

تأثیر تمرین با شدت بالا و بی‌تمرینی بر سطوح FOXO3a، MAFbx و MuRF1 در عضله نعلی موش‌های نر

شهین شبانی^۱، *فرهاد دریانوش^۲، محسن ثالثی^۲، مریم کوشکی جهرمی^۲، نادر تنیده^۲

چکیده

مقدمه: عدم فعالیت می‌تواند با فعال کردن مسیرهای سیگنالینگ پروتئوزومی منجر به از دست دادن حجم عضله و متعاقباً قدرت شود که این امر منجر به کاهش کیفیت و انتظارات مورد نظر در زندگی می‌شود. هدف از این مطالعه تعیین اثر تمرین با شدت مضاعف و بی‌تمرینی بر مسیر سیگنالینگ FOXO3a، MAFbx و MuRF1 بود.

روش بررسی: در این پژوهش ۳۲ سر موش نر ۲ ماهه نژاد اسپراگ‌داولی استفاده شده است. تمرین تناوبی با شدت ۸۵ تا ۱۰۰٪ VO_{2max} به مدت شش هفته انجام شد. سپس گروه‌ها (بی‌تمرینی ۴۸ ساعت، ۷ روز و ۱۴ روز) بی‌تمرین شدند و عضله نعلی از اندام تحتانی جدا شد. از روش رنگ آمیزی H&E و هیستوشیمی بافتی برای سنجش میزان و درصد نوع تارهای عضله اسکلتی و از روش RT-PCR برای بررسی تغییرات ژن‌ها استفاده شد.

یافته‌ها: میانگین وزن عضله نعلی بعد از تمرین افزایش و بعد از دوره بی‌تمرینی کاهش معناداری داشت ($p=0/001$). تبدیل نوع تار از I به II صورت گرفت ($p=0/001$). هایپرتروفی در تارها بعد از تمرین با شدت مضاعف و آتروفی بعد از بی‌تمرینی در تارهای نوع II مشاهده شد ($p=0/001$). سطوح FOXO3a و MAFbx و همچنین بیان ژن MuRF1 بعد از تمرین افزایش و بعد از دوره بی‌تمرینی کاهش معناداری داشت ($p=0/001$).

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش بیان می‌کند تمرین نتوانست مانع از ایجاد آتروفی در دوره بی‌تمرینی شود همچنین فعال شدن مسیر FOXO3a/MAFbx و نه FOXO3a/MuRF1 ایجاد کننده آتروفی در دوره بی‌تمرینی است و احتمالاً MuRF1 هدف غیرمستقیم FOXO3a است و همیشه نمی‌تواند به عنوان یک نشانگر مناسب در آتروفی باشد. احتمالاً MuRF1 در وضعیت‌های آتروفی پاتولوژیکی نقش مهمتری دارد.

واژگان کلیدی: فعالیت بدنی، آتروفی، هایپرتروفی، موش

مقدمه

عضلات اسکلتی، نقش قابل توجهی در سلامتی و بیماری‌ها دارند. حجم عضلانی مناسب برای سلامتی و بقاء زیستی ضروری است و نقش مهمی در تحرک، حالات بیماری و مرگ و میر دارد. سنتز و تخریب پروتئین‌ها، بخشی از عملکرد طبیعی متابولیسم و هموستاز است و این ویژگی به عضلات اجازه می‌دهد که با توجه به محرک و بار وارد شده سازگار شوند. افزایش در واحدهای انقباضی سبب افزایش حجم عضله و در نتیجه افزایش قدرت می‌گردد که عامل مهمی در فعالیت‌های ورزشی و سلامتی به شمار می‌رود. بر عکس، عدم فعالیت یا کاهش بار می‌تواند منجر به از دست دادن حجم و متعاقباً قدرت شود که این امر منجر به کاهش کیفیت و انتظارات مورد نظر در زندگی می‌شود [۱]. آتروفی عضلانی، ناشی از کاهش سنتز پروتئین‌ها و احتمالاً افزایش تخریب پروتئین‌ها است که می‌تواند در اثر بی‌تمرینی بعد از یک دوره تمرینی و یا در اثر برخی از بیماری‌ها روی دهد. آتروفی عضلانی یکی از مهمترین علایم بیماری‌های عصبی عضلانی و از دست دادن حجم عضلات در ورزشکاران است. مشخصات آتروفی عضلانی، کوچک شدن، کاهش یا ناپدید شدن فیبرهای عضلانی است و به سه نوع تقسیم شود: ۱) عدم استفاده از عضلات که متداولترین نوع است و در اثر بیماری یا فقدان ورزش به مدت طولانی روی می‌دهد [۲، ۳]؛ ۲) آتروفی عضلانی میوژنیک [۴، ۵]؛ و ۳) آتروفی عضلانی نوروژنیک [۶]. تجزیه پروتئین اساساً از طریق سه مسیر انجام می‌گیرد اما تصور می‌شود که مسیر یوبی‌کوئین پروتئوزوم (UPP) نقش بسیار مهمی تری در آتروفی عضلانی دارد [۷]. تمرینات بدنی نوعی از فشار هستند که مسیرهای سیگنالینگ درگیر در سازگاری‌های متابولیکی و مورفولوژیکی را تعدیل می‌کنند. امروزه مشخص شده است که تمرینات ورزشی به ویژه تمرینات استقامتی اثرات مثبتی در عملکرد ورزشی دارند. اگرچه برخی از

مطالعات نشان داده‌اند که اجرای تمرینات با شدت بالا (HIT) نیز می‌تواند در مدت زمان کوتاهتر همان سازگاریهای ناشی از تمرینات استقامتی را در پی داشته باشد [۸]. پتانسیل تغییرات سریع در ظرفیت اکسیداتیو عضلات اسکلتی، بدون شک به توانایی اینگونه تمرینات در پاسخ‌دهی به سطوح بالای استرس وابسته است اما مکانیسم عمل ناشناخته باقی مانده است. برخی پژوهش‌ها نشان داده‌اند که با تمرینات HIT سازگاری‌های مورد نیاز سریعتر به دست می‌آیند که این موضوع در زمان کمبود وقت برای ورزشکاران اهمیت ویژه‌ای دارد. نتایج مطالعات نشان داده‌اند که تنظیم کننده کلیدی آنزیم‌های اکسیداتیو، در تعدادی از انواع سلول‌ها از جمله عضلات اسکلتی، PGC1 α است [۹] که به طور قوی در متابولیسم اکسیداتیو عمل می‌کند و بیان آن در عضلات اسکلتی سبب بسیاری از تغییرات وابسته به فعالیت‌های استقامتی از قبیل بیوژنز میتوکندریایی و تغییر نوع تار عضلانی و مقاومت در برابر آتروفی می‌شود [۱۰]. افزایش PGC1 α در اثر تمرینات ورزشی، اثرات زیادی بر استقامت عضله دارد. اخیراً شاهد بوده‌ایم که ۶ هفته تمرین HIT نیز PGC1 α را افزایش داد و اثری مشابه با تمرینات استقامتی دارد [۱۱]. هر دو نوع تمرین HIT و ET^۱، افزایش PGC1 α را نشان داده‌اند، با این تفاوت که مکانیسم اثر تمرینات استقامتی مشخص و تمرینات HIT نامشخص است [۱۲]. مشخص شده است که پروتئین تجزیه کننده بافت عضلانی به نام FOXO، با کوفاکتور حیاتی در بیوژنز میتوکندری یعنی PGC1 α اثر متقابلی دارد و سطوح بالای PGC1 α می‌تواند سبب مهار این فاکتور تخریب کننده پروتئین عضلانی شود. بنابراین PGC1 α از طریق مهار رونوشت فاکتورهای پیش-آتروفی از فعال شدن سیستم پروتئولیتیک جلوگیری می‌کند بدون اینکه تأثیری در اندازه

2. High-intensity training
3. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
4. endurance training

1. Ubiquitin Proteasome Pathway

از تمرین مشاهده شد [۲۰]. به نظر می‌رسد تنظیم MuRF1 و MAFbx و FOXO به نوع و شدت تمرین، همچنین سابقه ورزشی فرد بستگی دارد [۲۱]. با توجه به اینکه FOXO، MuRF1 و atrogen-1 مولکول‌های کلیدی درگیر در آتروفی عضلات اسکلتی هستند [۲۲] اما نتایج متناقض و کمی به ویژه در قسمت آتروفی ناشی از بی‌تمرینی وجود دارد. بنابراین می‌توان آنها را به شکل قوی در مطالعات آتروفی عضلانی مورد بررسی قرار داد.

در این پژوهش اثر تمرین HIT بر سطوح FOXO3a، MAFbx و MuRF1 به عنوان فاکتورهای محرک تخریب بافت عضلانی بررسی شد و هدف این بود که نشان داده شود آیا پروتئین‌های پایین دست FOXO3a درگیر در آتروفی MAFbx و/یا MuRF1 در دوره بی‌تمرینی نقش خواهند داشت و آیا سازگاری احتمالی ایجاد شده می‌تواند در پیشگیری یا به حداقل رساندن آتروفی ناشی از بی‌تمرینی پس از یک دوره تمرین مؤثر باشد؟

روش بررسی

این پژوهش از نوع تجربی بنیادی بوده و ۳۲ سر موش نر ۲ ماهه نژاد اسپراگ‌داولی با میانگین وزنی $11/13 \pm 30/56$ گرم استفاده شده است. موش‌ها از مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شیراز خریداری شدند. موش‌ها در قفس‌های ویژه از جنس پلی‌کربنات شفاف $15 \times 30 \times 42$ سانتی‌متر و در محیط آزمایشگاهی 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۵۰ تا ۶۰٪ و چرخه روشنایی به تاریکی ۱۲:۱۲ و با دسترسی بودن آزاد به آب و غذای پلیت نگهداری و کنترل شدند. تمام آزمایش‌های صورت گرفته بر اساس دستورالعمل کمیته کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شیراز طراحی گردید (کد اخلاقی: IR.SUMS.REC.1396.S444).

جهت جلوگیری از استرس و تغییر شرایط فیزیولوژیک نمونه‌ها به مدت ۲ هفته تحت شرایط جدید نگهداری شدند که

تارهای عضلانی داشته باشد. در فرایند آتروفی، PGC1 α سبب مهار فاکتور آغاز کننده تخریب پروتئین یعنی FOXO می‌شود [۹]. از طرف دیگر مسیر PI3K/Akt نیز می‌تواند سبب مهار FOXO و در نتیجه جلوگیری از آتروفی شود [۱۳]. پروتئین FOXO زیر مجموعه‌ای از خانواده بزرگ فاکتورهای نسخه برداری شده است. این خانواده به وسیله دومین‌های متصل به DNA شناسایی می‌شوند [۱۴]. FOXO1 در عضله قلبی و FOXO3 در عضلات اسکلتی بیان می‌شوند. از میان انواع FOXO تنها نوع ۱ و ۳ تنظیم مسیرهای درگیر در فرایند آتروفی یعنی UPP و اتوفاژی- لیزوزم را کنترل می‌کنند [۱۵]. FOXO1 و FOXO3 در سیتوزول قرار گرفته‌اند. مدارک نشان داده‌اند که FOXO3a واسطه اصلی در فرایند آتروژنز است و در صورتی که فعال شود از سیتوزول به هسته جابجا می‌شود و سبب فعال کردن دو پروتئین تخریب کننده بافت عضلانی یعنی MAFbx و MuRF1 می‌گردد و در نتیجه تخریب آغاز می‌گردد. FOXO3a می‌تواند مستقیماً MAFbx را فعال و سبب آتروفی شود [۱۶]. رودیر و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه‌ای بعد از یک جلسه تمرین تغییر در سطوح FOXO3a در موش‌های تمرین کرده و غیرفعال مشاهده نکردند [۱۷]. در پژوهشی دیگر بر روی انسان‌ها، نشان داده شد که ۸ هفته تمرین مقاومتی با شدت ۸۵ تا ۹۵٪ بیشینه، میزان mRNA FOXO3a، MuRF1 و MAFbx را در عضلاتی که هایپرتروفی شده بودند افزایش داد [۱۸]. آتو و همکاران^۱ (۲۰۱۷) نشان دادند که فسفوریلاسیون FOXO3a بعد از تمرین افزایش یافت اما سطوح mRNA اهداف FOXO3a مانند MuRF1 بلافاصله و ۳ ساعت بعد از تمرین تغییری نداشت و آتروفی مشاهده نشد [۱۹]. همچنین دویدن به مدت ۳۰ دقیقه با شدت ۷۵٪ VO_{2max} منجر به افزایش mRNA MuRF1 و MAFbx یک تا چهار ساعت بعد از تمرین شد و کاهش در سطح مقطع تارها نسبت به قبل

1.Satoru Ato et al (2017)

هفته دوم شامل آشنایی با نحوه فعالیت روی نوارگردان بود (۵ جلسه در یک هفته راه رفتن و دویدن با سرعت ۶ تا ۱۲ m/min در ساعت ۱۸ تا ۲۰ شب و شیب صفر درجه) سپس مطابق با برنامه تمرینی خود شش هفته فعالیت کردند. بعد از تمرین هر گروه به طور تصادفی به ۳ زیرگروه تقسیم شدند. گروه اول ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، گروه دوم ۷ روز و گروه سوم ۱۴ روز پس از آخرین جلسه تمرینی، بی‌تمرین شدند.

در مراحل تشریح موش‌ها با تزریق درون صفاقی ترکیبی از زایلازین و کتامین (۸۰-۱۰۰ mg/Kg) بی‌هوش و بافت‌برداری شدند. پس از بی‌هوشی عضله از اندام تحتانی حیوان بافت‌برداری، در سرم فیزیولوژیک شستشو داده شدند، در ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۱ گرم وزن گردیدند. سپس بلافاصله در ازت مایع منجمد و برای سنجش‌های بعدی به فریزر با دمای ۸۰- منتقل گردید.

تمرین تناوبی با شدت بالا به صورت ۴ تکرار ۴ دقیقه‌ای با شدت ۸۵ تا ۱۰۰٪ VO_{2max} با استراحت ۲ دقیقه و ۲ تکرار ۳ دقیقه‌ای با شدت ۶۵ تا ۷۵٪ VO_{2max} انجام گرفت. در هفته اول تکرارها دارای سرعت ۱۵ m/min بودند که در هفته ششم به ۴۰ متر در دقیقه رسید. همه گروه‌های تمرینی ۵ دقیقه با سرعت ۱۰ تا ۱۲ متر و ۵۰ تا ۶۰٪ VO_{2max} گرم و با همین زمان و شدت سرد می‌کردند [۲۳].

از روش رنگ آمیزی (H&E)^۱ و هیستوشیمی بافتی برای سنجش میزان و درصد نوع تارهای عضله اسکلتی استفاده شد. برش تهیه شده از نمونه‌ها بر روی لام با قطر ۵μm صورت گرفت. در نهایت رنگ آمیزی شدند. پس از رنگ آمیزی اسلایدها با چسب اینتلان ساخت شرکت مرک^۲ آلمان ثابت شدند و برای مشاهده از میکروسکوپ نوری اپتیکا^۳ مجهز به دوربین استفاده شد. تصاویر میکروسکوپی بزرگمایی شده

4. intermediate/hybrid-type fibers
5. RNAase free water
6. diethylpyrocarbonate

1. hematoxylin and eosin (H&E)
2. Merck
3. Optika

جدول ۲- میانگین و انحراف استاندارد وزن عضله نعلی در دو گروه مطالعه

گروه‌ها	۲۴ ساعت بعد از دوره تمرینی	۷ روز بی‌تمرینی	۱۴ روز بی‌تمرینی
کنترل	-	-	-
تمرین HIT	گروه اول	گروه دوم	گروه سوم
	۰/۱۱±۰/۱۸	۰/۱۲±۰/۲۷*	۰/۱۴±۰/۲۳*
	-	-	۰/۱۱±۰/۲۱۸*

*معناداری $p < 0.05$

یافته‌ها

میانگین و انحراف استاندارد وزن در عضله نعلی بعد از تمرین و دوره بی‌تمرینی ۷ و ۱۴ روزه در جدول ۲ نشان داده شده است.

گروه تمرین HIT تأثیر منفی بر اندازه تارهای واسطه‌ای در عضله نعلی داشت. بی‌حرکی بعد از تمرین سبب آتروفی تارهای نوع ۱ و ۲ شد ($p=0.001$). نتایج بدست آمده برای عضله نعلی نشان می‌دهد که تمرین سبب افزایش درصد تارهای نوع IIA و کاهش تارهای نوع I در این عضله در مقایسه با گروه کنترل شد ($p < 0.001$). (جدول ۳)

نتایج حاصل از اندازه‌گیری سطح مقطع تارها نشان می‌دهد که بیشترین تغییر در تارهای نوع IIA و بعد از تمرین و دوره بی‌تمرینی است ($p=0.002$). (جدول ۴)

نتایج RT-PCR نتایج نشان می‌دهد که میزان FOXO3a و MAFbx بعد از تمرین به طور معنادار کاهش و در دوره بی‌تمرینی افزایش معناداری داشت ($p=0.001$). احتمالاً افزایش سبب آتروفی در دوره بی‌تمرینی شد. میزان MuRF1 بعد از تمرین افزایش و دو دوره بی‌تمرینی کاهش معناداری داشته است ($p=0.001$). افزایش MuRF1 احتمالاً ناشی از تبدیل تارها بوده است. نمودار ۱ نتایج حاصل از RT-PCR را نشان می‌دهد.

جدول ۱- پرایمر مورد استفاده در پژوهش

Factors	Primer forward and reverse
FOXO3a	F: 5- TTCGCAAGGACCCAATGA-3 R:5- TCCAAGCTCCCATTGAACAT-3
MAFbx	F:5-CCATCAGGAGAAGTGGATCTATGTT-3 R:5-GCTTCCCCCAAAGTGCAGTA-3
MuRF1	F:5- TGTTCTGGTAGGTCGTTCCG-3 R:5- ATGCCGGTCCATGATCACTT-3

سانتی‌گراد، ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد (مرحله ساخت cDNA) و ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد (جهت فعال سازی آنزیم RT). برای هر نمونه cDNA از یک نمونه کنترل مثبت با پرایمر B2M به عنوان کنترل داخلی، برای آزمون حضور cDNA تهیه شد. نمونه‌ها به آرامی مخلوط شده و در RT-PCR (Corbett) با برنامه زیر قرار گرفتند: ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد (واسرشته شدن اولیه)، ۱۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد (واسرشته شدن)، ۱۵ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد (اتصال پرایمرها)، ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (گسترش). واکنش از مرحله دوم به بعد برای ۴۰ سیکل تکرار شد. Cts مربوط به واکنش‌ها از طریق نرم افزار دستگاه RT-PCR استخراج گردید و در نهایت Ctmean سه مرتبه ثبت شد. پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش در جدول ۱ آورده شده‌اند. برای کمی سازی مقادیر بیان ژن هدف، از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده شد.

از آزمون کولموگروف اسمیرنوف برای طبیعی بودن داده‌ها استفاده شد و برای مقایسه تغییرات گروه‌ها از آزمون ANOVA یک سویه استفاده شد. سطح معنی‌داری برای تمامی داده‌ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار Graphpad prism انجام شد.

جدول ۳- نسبت فیبرها (%) در عضله نعلی گروه‌های مطالعه

نوع تار عضله	کنترل	HIT	۷ روز بی‌تمرینی	۱۴ روز بی‌تمرینی
I	۶۸/۸۹±۱/۱	۵۷/۵۶±۳/۳	۵۹/۵۱±۲/۲	۶۵/۷۸±۲/۳*
IIA	۲۷/۷۱±۱/۲	۳۷/۷۲±۳/۱*	۳۵/۴۵±۳/۳	۴۲/۴۳±۱/۳
IIIB
Int/HTF	۲/۹۳±۰/۸	۲/۹۵±۰/۹	۲/۹۹±۰/۸	۲/۲۳±۱/۰

*تغییرات معنادار افزایشی $p < 0.05$ † تغییرات معنادار کاهش $p < 0.05$

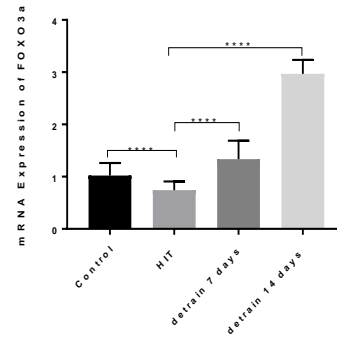
جدول ۴- داده‌های سطح مقطع تارها در عضله نعلی گروه‌های مطالعه

نوع تار عضله	کنترل	HIT	۷ روز بی‌تمرینی	۱۴ روز بی‌تمرینی
I	۹۲/۴۸±۲/۲	۹۹/۴۹±۳/۱	۷۳/۴۷±۲/۲*	۴۷/۰۱±۲/۳
IIA	۳۸/۴۲±۱/۲	۴۷/۴۶±۲/۱*	۳۴/۴۱±۲/۳*	۸۸/۴۰±۲/۲
Int/HTF	۳۹/۴۵±۶/۱	۳۲/۴۳±۱/۲	۲۲/۴۱±۵/۲	۱۲/۴۱±۱/۱

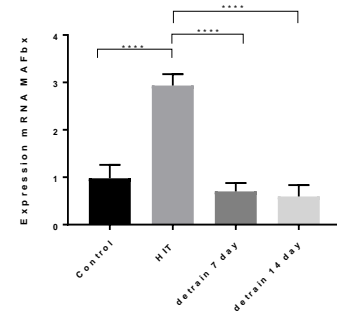
*معناداری $p < 0.05$

به ۵۷٪ کاهش یافته بودند (تبدیل نوع تار از I به IIA رخ داده بود). تبدیل نوع تار نشان دهنده تغییرپذیری mATPase و ایزوفرم‌های MHC است [۲۴]. همچنین حضور تارهای واسطه‌ای احتمالاً نتیجه حساسیت سازوکار برانگیزاننده است. با سرکوب FOXO3a توسط تمرین HIT نه تنها از آتروفی جلوگیری شد بلکه هایپرتروفی نیز مشاهده گردید. از طرف دیگر بی‌تمرینی بعد از تمرین HIT سبب افزایش سطوح FOXO3a و MAFbx و افزایش آتروفی بعد از تمرین شد و این در حالی است که سطوح MuRF1 کاهش داشت. به نظر می‌رسد در طی بی‌تمرینی افزایش FOXO3a ناشی از افزایش بیان mRNA در طی فرایند نسخه‌برداری و احتمالاً کاهش میزان فعالیت PGC1 α و AKT باشد.

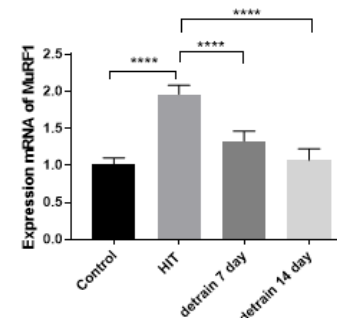
نتیجه مطالعه‌ای نشان داد که FOXO3a واسطه اصلی در فرایند آتروژنز و ایجاد آتروفی است و در صورت فعال شدن وارد هسته می‌شود و سبب فعال کردن دو پروتئین تخریب کننده بافت عضلانی یعنی MAFbx و MuRF1 می‌گردد و در نتیجه تخریب آغاز می‌گردد [۱۶]. با توجه به اینکه FOXO3a، MuRF1 و MAFbx در عضلات اسکلتی در هنگام آتروفی افزایش می‌یابند بنابراین انتظار می‌رود تمرین مقاومتی که سنتز پروتئین را افزایش می‌دهد بیان این ژن‌های درگیر در آتروفی را کاهش دهد. اما در پژوهشی بر روی انسان‌ها، نشان دادند که ۸ هفته تمرین مقاومتی با شدت ۸۵٪ تا ۹۵٪ بیشینه، میزان FOXO3a mRNA، MuRF1 و MAFbx را در عضلاتی که هایپرتروفی شده بودند، افزایش داد [۱۸]. همچنین دویدن به مدت ۳۰ دقیقه با شدت ۷۵٪ VO_{2max} منجر به افزایش MuRF1 mRNA و MAFbx یک تا چهار ساعت بعد از تمرین شد [۲۰]. در بررسی دیگری ۶۰ دقیقه دوچرخه سواری با شدت ۷۰٪ VO_{2max} سبب افزایش دوبرابری MAFbx در افراد تمرین کرده استقامتی شد در حالی که افزایش ۰/۴ برابری آن در ورزشکاران قدرتی دیده



A)



B)



C)

نمودار ۱- تغییرات بیان ژن FOXO3a (A)، ژن MAFbx (B) و ژن MuRF1 (C) **** معناداری $p < 0/01$

بحث و نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر از معدود مطالعاتی است که نقش تمرین HIT را در تغییرات بیان FOXO3a، MuRF1 و MAFbx و تغییرات هایپرتروفی/آتروفی مورد بررسی قرار می‌دهد. این پژوهش اطلاعات مهم و جدیدی در مورد سازوکارهای درگیر در آتروفی ایجاد کرده است. نتایج این پژوهش نشان داد که تمرین HIT القا کننده قدرتمندی در عضله است و این تأثیر را از طریق تغییرات ساختاری مانند افزایش در حجم عضله، تبدیل نوع تارها (نوع I به نوع IIA) و تغییر در ژنوتیپ با تغییر در بیان ژن‌ها می‌گذارد. نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که بعد از تمرینات HIT تارهای نوع IIA در عضله نعلی از ۲۷٪ به ۳۷٪ افزایش و تارهای نوع I از ۶۸٪

شد [۲۵]. در پژوهش حاضر هایپرتروفی بعد از تمرین با کاهش سطوح FOXO3a و MAFbx و ایجاد آتروفی به دنبال افزایش FOXO3a و MAFbx ایجاد شد که با نتایج سایر مطالعات [۱۶، ۱۸، ۲۰، ۲۵] همخوانی ندارد. تناقض در نتایج ممکن است ناشی از نوع آزمودنی ها، تفاوت در نوع، شدت و مدت تمرین باشد. همچنین ممکن است برای ایجاد تنظیم منفی FOXO3a به مدت زمانی بیش از یک جلسه تمرینی نیاز باشد.

آتو^۱ و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که فسفوریلاسیون FOXO3a بعد از تمرین افزایش یافت اما سطوح mRNA اهداف FOXO3a مانند MuRF1 بلافاصله و ۳ ساعت بعد از تمرین تغییری نداشت [۱۹]. از طرف دیگر در پژوهشی بر روی انسان ها میزان بیان این ژن ها بعد از تمرین افزایش یافت [۲۶] که ممکن است این تناقض ناشی از فعالیت بیشتر مسیر سیگنالینگ Akt-FOXO3a در حیوانات نسبت به انسان باشد. در مطالعه دیگری تمرین باز کردن زانو با شدت متوسط ۶۰ تا ۸۰٪ یک تکرار بیشینه سبب کاهش mRNA MAFbx ۴ تا ۲۴ ساعت بعد از تمرین در عضله چهارسر انسان شد اما میزان MuRF1 را یک تا چهار ساعت بعد از تمرین افزایش داد [۲۷] همچنین انجام تمرینات انقباض درونگرا (کانستریک) در یک پا و تمرین برون گرا (اکسنتریک) در پای دیگر منجر به افزایش MuRF1 سه ساعت بعد از تمرین در پای شد که تمرین کانستریک انجام داده بود و سبب کاهش MAFbx ۳ تا ۲۴ ساعت بعد از تمرین در پای شد که تمرین اکسنتریک انجام داده بودند [۲۸] اما به دلیل اینکه میزان کار کانستریک و اکسنتریک برابر نبود، تفسیر این نتایج دشوار است. در پژوهشی دیگر هشت هفته تمرین بر روی تردمیل با شدت ۶۰٪ حداکثر میزان توان کاری به مدت پنج جلسه در هفته بر روی موش ها سبب افزایش سازگاری های

میتوکندریایی از جمله افزایش PGC-1 α و TFAM^۲ شد و میزان FOXO3a کاهش یافت [۲۹]. اگرچه یانگ و همکاران (۲۰۰۶) و کاستک و همکاران (۲۰۰۷) تمرینات با شدت متفاوتی را انجام دادند اما کاهش MAFbx و افزایش MuRF1 بعد از تمرین با نتایج این پژوهش همسو است. تانیا هولی وی و همکاران (۲۰۱۵) تأثیر تمرین ET و HIT بر روی فاکتورهای آتروفی در موش ها را بررسی کردند. موش ها پنج جلسه در هفته به مدت چهار هفته بر روی تردمیل تمرین کردند. شدت در تمرین HIT در کل ۵۰٪ بیشتر از گروه ET بود. نتایج آنها نشان داد که هیچ گونه تغییری در وضعیت فاکتورهای آتروفی از جمله FOXO3a، MAFbx و MuRF4 ایجاد نشده است [۳۰]. مطالعات موريسکات و همکاران (۲۰۱۰) نشان داد که افزایش FOXO و MuRF1 بعد از عصب برداری در فیبرهای عضلانی نوع ۲ نسبت به فیبرهای نوع ۱ اولویت دارد و به میزان بالایی در این تارها در وضعیت آتروفی بیان می شود. در واقع ۵ تا ۱۴ روز بعد از عصب برداری، پروتئین MuRF1 در فیبرهای نوع ۲ به میزان بیشتری بالا بود. MuRF1 در عضله تیبیال قدامی موش ها که غنی از فیبرهای نوع دو در مقایسه با عضله دوقلو که ترکیبی از فیبرها است میزان بالاتری را نشان داد. بنابراین نتیجه گرفتند که FOXO3a و MuRF1 تنها در طی آتروفی عضلانی و زمانی که فیبرهای نوع دو در حال تغییر هستند بیان می شود و این حالت زمانی است که فیبرهای عضلانی تحت فشار پاتوفیزیولوژیکی هستند [۶]. اما سازوکار مولکولی کاملاً شناخته شده نیست. با توجه به نتایج این پژوهش و یافته های موريسکات و همکاران (۲۰۱۰) می توان نتیجه گرفت که احتمالاً مسیری FOXO3a/MAFbx و FOXO3a/MuRF1 در عضله نعلی که دارای درصد بیشتری از تارهای نوع ۱ است در اثر بی تمرینی بعد از تمرینات HIT سبب آتروفی شده است و فعال شدن MuRF1 بعد از

مدت تمرین، همچنین سابقه ورزشی بستگی دارد [۲۴]. بنابراین انجام انواع تمرین با شدت‌های مختلف به طور همزمان برای آگاهی، بیشتر در پژوهش‌های آتی مورد نیاز است. نتایج این پژوهش بیان می‌کند که افزایش و کاهش در توده عضلانی به تغییرات در سنتز و تجزیه پروتئین مرتبط است. نتایج پژوهش حاضر بیان می‌کند که فعال شدن مسیر FOXO3a/MuRF1 و نه FOXO3a/MAFbx کننده آتروفی در دوره بی‌تمرینی بعد از یک دوره تمرینی است و احتمالاً MuRF1 هدف غیر مستقیم FOXO3a است و همیشه نمی‌تواند به عنوان یک نشانگر مناسب در آتروفی باشد. احتمالاً MuRF1 در وضعیت‌های پاتولوژیکی نقش مهمتری دارد. در نهایت باید گفت که نتایج این پژوهش بر نیاز بیشتر و بهتر از درک و شناخت نقش MuRF1 در عملکرد عضلانی تأکید دارد.

تمرین HIT احتمالاً ناشی از تغییر و تبدیل تارها (از نوع ۱ به نوع ۲) در عضله نعلی بوده است. اگرچه واضح نیست که MuRF1 هدف مستقیم یا غیر مستقیم FOXO3a است اما چندین مطالعه نشان داده‌اند که فاکتور نسخه‌برداری FOXO3a سبب افزایش بیان MuRF1 در عضلات آتروفی شده می‌شود. برخی مطالعات نشان دادند که اگرچه FOXO3a برای بیان MuRF1 نیاز است اما به نظر نمی‌رسد که از طریق اتصال DNA باشد و این موضوع بیان می‌کند که احتمالاً MuRF1 هدف غیرمستقیم FOXO3a است و احتمالاً سیگنالینگ بیش از FOXO3a برای فعال کردن آن نیاز است [۳۱]. از طرف دیگر با توجه به تناقض‌های مشاهده شده در پژوهش‌های مختلف به نظر می‌رسد تنظیم MuRF1 و MAFbx و FOXO در وضعیت‌های فیزیولوژیکی، شدیداً به نوع، شدت و

References

1. Lynch RL, Konicek BW, McNulty AM, Hanna KR, Lewis JE, Neubauer BL, et al. The progression of LNCaP human prostate cancer cells to androgen independence involves decreased FOXO3a expression and reduced p27KIP1 promoter transactivation. *Molecular cancer research*. 2005; 3(3):163-169.
2. Labeit S, Kohl CH, Witt CC, Labeit D, Jung J, Granzier H. Modulation of muscle atrophy, fatigue and MLC phosphorylation by MuRF1 as indicated by hindlimb suspension studies on MuRF1-KO mice. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2010; 2010:1-9.
3. Wang X, Chen WR, Xing D. A pathway from JNK through decreased ERK and Akt activities for FOXO3a nuclear translocation in response to UV irradiation. *Journal of cellular physiology*. 2012; 227(3):1168-1178.
4. Benveniste O, Jacobson L, Farrugia ME, Clover L, Vincent A. MuSK antibody positive myasthenia gravis plasma modifies MURF-1 expression in C2C12 cultures and mouse muscle in vivo. *Journal of neuroimmunology*. 2005; 170(1-2):41-48.
5. Lee H-K, Rocnik E, Fu Q, Kwon B, Zeng L, Walsh K, et al. Foxo/atrogin induction in human and experimental myositis. *Neurobiology of disease*. 2012; 46(2):463-475.
6. Moriscot AS, Baptista IL, Bogomolovas J, Witt C, Hirner S, Granzier H, et al. MuRF1 is a muscle fiber-type II associated factor and together with MuRF2 regulates type-II fiber trophicity and maintenance. *Journal of structural biology*. 2010; 170(2):344-353.
7. Ventadour S, Attaix D. Mechanisms of skeletal muscle atrophy. *Current opinion in rheumatology*. 2006; 18(6):631-635.
8. Cohen S, Brault JJ, Gygi SP, Glass DJ, Valenzuela DM, Gartner C, et al. During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. *The journal of cell biology*. 2009; 185(6):1083-1095.
9. Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, et al. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature*. 2003; 423(6939):550-555.
10. Leick L, Lyngby SS, Wojtaszewski JFP, Wojtaszewski JFP, Pilegaard H. PGC-1alpha is required for training-induced prevention of age-associated decline in mitochondrial enzymes in mouse skeletal muscle. *Experimental gerontology*. 2010; 45(5):336-342.

11. Hood DA, Irrcher I, Ljubicic V, Joseph A-M. Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. *The journal of experimental biology*. 2006; 209(Pt 12):2265-2275.
12. Kaestner KH, Knochel W, Martinez DE. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes & development*. 2000; 14(2):142-146.
13. Henríquez-Olguín C, Díaz-Vegas A, Utreras-Mendoza Y, Campos C, Arias-Calderón M, Llanos P, et al. NOX2 inhibition impairs early muscle gene expression induced by a single exercise bout. *Frontiers in physiology*. 2016; 7:1-12.
14. Johnson ML, Robinson MM, Nair KS. Skeletal muscle aging and the mitochondrion. *Trends in endocrinology & metabolism*. 2013; 24(5):247-256.
15. West DWD, Burd NA, Churchward-Venne TA, Camera DM, Mitchell CJ, Baker SK, et al. Sex-based comparisons of myofibrillar protein synthesis after resistance exercise in the fed state. *Journal of applied physiology*. 2012; 112(11):1805-1813.
16. Sandri M, Lin J, Handschin C, Yang W, Arany ZP, Lecker SH, et al. PGC-1 α protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006; 103(44):16260-16265.
17. Roudier E, Forn P, Perry ME, Birot O. Murine double minute-2 expression is required for capillary maintenance and exercise-induced angiogenesis in skeletal muscle. *FASEB journal*. 2012; 26(11):4530-4539.
18. 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. *The journal of physiology*. 2006; 576(Pt 3):923-933.
19. Louis E, Raue U, Yang Y, Jemiolo B, Trappe S. Time course of proteolytic, cytokine, and myostatin gene expression after acute exercise in human skeletal muscle. *Journal of applied physiology*. 2007; 103(5):1744-1751.
20. Güller I, Russell AP. MicroRNAs in skeletal muscle: their role and regulation in development, disease and function. *The journal of physiology*. 2010; 588(Pt 21):4075-4087.
21. Burniston JG. Adaptation of the rat cardiac proteome in response to intensity-controlled endurance exercise. *Proteomics*. 2009; 9(1):106-115.
22. Ato S, Makanae Y, Kido K, Fujita S. Contraction mode itself does not determine the level of mTORC1 activity in rat skeletal muscle. *Physiological reports*. 2016; 4(19):1-11.
23. Desaphy J-F, Pierno S, Liantonio A, Luca A de, Didonna MP, Frigeri A, et al. Recovery of the soleus muscle after short- and long-term disuse induced by hindlimb unloading: effects on the electrical properties and myosin heavy chain profile. *Neurobiology of disease*. 2005; 18(2):356-365.
24. Coffey VG, Hawley JA. The molecular bases of training adaptation. *Sports medicine*. 2007; 37(9):737-763.
25. Williamson DL, Raue U, Slivka DR, Trappe S. Resistance exercise, skeletal muscle FOXO3A, and 85-year-old women. *The journals of gerontology*. 2010; 65(4):335-343.
26. Crepaldi T, Bersani F, Scuoppo C, Accornero P, Prunotto C, Taulli R, et al. Conditional activation of MET in differentiated skeletal muscle induces atrophy. *Journal of biological chemistry*. 2007; 282(9):6812-6822.
27. Yang Y, Jemiolo B, Trappe S. Proteolytic mRNA expression in response to acute resistance exercise in human single skeletal muscle fibers. *Journal of applied physiology*. 2006; 101(5):1442-1450.
28. Kostek MC, Chen Y-W, Cuthbertson DJ, Shi R, Fedele MJ, Esser KA, et al. Gene expression responses over 24 h to lengthening and shortening contractions in human muscle: major changes in CSRP3, MUSTN1, SIX1, and FBXO32. *Physiological genomics*. 2007; 31(1):42-52.
29. Lee I, Hüttemann M, Kruger A, Bollig-Fischer A, Malek MH. (-)-Epicatechin combined with 8 weeks of treadmill exercise is associated with increased angiogenic and mitochondrial signaling in mice. *Frontiers in pharmacology*. 2015; 6:1-10.
30. Holloway TM, Bloemberg D, da Silva ML, Simpson JA, Quadrilatero J, Spriet LL. High intensity interval and endurance training have opposing effects on markers of heart failure and cardiac remodeling in hypertensive rats. *PLoS One*. 2015; 10(3):1-16.
31. Burckart K, Beca S, Urban RJ, Sheffield-Moore M. Pathogenesis of muscle wasting in cancer cachexia: targeted anabolic and anti-catabolic therapies. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2010; 13(4):410-416.

The effect of high-intensity training and detraining on FOXO3a/MuRF1 and MAFbx levels in soleus muscle of male rats

Sheibani Sh¹, *Daryanoosh F², Salesi M², Koushkie Jahromi M², Tanideh N²

Abstract

Background Inactivity may result in loss of muscle volume and subsequently reduce the power, by activating proteasome signaling pathways, which leads to a decrease in quality and expectations of life. The aim of this study was to evaluate the effect of high-intensity training and also detraining on the signaling pathways of FOXO3a, MAFbx, and MuRF1.

Materials and methods: In this study, 32 2-month male Sprague-Dawley rats were used. At first, periodic exercise with intensity of 85-100% VO₂max was performed for six weeks. Then, the groups (detrained for 48h, 7w, and 14w) were detrained and then soleus muscle was removed from hind limb. H&E staining and histochemical procedure were used to measure the amount and percentage of skeletal muscle fibers type. Also, RT-PCR method was used to examine gene changes.

Results: The mean weight of the soleus muscle increased after exercise and decreased significantly after detraining (p=0.001). The fiber type conversion were happened from I to IIA (p=0.001). Hypertrophy was observed in fibers after training, whereas atrophy was seen after detraining in type II fibers (p=0.001). FOXO3a and MAFbx levels were significantly increased after training and decreased after detraining period (p=0.001). The MuRF1 expression shown an increase and a decrease after training and detraining, respectively (p=0.001).

Conclusion: The results of this study indicated that the exercise couldn't prevent atrophy during the period of detraining. Also, the activation of pathway FOXO3a/MAFbx, not the FOXO3a/ MuRF1, is the atrophy inducer during detraining. In this regard, probably MuRF1 is an indirect target of FOXO3a and cannot always be an appropriate marker of atrophy. MuRF1 probably plays a more important role in pathological atrophy conditions.

Keywords: Physical Activity, Atrophy, Hypertrophy, Rat

1. PhD student, University of Shiraz, Shiraz, Iran.

2. Associate professor, University of Shiraz, Shiraz, Iran.
(*Corresponding Author)
daryanoosh@shirazu.ac.ir