد، همانند مطالعات گذشته ۴هفته ورزش اجباری با تردمیل، باعث افزایش معنی‌دار بیان BDNF mRNA در موش‌های دست‌نخورده شد؛ اما با حذف تخمدان (موش‌های فاقد تخمدان) دیگر تفاوت معنی‌داری در میزان بیان BDNF موش‌های گروه ورزش (گروه Exercise in OVX) نسبت به گروه کنترل دست‌نخورده مشاهده نگردید. در واقع نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعه Berchtold و همکاران سازگار است که از یک طرف نشان دادند ورزش در موش‌های صحرایی ماده توانست، بیان کاهش‌یافته BDNF هیپوکامپ درنتیجه محرومیت سه‌هفته‌ای از استروژن (تخمدان) را به حالت نرمال برگرداند و از طرف دیگر اثبات نمودند که ورزش از طریق برهمکنش با استروژن، بیان BDNF را افزایش دهد (۲۳).

Vaynman و همکاران در سال ۲۰۰۴ پیشنهاد کردند، تمرینات ورزشی در موش‌های صحرایی توسط سیستم پیام‌رسان پروتئین‌کیناز وابسته به کلسیم/کالودوولین نوع II (CaMKII) و فاکتور رونویسی متصل‌شونده به عامل cAMP (CREB)، باعث افزایش بیان BDNF می‌شود (۳). جالب توجه است، Gomez-Pinilla و همکاران نشان دادند که به‌طور خاص، ورزش متیلاسیون CpG در پروموتر IV ژن BDNF را کاهش می‌دهد و بر سطح MeCP2 مرتبط با BDNF تأثیر می‌گذارد. علاوه بر این نشان داده شده است که ورزش باعث استیلاسیون هیستون H3 در پروموتر IV ژن BDNF بدون تغییر وضعیت استیلاسیون هیستون H3 کل می‌شود. با این حال، استیلاسیون هیستون H3 همراه با کاهش سطح HDAC5 منجر به افزایش رونویسی ژن

BDNF می‌شود که نشان می‌دهد هیستون H3 یک مولکول مهم در تغییرات اپی‌ژنتیک به‌دنبال ورزش می‌باشد (۱۷).

اما همان‌طور که در مقدمه گفته شد، بیشترین تغییرات اپی‌ژنتیکی ناشی از ورزش و تمرینات جسمانی، علاوه بر تغییرات گفته‌شده، تغییر در بیان miRNAها نیز می‌باشد و با توجه به این موضوع که تاکنون تغییرات بیان miRNAهای مرتبط با BDNF بعد از ورزش در هیپوکامپ موش‌های صحرایی بررسی نشده و برای بررسی بیشتر مکانیزم‌های مولکولی تغییرات بیان BDNF، در این پژوهش سعی شد تا پس از انجام مطالعه مقدماتی در خصوص تأثیرات ورزش بر عملکرد مغز، تأثیر ۴هفته مداوم دویدن بر روی تردمیل بر بیان miR-10b در هیپوکامپ موش‌های صحرایی ماده مطالعه گردد.

در مطالعه حاضر، بیان miR-10b در گروه ورزش نسبت به گروه کنترل کاهش داشت، اما این تغییرات معنی‌دار نبود. مطالعات قبلی، تغییرات وابسته به ورزش را در بیان miRNAهای خون (۱۹، ۱۸)، قلب (۲۰) و عضلات اسکلتی (۲۱) نشان دادند؛ اما این تغییرات در بافت مغز بررسی نشدند. علاوه بر این، Tsiloulis و همکاران در سال ۲۰۱۶ با استفاده از روش توالی‌یابی نسل بعدی نشان دادند که ۶هفته ورزش استقامتی در انسان، بر بیان miRNAهای بافت‌های چربی در مردان چاق بی‌تأثیر بود. تنها در این میان miR-10b پس از تمرین استقامتی در بافت‌های چربی ناحیه ران و لگن کاهش مشهود نشان داد؛ اما تفاوت معنی‌دار در بیان این ژن در سلول‌های چربی سایر نقاط بدن مشاهده نگردید (۲۲). در این مطالعه برای بررسی اثر استروژن بر بیان miR-10b، تمامی آزمایش‌های انجام‌شده بر روی موش‌های دست‌نخورده، بر روی موش‌های تخمدان‌برداری‌شده انجام شد و نتایج نشان داد که حذف این هورمون بر بیان miR-10b در مطالعه حاضر بی‌تأثیر بود و در واقع در این مطالعه، ارتباط بیان miR-10b در هیپوکامپ موش‌های صحرایی ماده با افزایش بیان BDNF بعد از ۴هفته ورزش اجباری با تردمیل را اثبات نشد. بیان غیرطبیعی miR-10b در برخی از سرطان‌ها مانند: سرطان معده، سرطان دهان و گلیوما گزارش شده است (۲۵، ۲۴).

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که میزان بیان نسبی miR-10b در گروه ورزش نسبت به گروه کنترل در هر دو نوع موش‌های دست‌نخورده و فاقد تخمدان، تفاوت معنی‌داری نداشت. در واقع این مطالعه نتوانست ارتباطی بین بیان این ژن با افزایش بیان BDNF که به‌دنبال برهمکنش ورزش و هورمون استروژن اتفاق می‌افتد، نشان دهد. پیشنهاد می‌شود، در مطالعات آینده اثر چندین پروتکل ورزشی دیگر نیز بر بیان این ژن بررسی گردد؛ همچنین تغییرات بیان سایر miRNAهای مرتبط با BDNF در اثر ورزش اندازه‌گیری شود تا مکانیسم مولکولی نحوه اثرگذاری و برهمکنش ورزش و هورمون استروژن بر بیان BDNF مشخص گردد.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه دکتری تحت عنوان «بررسی تغییرات بیان miRNAهای دخیل در بیان ژن BDNF هیپوکامپ موش‌های صحرایی محروم‌شده از خواب ورزش کرده» در مقطع دکترای تخصصی ژنتیک ملکولی می‌باشد که با حمایت مالی دانشگاه سیستان و بلوچستان به اجرا در آمده است. بدین‌وسیله از این واحد دانشگاهی تقدیر و تشکر به عمل می‌آید؛ همچنین از مرکز تحقیقات علوم اعصاب پژوهشکده نوروفارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی کرمان که ما را در انجام این پروژه یاری نمودند، صمیمانه تشکر می‌گردد.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اعلام می دارند که هیچ گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

منابع:

1- Shangold MM. Exercise in the menopausal woman. Obstet Gynecol. 1990; 75(4 Suppl): 53S-58S; discussion 81S-83S.

2- Cotman CW, Berchtold NC. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. Trends Neurosci. 2002; 25(6): 295-301.

3- Vaynman S, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. Eur J Neurosci. 2004; 20(10): 2580-90.

4- Griffin EW, Bechara RG, Birch AM, Kelly AM. Exercise enhances hippocampal-dependent learning in the rat: evidence for a BDNF-related mechanism. Hippocampus. 2009; 19(10): 973-80.

5- Marlatt MW, Potter MC, Lucassen PJ, van Praag H. Running throughout middle-age improves memory function, hippocampal neurogenesis, and BDNF levels in female C57BL/6J mice. Dev Neurobiol. 2012; 72(6): 943-52.

6- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? Nat Rev Genet. 2008; 9(2): 102-14.

7- Varendi K, Kumar A, Härma MA, Andressoo JO. miR-1, miR-10b, miR-155, and miR-191 are novel regulators of BDNF. Cell Mol Life Sci. 2014; 71(22): 4443-56.

8- Bai M, Zhu X, Zhang Y, Zhang S, Zhang L, Xue L, et al. Abnormal hippocampal BDNF and miR-16 expression is associated with depression-like behaviors induced by stress during early life. PloS one. 2012; 7(10): e46921.

9- Li YJ, Xu M, Gao ZH, Wang YQ, Yue Z, Zhang YX, et al. Alterations of serum levels of BDNF-related miRNAs in patients with depression. PLoS One. 2013; 8(5): e63648.

10- Im HI, Kenny PJ. MicroRNAs in neuronal function and dysfunction. Trends neurosci. 2012; 35(5): 325-34.

11- Jiang Y, Zhu J. Effects of sleep deprivation on behaviors and abnormal hippocampal BDNF/miR-10B expression in rats with chronic stress depression. Int J Clin Exp Pathol. 2015; 8(1): 586-93.

12- Saadati H, Sheibani V, Esmaeili-Mahani S, Darvishzadeh-Mahani F, Mazhari S. Prior regular exercise reverses the decreased effects of sleep deprivation on brain-derived neurotrophic factor levels in the hippocampus of ovariectomized female rats. Regul Pept. 2014; 194-195: 11-5.

13- Ben J, Soares FMS, Scherer EBS, Cechetti F, Netto CA, Wyse ATS. Running exercise effects on spatial and avoidance tasks in ovariectomized rats. Neurobiol Learn Mem. 2010; 94(3): 312-7.

14- Zagaar M, Alhaider I, Dao A, Levine A, Alkarawi A, Alzubaidy M, et al. The beneficial effects of regular exercise on cognition in REM sleep deprivation: behavioral, electrophysiological and molecular evidence. Neurobiol Dis. 2012; 45(3): 1153-62.

15- Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J, et al. Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from current protocols in molecular biology. New York: Greene Pub. Associates; 1992.

16- Shi R, Sun YH, Zhang XH, Chiang VL. Poly(T) Adaptor RT-PCR. In: Fan JB (ed.). Next-generation MicroRNA expression profiling technology: methods and protocols. 1st ed. Humana Press: Springer; 2012. pp: 53-66.

17- Gomez Pinilla F, Zhuang Y, Feng J, Ying Z, Fan G. Exercise impacts brain derived neurotrophic factor plasticity by engaging mechanisms of epigenetic regulation. Eur J Neurosci. 2011; 33(3): 383-90.

18- Párrizas M, Brugnara L, Esteban Y, González-Franquesa A, Canivell S, Murillo S, et al. Circulating miR-192 and miR-193b are markers of prediabetes and are modulated by an exercise intervention. J Clin Endocrinol Metab. 2015; 100(3): E407-15.

19- Aoi W, Ichikawa H, Mune K, Tanimura Y, Mizushima K, Naito Y, et al. Muscle-enriched microRNA miR-486 decreases in circulation in response to exercise in young men. Front Physiol. 2013; 4: 80.

20- Fernandes T, Baraúna VG, Negrão CE, Phillips MI, Oliveira EM. Aerobic exercise training promotes physiological cardiac remodeling involving a set of microRNAs. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2015; 309(4): H543-52.

21- Davidsen PK, Gallagher IJ, Hartman JW, Tarnopolsky MA, Dela F, Helge JW, et al. High responders to resistance exercise training demonstrate differential regulation of skeletal muscle microRNA expression. J Appl Physiol (1985). 2011; 110(2): 309-17.

22- Tsiloulis T, Pike J, Powell D, Rossello FJ, Canny BJ, Meex RC, et al. Impact of endurance exercise training on adipocyte microRNA expression in overweight men. FASEB J. 2016; 31(1): 161-71.

23- Berchtold NC, Kesslak JP, Pike CJ, Adlard PA, Cotman CW. Estrogen and exercise interact to regulate brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein expression in the hippocampus. Eur J Neurosci. 2001; 14(12): 1992-2002.

24- Sasayama T, Nishihara M, Kondoh T, Hosoda K, Kohmura E. MicroRNA-10b is overexpressed in malignant glioma and associated with tumor invasive factors, uPAR and RhoC. Int J Cancer. 2009; 125(6): 1407-13.

25- Lu YC, Chen YJ, Wang HM, Tsai CY, Chen WH, Huang YC, et al. Oncogenic function and early detection potential of miRNA-10b in oral cancer as identified by microRNA profiling. Cancer Prev Res (Phila). 2012; 5(4): 665-74.