

Original Article

Comparison of the Alterations of Gene Expression Related to Signaling Pathways of Synthesis and Degradation of Skeletal Muscle Protein Induced by Two Exercise Training Protocols

Majid Gholipour^{1*} , Soheyla Mazaheri² , Mohammad Reza Asad³ 

¹Department of Physical Education, Sharif University of Technology, Tehran, Iran.

²Department of Sport Physiology, Karaj Payame Noor University, Alborz, Iran.

³Department of Physical Education & Sport Sciences, School of Education & Psychology, Payame Noor University, Alborz, Iran.

*Corresponding Author:
Majid Gholipour;
Department of Physical Education, Sharif University of Technology, Tehran, Iran.

Email:
gholipour@sharif.edu

Received: 18 May, 2019
Accepted: 6 Jul, 2019

Abstract

Background and Objectives: Skeletal muscle mass depends on the balance between synthesis and degradation of muscle protein, which changes with aging and disease. The aim of the present research was to examine the effects of two exercise training protocols on alterations of some genes involved in pathways of protein synthesis and degradation in order to achieve a more effective training program in case of pathological conditions, aging process, and improvement of athletic performance.

Methods: In this experimental study, 8 weeks old Wistar rats, were randomly divided into three groups of resistance training, high-intensity interval training, and control. To examine gene expression, 48 hours after the last exercise session, the Soleus muscles were dissected and stored at -80°C. Between-group differences, were analysed using parametric and non-parametric tests at the significance level of $\alpha < 0.05$.

Results: Compared to the control group, the increased expression of *AKT* and *Rps6kb1* genes, was significant in both training groups (especially resistance group). Moreover, the gene expression related to the protein degradation signaling pathway, (*MuRF1* and *Map1LC3a*), were suppressed by both training protocols, especially high-intensity interval training group and were confirmed by Western blotting analysis.

Conclusion: Given the fact that the protein synthesis-related gene expression was increased by resistance training and protein degradation-related gene expression was suppressed by high-intensity interval training, the practical application of the two protocols can be considered simultaneously in order to reduce muscle atrophy in pathological conditions, aging, as well as to increase muscle strength to improve athletic performance.

Keywords: Exercise training; Gene expression; Wistar rats; Skeletal muscle.

DOI: 10.29252/qums.13.6.27

مقایسه تغییرات بیان ژن‌های مرتبط با مسیرهای سیگنالینگ سنتز و تجزیه پروتئین عضله اسکلتی ناشی از دو پروتکل تمرین ورزشی

مجید قلی‌پور^{۱*}، سهیلا مظاهری^۲، محمدرضا اسد^۳

چکیده

زمینه و هدف: توده عضله اسکلتی به تعادل بین سنتز و تجزیه پروتئین بستگی دارد که در شرایط بیماری و پیری دچار تغییر می‌شود. تحقیق حاضر با هدف بررسی تأثیر دو پروتکل تمرینی بر تغییرات برخی ژن‌های درگیر در مسیر سنتز و تجزیه پروتئین، به منظور دستیابی به یک برنامه تمرینی مؤثرتر هنگام بروز شرایط پاتولوژیک، فرآیند پیری و بهبود عملکرد ورزشکاران انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، موش‌های صحرایی هشت‌هفته‌ای نژاد ویستار به‌طور تصادفی به سه گروه تمرین مقاومتی، تناوبی پرشدت و شاهد تقسیم شدند. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، عضلات نعلی جدا و جهت بررسی بیان ژن، در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. تفاوت‌های بین گروهی، با استفاده از آزمون‌های پارامتریک و ناپارامتریک در سطح معنی‌داری، $\alpha < 0.05$ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: افزایش بیان ژن *AKT1* و *Rps6kb1* نسبت به گروه شاهد در هر دو گروه تمرینی معنی‌دار بود (به‌خصوص گروه مقاومتی). همچنین بیان ژن‌های مرتبط با مسیر تجزیه پروتئین (*Map1LC3a* و *MuRF1*)، توسط هر دو پروتکل، به‌ویژه تناوبی پرشدت سرکوب و به‌وسیله روش وسترن بلائینگ مورد تأیید قرار گرفت.

نتیجه‌گیری: با توجه به اینکه بیان ژن‌های مرتبط با سنتز پروتئین توسط تمرین مقاومتی افزایش می‌یابد و ژن‌های درگیر در روند تجزیه پروتئین توسط پروتکل تناوبی پرشدت سرکوب می‌شوند؛ بنابراین کاربرد عملی دو پروتکل به‌طور همزمان به‌منظور کاهش آتروفی عضلانی در شرایط پاتولوژیک و سالمندی، همچنین افزایش قدرت عضلانی برای بهبود عملکرد ورزشی می‌تواند مورد توجه قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: تمرین ورزشی؛ بیان ژن؛ موش نژاد ویستار؛ ماهیچه اسکلتی.

^۱گروه تربیت‌بدنی، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران.

^۲گروه فیزیولوژی ورزشی کاربردی، دانشگاه پیام نور، البرز، ایران.

^۳گروه تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روانشناسی، دانشگاه پیام نور، البرز، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

مجید قلی‌پور؛ گروه تربیت‌بدنی، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران.

آدرس پست الکترونیکی:

gholipour@sharif.edu

تاریخ دریافت: ۹۸/۲/۲۸

تاریخ پذیرش: ۹۸/۴/۱۵

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Gholipour M, Mazaheri S, Asad MR. Comparison of the alterations of gene expression related to signaling pathways of synthesis and degradation of skeletal muscle protein induced by two exercise training protocols. Qom Univ Med Sci J 2019;13(6):27-37. [Full Text in Persian]

مقدمه

توده عضلات اسکلتی در موارد پاتولوژیک؛ از قبیل کاکسیا و بی‌اشتهایی عصبی یا طی فرآیند پیری مانند سارکوپنیا و یا نوع روش زندگی از جمله بی‌حرکی، کم‌حرکی، قطع و یا کاهش فعالیت ورزشی در ورزشکاران، کاهش می‌یابد و پیامد آن نیز کم‌شدن قدرت عضلانی و اختلال در عملکرد جسمانی است که می‌تواند به ناتوانی و معلولیت منجر گردد (۱،۲). مکانیسم‌های اصلی حفظ توده عضلانی، مستلزم درگیری بین چند مسیر سیگنالینگ است (۳)، و مکانیسم مولکولی آن نیز شامل تعامل بین مسیرهای مختلف سیگنالینگ بوده که تحت شرایط فیزیولوژیکی، پیام‌های سنتز و تجزیه پروتئین عضله را بسیار دقیق و حساس کنترل می‌کند (۴). تمرینات مقاومتی با افزایش سنتز و تجزیه پروتئین، به‌عنوان مؤثرترین راه افزایش حجم عضلانی می‌باشند؛ اگرچه تمرینات استقامتی نیز تا حدودی باعث ایجاد هایپرتروفی می‌شود (۵،۲). Goodman و همکاران (سال ۲۰۱۱) با بررسی موش‌های ترانس ژنتیک، نشان دادند mTOR (هدف مکانیکی راپامایسین)، عامل هایپرتروفی ناشی از فشار مکانیکی بوده که فعالیت آن برای این رخداد ضروری است. مسیر AKT/mTOR، مسیر اصلی است که در ورزش باعث هایپرتروفی می‌شود. از طرف دیگر، mTORC2 می‌تواند به‌وسیله فسفوریلاسیون و مهار فاکتورهای رونویسی FoxO (خانواده سرچنگالی) مانع از تجزیه پروتئین گردد. در حقیقت، عوامل رونویسی FoxO باعث بیان دو لیگاز یوبیکوئیتین E3 (MAFbx با نام دیگر Atrogin1 و MuRF1) شده که این مسئله، یوبیکوئیتیناسیون و تجزیه پروتئین‌های سارکومری به‌وسیله پروتئوزوم را در پی دارد (۶،۷). مسیر سیگنالی PI3K/AKT در مسیر آبشاری وابسته به گیرنده فاکتورهای رشدی فعال بوده که ضمن غیرفعال کردن عوامل تجزیه پروتئین، در نهایت منجر به فعال شدن mTORC1 می‌شود. این مولکول از طریق فسفریله کردن و فعال کردن P70S6K (Rps6kb1) باعث افزایش بیان پروتئین‌های تنظیمی سیکل سلولی می‌گردد (۸). از آنجاکه AKT دارای سوبستراهای متعددی است و از مسیرهای مختلفی می‌تواند مرگ سلولی را مهار کند؛ از آن به‌عنوان مسیر بقای سلولی نیز نام برده می‌شود (۹).

همچنین مطالعات نشان داده‌اند انجام تمرین مقاومتی منجر به افزایش معنی‌دار شکل فسفریله پروتئین‌های mTOR و P70S6K می‌شود، اما در افزایش معنی‌دار محتوی پروتئینی تام mTOR و P70S6K نقشی ندارد (۱۰). مسیر سیگنالینگ mTOR، نقش مهمی در تحریک سنتز پروتئین‌های عضله پس از تمرینات (همراه با محدود کردن جریان خون) ایفا می‌کند. فعال شدن آبشاری S6K1، مسئول مرحله اول ترجمه بیان ژن و افزایش سنتز پروتئین‌های عضله و در نتیجه هایپرتروفی عضلانی است (۱۱). از طرف دیگر، آتوفاژی به‌طور گسترده‌ای در ارتباط با تجزیه ساختارها و اندامک‌های داخل سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۲). نشان داده شده است فعال شدن عامل نسخه‌برداری FOXO3 به‌طور اختصاصی باعث افزایش LC3 در عضلات اسکلتی موش شده و در موش‌های فاقد LC3 نیز کاهش آتروفی عضلانی را در پی دارد (۱۳). همچنین مسیر سیگنالینگ mTOR در موش‌های صحرایی بیمار تا اندازه‌ای مسئول تنظیم میزان آتوفاژی است (۱۴). نتیجه مطالعه دیگری نشان داد FOXO3a، واسطه اصلی در فرآیند آتروفی است که در صورت فعال شدن وارد هسته شده و با فعال کردن دو پروتئین تخریب‌کننده بافت عضلانی (MuRF1 و MAFbx)، تخریب آغاز می‌گردد (۱۵). علاوه بر این، پروتئین LC3 به‌عنوان یکی از اجزاء کلیدی آتوفاژی به دو صورت (نوع I و II) بروز می‌کند. این پروتئین به‌طور طبیعی در سیتوپلاسم واقع شده و هنگام تشکیل اتوفاگوزوم، LC3I به LC3II تبدیل و به غشای دولایه‌ای اتوفاگوزوم الحاق می‌گردد که در نتیجه آن می‌توان به‌طور مستقیم با شناسایی LC3، القاشدن آتوفاژی را در سلول شناسایی کرد (۱۶). براساس اطلاعات موجود و نبود اطلاعات، با توجه به اهمیت مسئله پیشگیری تجزیه پروتئین و یا کاهش آن در افراد مسن و یا بیماران در شرایط پاتولوژیک، همچنین تأثیر افزایش سنتز پروتئین و حجم عضلانی در ارتقای سلامتی، عملکرد ورزشکاران و قهرمانان، مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر دو پروتکل تمرینی بر تغییرات برخی ژن‌های درگیر در مسیر سنتز و تجزیه پروتئین، به‌منظور دستیابی به یک برنامه تمرینی مؤثرتر هنگام بروز شرایط پاتولوژیک، فرآیند پیری و بهبود عملکرد ورزشکاران انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، ۲۴ سر موش صحرایی هشت‌هفته‌ای نژاد ویستار خریداری و به‌طور تصادفی به سه گروه ۸ تایی مقاومتی (وزن $222/17 \pm 12/53$ گرم)، تناوبی پرشدت (وزن $217/38 \pm 18/02$ گرم) و شاهد (وزن $219/86 \pm 13/79$ گرم) تقسیم شدند و در گروه‌های ۴ تایی، درون قفس‌هایی از جنس پلی‌کربنات در شرایط استاندارد (دمای ۲۴-۲۲ درجه سانتیگراد و چرخه روشنایی - تاریکی ۱۲ ساعته)، با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. پس از سه روز سازگاری با محیط و ۱۰ جلسه تمرین، طی ۲ هفته آشناسازی موش‌ها با پروتکل‌های ورزشی و کسب آمادگی اولیه، گروه تناوبی پرشدت مورد آزمون تخمین حداکثر اکسیژن مصرفی قرار گرفت (۱۷) و تا پایان دوره تمرین، این آزمون هر دو هفته یک‌بار اجرا شد. ۸ هفته (۵ جلسه در هفته) تمرینات تناوبی پرشدت مشتمل بر ۵ تناوب با شدت

۸۵-۹۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی (شدت زیاد) و چهار تناوب با شدت ۶۰-۵۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی (شدت کم) براساس آخرین سنجش بود. مدت‌زمان اینتروال با شدت زیاد، ۴ دقیقه در هفته اول، ۶ دقیقه در هفته دوم و ۸ دقیقه از هفته سوم تا پایان هفته هشتم و برای شدت کم در سراسر دوره تمرینی دو دقیقه به همراه ۵ دقیقه گرم کردن و سرد کردن با شدت ۵۰٪ حداکثر اکسیژن مصرفی، در ابتدا و انتهای جلسات تمرین در نظر گرفته شد (۱۸).

طی ۲ هفته آشناسازی، تمرینات مقاومتی شامل بالا رفتن از نردبانی با شیب ۸۵ درجه، به‌طول ۱ متر و نرده‌های ۲ سانتی‌متری (بدون وزنه) بود. پروتکل اصلی تمرین، به مدت ۸ هفته و ۵ روز در هفته، به‌صورت سه دوره و هر دوره با ۵ تکرار اجرا شد که زمان استراحت بین تکرارها یک دقیقه و بین دوره‌ها ۲ دقیقه در نظر گرفته شد. میزان وزنه، ۳۰٪ وزن هر موش در اولین هفته از دوره تمرینی بود که با شرط موفقیت در اتمام دوره تمرینی در هر هفته، برای هفته بعد براساس اندازه‌گیری وزن هر موش در پایان هر هفته، ۱۰٪ افزایش می‌یافت. در صورت عدم موفقیت در انجام کامل دوره تمرینی در هر هفته، تمرینات با میزان وزنه قبلی انجام می‌شد (میزان وزنه، ۱۰٪ کاهش داشت). مقاومت در برابر بالا رفتن از نردبان، پس از سه بار اقدام و

ترغیب (لمس دُم حیوان)، معیاری برای توقف تمرین به دلیل عدم انجام کامل آن بود. بعد از رسیدن به بالای نردبان، حیوان در محل مربوطه و در زمان مشخص به استراحت می‌پرداخت (۱۹). گروه شاهد نیز تحت شرایط یکسان، به استثنای انجام فعالیت ورزشی، دوره ۸ هفته‌ای تحقیق را سپری کردند.

با توجه به مرگ‌ومیر و یا عدم همکاری در انجام تمرینات، تعداد نهایی موش‌ها در هر گروه (جهت تهیه بافت، انجام آزمایش‌ها و عملیات آماری) شامل: گروه مقاومتی (تعداد ۶)، گروه تناوبی پرشدت (تعداد ۸) و گروه شاهد (تعداد ۷) بود.

بدین منظور، پس از بیهوشی و خونگیری مستقیم از قلب حیوانات، بافت عضله نعلی از اندام عقبی جدا و پس از شست‌شو در سرم فیزیولوژیک، جهت انجام آزمایش‌ها مربوطه در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. بیان ژن‌های *MuRF1*, *Rps6kb1*, *AKT1* و *Map1LC3a* با استفاده از روش RT-PCR و اندازه‌گیری میزان پروتئین‌های *Rps6kb1* و *Map1LC3a* با استفاده از روش وسترن بلائینگ انجام شد.

RT-PCR (Real-Time Polymerase Chain Reaction):

استخراج RNA با استفاده از ۵۰ میلی‌گرم عضله نعلی و یک میلی‌لیتر کزازول، طبق پروتکل شرکت سازنده (کیاژن، آلمان) انجام گرفت. پس از ۲۴ ساعت پلاک موجود در میکروتیوب در حالت نیمه انجماد به‌وسیله سرمپلر خرد و کمی پیتاژ شد، سپس به نمونه حدود ۱۰۰ لاندا کلروفرم افزوده تا سلول‌ها لیز شوند. پس از یک دقیقه، محلول با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. پس از سانتریفوژ، مایع شفاف حاوی RNA را به همراه ۱ سی‌سی ایزوپروپانول درون یک میکروتیوب DEPC ریخته و به مدت یک دقیقه مخلوط و یک‌سب در دمای ۸۰- قرار گرفت، سپس نمونه‌ها با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند و پس از تخلیه مایع رویی، ۱ سی‌سی الکل ۷۰٪ اضافه گردید. پس از انجام ورتکس، مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۷۵۰۰ سانتریفوژ شد و در ادامه، مایع رویی در داخل میکروتیوب با سمپلر تخلیه و پلاک خشک گردید. به‌منظور حل کردن RNA، ۲۰ لاندا آب مقطر ۶۰ درجه به آن افزوده و پس از پیتاژ با سرمپلر، به مدت ۵ دقیقه بر روی صفحه ۶۰ درجه قرار داده شد.

جهت سنجش RNA استخراج شده، از دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ۲۶۰ نانومتر استفاده گردید. غلظت (OD) RNA به دست آمده برابر با ۱/۹۲ بود که نشان از خلوص RNA، عدم ترکیب با DNA و پروتئین داشت. هر آمپلی فیکیشن با سیستم ردیابی توالی

ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) SYBR Green/High ROX qPCR Master Mix و با استفاده از (Ampliqon, Denmark) طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. ۴۰ سیکل برای هر چرخه RT-PCR در نظر گرفته شد و دماهای هر سیکل شامل ۹۴ درجه سانتیگراد برای ۲۰ ثانیه،

۶۰-۵۸ درجه سانتیگراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد برای ۳۰ ثانیه تنظیم شد. نمودار ذوب جهت بررسی صحت واکنش‌های PCR انجام و به صورت اختصاصی برای هر ژن مورد ارزیابی قرار گرفت. نسبت بیان ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه، با روش مقایسه‌ای چرخه آستانه (Threshold Cycle) ارزیابی شد. *Gapdh* به عنوان ژن مرجع در نظر گرفته شد و میزان بیان ژن هدف با ژن مرجع نرمالیز شده و بیان ژن‌های گروه سالم به عنوان کالیبراتور به دست آمد.

توالی و شناسه ژن‌های مورد استفاده در تحقیق حاضر در جدول شماره ۱ آمده است.

جدول شماره ۱. توالی پرایمر ژن‌ها براساس اطلاعات بانک ژن

نام ژن	پرایمر به جلو (Forward primer)	آغازگر معکوس (Reverse primer)	شناسه ژن
<i>AKT1</i>	5'-TGTGGGAAGATGTGTATGAGAA-3'	5'-TTGATGAGGCGGTGTGATGGTGA-3'	۲۴۱۸۵
<i>Rps6kb1</i>	5'-GTGTTGTGGATTGGTGGAGT-3'	5'-TTGTTGTGTGAGGTAGGGAGG-3'	۸۳۸۴۰
<i>MuRF1</i>	5'-GGTGTGACGAAGGTGGAAGAGA-3'	5'-CAAGGCAGATGGGGCAGATGAG-3'	۱۴۰۹۳۹
<i>Map3LC3a</i>	5'-GGGTGGATTAGGCAGAGATGTGA-3'	5'-GATGAGGGGCAAGATGGGTAGA-3'	۳۶۲۲۴۵
<i>Gapdh</i>	5'-AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG-3'	5'-CATACTCAGCACCAGCATCACC-3'	۱۰۸۳۵۱۱۳۷

وسترن بلائینگ (Western blotting):

بافت عضله نعلی، پس از شست‌وشو دادن با بافر PBS سرد، در یک میکروتیوب به همراه ۱ میلی لیتر بافر لیزکننده سلولی RIPA (Abcam, Cambridge, UK) و ۱٪ مهارکننده پروتئازها با دستگاه یکنواخت سازنده (Sigma) خرد و یکنواخت شد. سپس برای لیز شدن کامل به مدت ۲ ساعت روی ظرف یخ قرار گرفت. پس از سانتریفوژ با دور ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه، بخش شناور در بالا جمع‌آوری و غلظت پروتئین‌های موجود در آن با استفاده از کیت BCA (Thermo, Pierce, USA) تعیین گردید. لیزات هریک از بافت‌ها به میزان ۶۰ میکروگرم روی ژل پلی آکریل آمید ۱۰٪ در شرایط احیاشده، الکتروفورز شد، سپس پروتئین‌های الکتروفورز شده به کاغذ PVDF منتقل و با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال اولیه انکوبه شدند. آنتی‌بادی ثانویه HRP-Rabbit بر علیه آنتی‌بادی اولیه (با رقت ۱:۱۰۰۰ در PBS-T) نیز به مدت ۱/۵ ساعت روی دستگاه تکان‌دهنده انکوبه شد و مجدداً عمل شست‌وشو انجام گرفت. در نهایت، با افزودن سوبسترای DAB به کاغذ PVDF، میزان حضور در نمونه‌ها بررسی و در کنار نمونه‌ها، یک نمونه دیگر از لیزات به عنوان

کنترل منفی با همان غلظت الکتروفورز شد. شرایط وسترن بلات برای کنترل منفی مشابه سایر نمونه‌ها بود، با این تفاوت که این نمونه در مجاورت آنتی‌بادی اولیه قرار نگرفت. تحقیق حاضر در کمیته اخلاق پژوهشی (با کد اخلاق IR.PNU.REC.1397.34) به تصویب رسید.

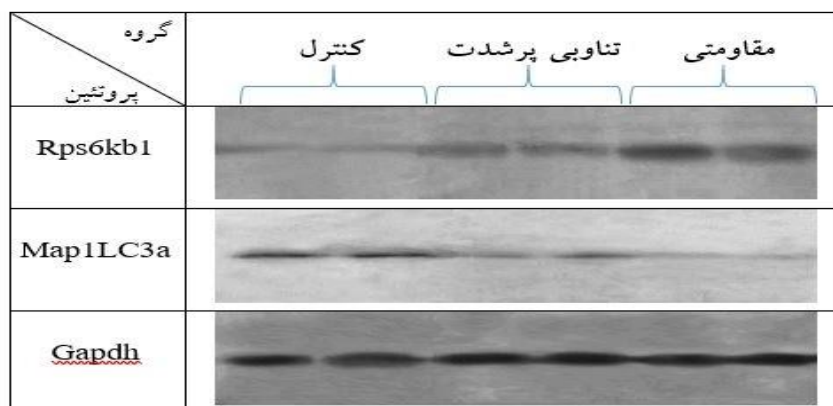
نتایج مربوط به تکثیر ژن‌ها، حاصل از RT-PCR در فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ قرار داده شد و از مقادیر مربوط به میزان نسبی بیان هر ژن، برای انجام عملیات آماری استفاده شد. آمار توصیفی به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار و در صورت لزوم توسط خطای معیار گزارش گردید.

داده‌ها به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۴، آزمون شاپیرو-ویلک (جهت تعیین نرمال بودن توزیع داده‌ها)، آزمون واریانس یک‌طرفه (برای تعیین تفاوت بین گروهی متغیرهای با توزیع طبیعی)، آزمون توکی، آزمون ناپارامتریک کروسکال والیس و آزمون من‌ویتنی در سطح معنی‌داری، $\alpha < 0.05$ تحلیل شدند.

یافته‌ها

شکل زیر حاوی تصویر مربوط به تجزیه و تحلیل وسترن بلات، برای ژن *Rps6kb1* در مسیر سنتز پروتئین و ژن *Map1LC3a* مربوط به مسیر تجزیه پروتئین، همچنین *Gapdh* به عنوان ژن رفرنس است. همان گونه که مشاهده می‌شود میزان *Rps6kb1* در گروه‌های تمرینی نسبت به گروه شاهد افزایش داشته و برعکس

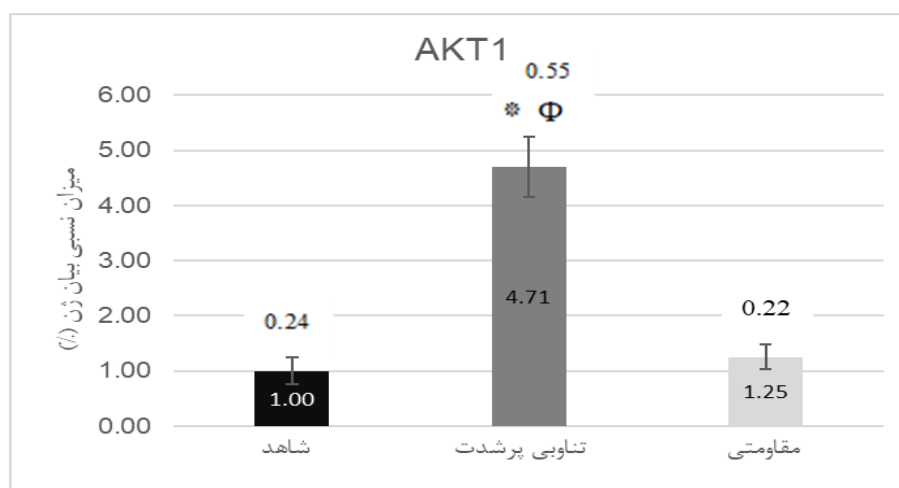
تصویر مربوط به *Map1LC3a* کاهش را نشان می‌دهد. این نتایج بیانگر آن است که پروتکل‌های تمرینی، به خصوص پروتکل مقاومتی، در افزایش بیان ژن *Rps6kb1* در مسیر سنتز پروتئین و سرکوب در مسیر تجزیه پروتئین عضله اسکلتی موش‌های صحرایی مؤثر بوده‌اند.



شکل: نتایج تجزیه و تحلیل سنجش میزان بیان پروتئین‌های *Rps6kb1*، *Map1LC3a* و *Gapdh* در سه گروه.

مطابق نمودار شماره ۱، افزایش بیان این ژن در گروه تناوبی پرشدت به حدی بود که نه تنها با گروه شاهد ($p < 0.001$)، بلکه با گروه مقاومتی نیز تفاوت معنی‌داری داشت ($p = 0.001$).

در ارتباط با عوامل این مسیر، براساس نتایج حاصل از آزمون‌های ناپارامتریک، در میزان بیان ژن *AKT1*، تفاوت بین گروهی معنی‌داری مشاهده گردید ($p = 0.001$).

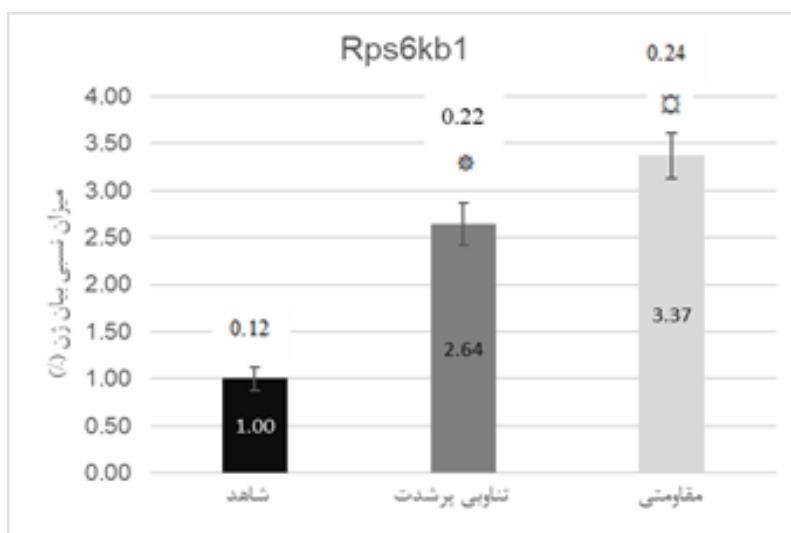


نمودار شماره ۱: میزان نسبی بیان ژن *AKT1* نسبت به ژن *Gapdh* در سه گروه.

Φ تفاوت معنی‌دار با گروه مقاومتی $p = 0.001$ ، * تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد $p < 0.001$
مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار می‌باشد.

و گروه تمرینی مقاومتی در افزایش روند سنتز پروتئین به طور غیرمعنی‌داری مؤثرتر از تناوبی پرشدت بود ($p = 0.061$) (نمودار شماره ۲).

با توجه به نتایج آزمون تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه ($p < 0.001$)، هر دو پروتکل ورزشی مقاومتی و تناوبی پرشدت باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن *Rps6kb1* شد (هر دو $p < 0.001$).



نمودار شماره ۲: میزان نسبی بیان ژن *Rps6kb1* نسبت به ژن *Gapdh* در سه گروه.

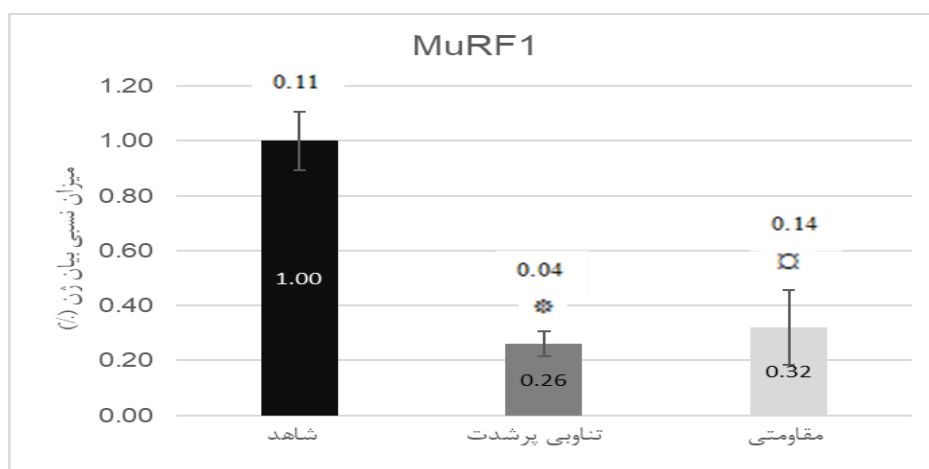
* و ** تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد $p < 0.001$

مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار می‌باشد.

(به ترتیب $p = 0.002$ و $p = 0.040$) و این افزایش در گروه مقاومتی تا حدی بود که تفاوت آن با گروه تمرینی تناوبی پرشدت، معنی‌دار بود ($p = 0.026$).

در ارتباط با عوامل مسیر تجزیه پروتئین، آزمون‌های ناپارامتریک میزان تغییرات بیان *MuRF1* در بین گروه‌ها را معنی‌دار نشان داد ($p = 0.003$)؛ به‌طوری‌که انجام هر دو پروتکل ورزشی باعث سرکوب بیان این ژن نسبت به گروه شاهد شد (به ترتیب $p = 0.014$ و $p < 0.001$) و تمرین تناوبی پرشدت در سرکوب این ژن به‌طور غیرمعنی‌داری مؤثرتر از تمرین مقاومتی بود (نمودار شماره ۳).

علاوه بر این، *Gapdh* به‌منظور تعیین میزان بیان پروتئین *(Rps6kb1)*، به‌عنوان عامل انتهایی مسیر سیگنالینگ سنتز پروتئین، نسبت به ژن مرجع از روش وسترن‌بلاتینگ استفاده شد (شکل). نتایج تجزیه و تحلیل روند وسترن‌بلاتینگ شامل: گروه مقاومتی، 1.0 ± 0.17 ؛ گروه تناوبی پرشدت، 0.92 ± 0.09 و گروه شاهد، 0.9 ± 0.02 بود. نتایج آزمون آماری تجزیه و تحلیل واریانس یک‌طرفه، تفاوت معنی‌دار بین گروهی را نشان داد ($p = 0.001$). براساس آزمون توکی، تقریباً متناسب و منطبق با نتایج *RT-PCR*، میزان بیان پروتئین *Rps6kb1* در گروه‌های تمرینی مقاومتی و تناوبی پرشدت نسبت به گروه شاهد، افزایش معنی‌داری داشت.



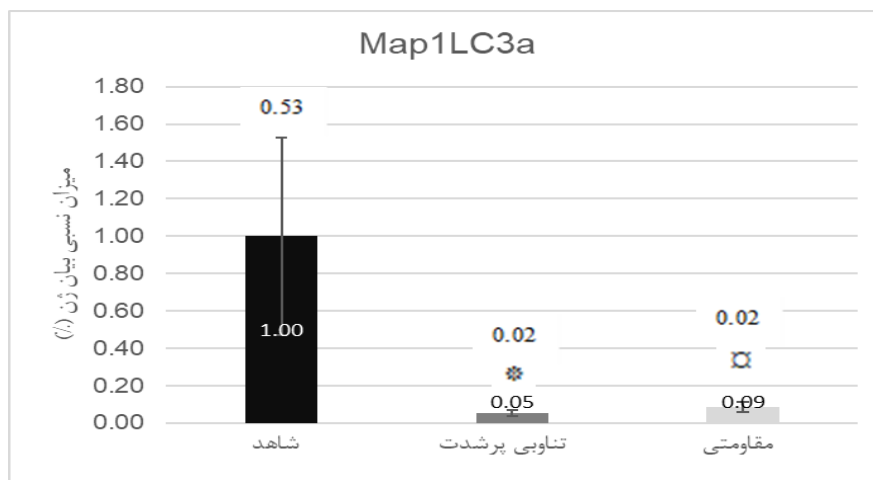
نمودار شماره ۳: میزان نسبی بیان ژن *MuRF1* نسبت به ژن *Gapdh* در سه گروه.

* تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد $p = 0.014$ و ** تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد $p < 0.001$

مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار می‌باشد.

پرشدت باعث کاهش معنی‌داری در بیان این ژن شدند (به ترتیب $p=0/022$ و $p=0/004$) که تمرین تناوبی پرشدت در مهار این ژن به‌طور غیرمعنی‌داری مؤثرتر از تمرین مقاومتی بود (نمودار شماره ۴).

آزمون کروسکال والیس، تفاوت معنی‌داری در تغییرات بیان ژن *Map1LC3a* به‌عنوان عامل انتهایی مسیر تجزیه پروتئین عضله نعلی موش‌های صحرایی نشان داد ($p=0/007$). براساس نتایج آزمون من‌ویتنی، هر دو پروتکل ورزشی مقاومتی و تناوبی



نمودار شماره ۴: میزان نسبی بیان ژن *Map1LC3a* نسبت به ژن *Gapdh* در سه گروه. $\square$ تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد $p=0/022$ * تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد $p=0/004$ مقادیر به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار می‌باشد.

Rps6kb1 (مسیر سنتز پروتئین) و تمرین تناوبی پرشدت در سرکوب *Map1LC3a* (مسیر تجزیه پروتئین) مؤثرتر بوده‌اند. در مطالعه حاضر، بیان ژن *AKT1* در هر دو پروتکل تمرینی افزایش داشت، اما این افزایش در گروه تناوبی پرشدت نسبت به گروه مقاومتی معنی‌دار بود (نمودار شماره ۱). این یافته هم‌راستا با نتیجه مطالعه‌ای است که بر روی موش‌های ترانس ژنتیک انجام شد و نشان داد مسیر *AKT*، مسیر اصلی هاپیروتروفی ناشی از تمرینات ورزشی است. فعالیت پروتئین *AKT* سوبستراهای متفاوت درون‌سلولی را در تنظیم رشد فسفوریله می‌کند و زمانی که *AKT1* سرکوب گردد، رشد فیزیولوژیکی و سازگاری‌های همودینامیکی کاهش می‌یابد (۵). به‌علاوه، تجزیه پروتئین توسط mTOR سرکوب می‌شود که به‌نوبه خود به‌طور مستقیم و غیرمستقیم تحت تأثیر سطح اسیدهای آمینه داخل سلولی، عوامل رشدی و وضعیت انرژی سلول نیز قرار می‌گیرد. پروتئین P70S6K (Rps6kb1)، عامل پایین‌دستی مسیر *AKT/mTOR/ P70S6K* در سنتز پروتئین است و mTOR به‌عنوان یک عامل کلیدی در یک‌پارچه کردن این عوامل مورد توجه است.

در همین ارتباط به‌منظور تأیید نتایج حاصل از RT-PCR مربوط به سرکوب ژن *Map1LC3a* ناشی از انجام هر دو پروتکل ورزشی، اقدام به سنجش پروتئین مربوطه شد (شکل). براساس نتایج تجزیه و تحلیل روند وسترن‌بلاتینگ، میزان بیان پروتئین *Map1LC3a* نسبت به ژن مرجع (*Gapdh*) در گروه‌ها شامل: گروه مقاومتی ($0/0 \pm 59/01$)، گروه تناوبی پرشدت ($0/0 \pm 98/11$) و گروه شاهد ($1/0 \pm 49/11$) بود. نتایج آزمون تجزیه و تحلیل واریانس یک‌طرفه، تفاوت بین گروهی معنی‌داری ($p < 0/012$) را نشان داد. نتایج آزمون تعقیبی توکی این تفاوت را بین گروه تمرینی مقاومتی و پرشدت با گروه شاهد نشان داد (به ترتیب $p=0/009$ و $p=0/043$)، درحالی‌که بین دو گروه تجربی، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p=0/192$).

بحث

نتایج تحقیق حاضر بیانگر آن است که هر دو پروتکل تمرینی، اثرات تقریباً مشابه و تکمیلی در افزایش عوامل درگیر در سنتز و کاهش عوامل درگیر در تجزیه پروتئین عضله نعلی موش‌های صحرایی دارند، با این تفاوت که تمرین مقاومتی در افزایش

نتایج تحقیقات بر روی انسان و موش‌های صحرایی نشان داده است mTORC1 در اثر تمرینات مقاومتی، با فسفریله کردن Rps6kb1 در ناحیه تیروزین ۳۸۹ موجب افزایش روند سنتز پروتئین می‌شود، همچنین 4E-BP1 که با اتصال به eIF4E و تشکیل eIF4E-BP1 آغاز مرحله ترجمه و در نتیجه روند سنتز را مهار می‌کند، یکی دیگر از اهداف پایین‌دستی مسیر AKT/mTOR می‌باشد. درواقع، mTOR با فسفریله کردن و مهار 4E-BP1، از اتصال آن به eIF4E جلوگیری کرده که در نتیجه مرحله ترجمه و سنتز پروتئین آغاز می‌گردد. مطالعات نشان داده‌اند انجام حتی یک مرحله فعالیت ورزشی مقاومتی منجر به فعال شدن مسیر mTOR شده که عدم تغییر در میزان سنتز پروتئین عضلات، تنها تفاوت آن با یافته تحقیق حاضر است و علت احتمالی آن نیز طول مدت تمرین می‌باشد (۲۲-۲۰)؛ چراکه مشخص شده کاهش هایپرتروفی فیزیولوژیک تنها از طریق مهار و ممانعت از عملکرد mTORC1 به وسیله راپامایسین امکان‌پذیر است (۲۴، ۲۳). به علاوه، مسیر AKT/mTOR/ P70S6K ضمن مهار eEF2K باعث فعال شدن eEF2، یکی از عوامل کلیدی سنتز پروتئین و روند تولید سازی می‌شود (۲۵). در تحقیق حاضر نتایج حاصل از RT-PCR نشان داد بیان Rps6kb1 در اثر انجام هر دو پروتکل ورزشی نسبت به گروه شاهد، افزایش معنی‌داری داشته بود (نمودار شماره ۲). در همین راستا، نتایج حاصل از وسترن بلات، تأییدی بر صحت تغییرات Rps6kb1 بوده (شکل و نمودار شماره ۳) که در نتیجه می‌تواند به افزایش روند سنتز پروتئین عضله اسکلتی موش‌های صحرایی منجر گردد.

در تحقیق حاضر، دو پروتکل ورزشی باعث کاهش معنی‌داری بیان ژن *MuRF1* (پروتئین تخریب‌کننده بافت عضلانی) نسبت به گروه شاهد شد که مقدار این کاهش در گروه تناوبی پرشدت نسبت به گروه مقاومتی به‌طور غیرمعنی‌داری بیشتر بود. این تغییرات نشان‌دهنده تأثیر بالای پروتکل تناوبی پرشدت در کاهش فعالیت این ژن است (نمودار شماره ۴). نتایج تحقیقی بر روی انسان نشان داد میزان *MuRF1* در اثر انجام هشت هفته تمرین مقاومتی هنگام هایپرتروفی، افزایش و در دوره بی‌تمرینی بعد از تمرین و در جریان مرحله تحلیل عضله (Atrophy)،

کاهش می‌یابد که با نتایج تحقیق حاضر مغایرت داشت. دلیل این تناقض براساس گزارش تحقیقی می‌تواند ناشی از فعالیت بیشتر مسیر سیگنالینگ AKT در حیوانات نسبت به انسان باشد و تحت تأثیر شرایط برخلاف آزمودنی‌های سالم در تحقیق حاضر، افزایش *MuRF1* هنگام هایپرتروفی در شرایط پاتولوژیک رخ داده است (۲۶، ۲۷). در مقابل، اخیراً نتایج مطالعه‌ای بر روی بیماران مبتلا به نارسایی مزمن قلبی نشان داده است تمرینات ورزشی می‌تواند باعث مهار *MuRF1* و در نتیجه سیستم تجزیه پروتئین عضله اسکلتی، عضله پهن خارجی ران، هم در آزمودنی‌های مسن (با میانگین سنی ۷۲ سال) و هم جوان (با میانگین سنی ۴۶ سال) شود. به دلیل آنکه *MuRF1* یکی از اجزاء سیستم یوئیکوتیتین - پروتئوزوم E3 بوده و در تجزیه عضلات، به‌ویژه در بیماری مزمن قلبی مشارکت دارد؛ لذا میزان آن در این بیماران افزایش می‌یابد. در تحقیق حاضر، کاهش این ژن در اثر انجام پروتکل‌های تمرینی، به‌ویژه تناوبی پرشدت، نشان‌دهنده تأثیر مثبت آن‌ها در سرکوب بیان ژن *MuRF1* و جلوگیری از تحلیل عضلانی بود. عوامل رونویسی خانواده سرچنگالی FOXO، قادر به فعال کردن هر دو لیگاز E3 (*MuRF1* و *MAFbx*) بوده که در نتیجه افزایش تجزیه پروتئین را در پی دارد (۲۸)؛ این در حالی است که mTOR، عامل فعال‌کننده روند سنتز پروتئین و هدف پایین‌دست AKT، با فسفریله کردن خانواده FOXO و مهار آن‌ها، از تجزیه پروتئین و آتروفی حاصل از بیان ژن *MuRF1* جلوگیری می‌کند (۶)؛ ضمن آنکه AKT به‌نوبه خود می‌تواند با فسفریله و غیرفعال کردن FOXO از القای روند آتروفی جلوگیری کند (۲۱). نکته قابل توجه و مهمی که در تفاوت نتایج تحقیقات در مورد تغییرات عوامل درگیر در روند آتوفازی و تجزیه پروتئین عضلات اسکلتی ناشی از انجام فعالیت ورزشی وجود دارد و ضروری است هنگام طراحی تمرینات ویژه بیماران و افراد مسن مورد توجه قرار گیرد؛ نوع، مدت و شدت فعالیت ورزشی است. اخیراً در مطالعه‌ای گزارش شده است انجام فعالیت ورزشی استقامتی، نه مقاومتی و نه تناوبی پرشدت باعث بیان بیشتر پروتئین‌های آتوفازی؛ از قبیل Beclin1، Atg7 و Lc3 در موش‌های ترانس ژنتیک صوری، فاقد Pgc-1α می‌شود و اساساً افزایش عوامل آتوفازی تا یک حد پایه

در همین راستا، کاهش این عامل که توسط نتایج حاصل از وسترن‌بلات مورد تأیید قرار گرفت (شکل و نمودار شماره ۶)، می‌تواند نشان‌دهنده کاهش میزان روند تجزیه پروتئین و کمک به حفظ توده عضلانی باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد پروتکل ورزشی مقاومتی در افزایش بیان ژن‌های درگیر در مسیر سنتز پروتئین و پروتکل تناوبی پرشدت در مهار بیان ژن‌های مرتبط با تجزیه پروتئین عضله نعلی موش‌های صحرایی تأثیر بیشتری دارند، اگرچه تأثیر هر دو پروتکل در این مسیرها معنی‌دار بود؛ بنابراین استفاده همزمان از این پروتکل‌ها به‌منظور کاهش آتروفی عضلانی در شرایط پاتولوژیک و سالمندی، همچنین افزایش قدرت عضلانی ورزشکاران به‌منظور بهبود عملکرد می‌تواند موردتوجه قرار گیرد.

برای سازگاری عضلات اسکلتی با این نوع تمرینات و بهبود عملکرد جسمانی ضروری است؛ ضمن آنکه تغییرات موقتی این عوامل بعد از انجام یک حله فعالیت ورزشی نیز باید موردتوجه قرار گیرد (۲۹). با در نظر گرفتن نقش LC3 (*Map1LC3a*) در هنگام تشکیل اتوفاگوزوم (۱۶)، نشان داده شده است یک دوره فعالیت ورزشی تناوبی به همراه مصرف ذرات سلنیوم، به‌تنهایی توانسته از طریق تأثیر بر عوامل تنظیم‌کننده آتوفاژی مانند LC3 و mTOR تا حد زیادی از آتروفی عضلانی در موش‌های مبتلا به سرطان جلوگیری و به حفظ بافت عضلانی کمک کند، اگرچه محققین جهت افزایش صحت و تأکید در سنجش عوامل، از روش وسترن‌بلات استفاده نکرده‌اند (۳۰)، اما نتایج تحقیق حاضر بیانگر آن است که هر دو پروتکل ورزشی، به‌ویژه پروتکل تناوبی پرشدت، تأثیر معنی‌داری بر کاهش بیان ژن *Map1LC3a* نسبت به گروه شاهد دارد (نمودار شماره ۵).

References:

1. Siparsky PN, Kirkendall DT, Garrett Jr WE. Muscle changes in aging: understanding sarcopenia. *Sports Health* 2014;6(1):36-40. Link
2. Volpi E, Nazemi R, Fujita S. Muscle tissue changes with aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004;7(4):405-10. Link
3. Watson K, Baar K. mTOR and the health benefits of exercise. *Semin Cell Dev Biol* 2014;36:130-9. PubMed
4. Egerman MA, Glass DJ. Signaling pathways controlling skeletal muscle mass. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2014;49(1):59-68. PubMed
5. Kraemer WJ, Ratamess NA. Fundamentals of resistance training: progression and exercise prescription. *Med Sci Sports Exerc* 2004;36(4):674-88. PubMed
6. Goodman CA, Frey JW, Mabrey DM, Jacobs BL, Lincoln HC, You JS, et al. The role of skeletal muscle mTOR in the regulation of mechanical load-induced growth. *J Physiol* 2011;589(22):5485-501. PubMed
7. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 2001;294(5547):1704-8. PubMed
8. Delgoffe GM, Powell JD. mTOR: taking cues from the immune microenvironment. *Immunology* 2009;127(4):459-65. PubMed
9. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2(7):489-501. PubMed
10. Nemati J, Samadi M, Hadidii V, Makintash B. Effect of resistance training on mTOR and P70S6K Signalling pathway in skeletal muscle of rats. *J Physiol Exerc Physic Activ* 2014;15:1149-56. [Full Text in Persian] Link
11. Ozaki H, Kakigi R, Kobayashi H, Loenneke JP, Abe T, Naito H. Effects of walking combined with restricted leg blood flow on m TOR and MAPK signalling in young men. *Acta Physiol* 2014;211(1):97-106. PubMed

12. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol* 2010;221(1):3-12. PubMed
13. Dobrowolny G, Aucello M, Rizzuto E, Beccafico S, Mammucari C, Boncompagni S, et al. Skeletal muscle is a primary target of SOD1G93A-mediated toxicity. *Cell Metab* 2008;8(5):425-36. PubMed
14. Morimoto N, Nagai M, Ohta Y, Miyazaki K, Kurata T, Morimoto M, et al. Increased autophagy in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. *Brain Res* 2007;1167:112-7. PubMed
15. Sandri M, Lin J, Handschin C, Yang W, Arany ZP, Lecker SH, et al. PGC-1alpha protects skeletal from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(44):16260-5. PubMed
16. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 2000;19(21):5720-8. PubMed
17. Hoydal MA, Wisloff U, Kemi OJ, Ellingsen O. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2007;14(6):753-60. PubMed
18. Kemi OJ, Haram PM, Loennechen JP, Osnes JB, Skomedal T, Wisløff U, et al. Moderate vs. high exercise intensity: differential effects on aerobic fitness, cardiomyocyte contractility, and endothelial function. *Cardiovasc Res* 2005;67(1):161-72. PubMed
19. Yoon A, Hong JY, Choi SM, Hahn DW, Kim KJ, Lee SH. Comparison of Multiple Sets and Progressive Single Set of Resistance Training on Muscle Mass and Strength in Rat. *Exerc Sci* 2015;24(3):267-74. Link
20. Song Z, Moore DR, Hodson N, Ward C, Dent JR, O'Leary MF, et al. Resistance exercise initiates mechanistic target of rapamycin (mTOR) translocation and protein complex co-localisation in human skeletal muscle. *Sci Rep* 2017;7(1):5028. PubMed
21. Medeiros C, Frederico MJ, da Luz G, Pauli JR, Silva AS, Pinho RA, et al. Exercise training reduces insulin resistance and upregulates the mTOR/p70S6k pathway in cardiac muscle of diet-induced obesity rats. *J Cell Physiol* 2011;226(3):666-74. PubMed
22. Takegaki J, Ogasawara R, Tamura Y, Takagi R, Arihara Y, Tsutaki A, et al. Repeated bouts of resistance exercise with short recovery periods activates mTOR signaling, but not protein synthesis, in mouse skeletal muscle. *Physiol Rep* 2017;5(22):e13515. PubMed
23. Chen JK, Chen J, Neilson EG, Harris RC. Role of mammalian target of rapamycin signaling in compensatory renal hypertrophy. *J Am Soc Nephrol* 2005;16(5):1384-91. PubMed
24. Shioi T, McMullen JR, Tarnavski O, Converso K, Sherwood MC, Manning WJ, et al. Rapamycin attenuates load-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation* 2003;107(12):1664-70. PubMed
25. Johanns M, dit Ruys SP, Houddane A, Vertommen D, Herinckx G, Hue L, et al. Direct and indirect activation of eukaryotic elongation factor 2 kinase by AMP-activated protein kinase. *Cell Signal* 2017;36:212-21. PubMed
26. Léger B, Cartoni R, Praz M, Lamon S, Dériaz O, Crettenand A, et al. Akt signalling through GSK-3 β , mTOR and Foxo1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *J Physiol* 2006;576(3):923-33. PubMed
27. Crepaldi T, Bersani F, Scuoppo C, Accornero P, Prunotto C, Taulli R, et al. Conditional activation of MET in differentiated skeletal muscle induces atrophy. *J Biol Chem* 2007;282(9):6812-22. PubMed
28. Gielen S, Sandri M, Kozarez I, Kratzsch J, Teupser D, Thiery J, et al. Exercise training attenuates MuRF-1 expression in the skeletal muscle of patients with chronic heart failure independent of age: the randomized leipzig exercise intervention in chronic heart failure and aging catabolism study. *Circulation* 2012;125(22):2716-27. PubMed
29. Lira VA, Okutsu M, Zhang M, Greene NP, Laker RC, Breen DS, Hoehn KL, Yan Z. Autophagy is required for exercise training-induced skeletal muscle adaptation and improvement of physical performance. *FASEB J* 2013;27(10):4184-93. PubMed
30. Ranjbar K, Agha Alinejad H, Shahbazi Sh, Molanori Shamsi M. The effect of interval training and selenium nanoparticles on mTOR and LC3 mRNA expression in mice bearing breast cancer. *J Sport Biosci* 2016;10(2):177-92. [Full Text in Persian] Link