● مقاله تحقیقی

تأثیر تمرین تناوبی با شدت بالا و بی‌تمرینی بر بیان ژن‌های AKT/FoxO3a در عضله قلبی و نعلی رت‌های نر

شهین شیبانی[۱]، *فرهاد دریانوش[۲]، نادر تنیده[۳]،
مصطفی رحیمی[۴]، ایمان جمهیری[۵]، محمد علی رفاهیت[۶]

چکیده

مقدمه: مسیر Akt/FoxO3a بازیگر مهمی در آتروفی پس از توقف تمرین در عضلات اسکلتی و قلبی است. در این پژوهش بیان ژن‌های AKT/FoxO3a /MAFbx/MuRF1 در عضله نعلی و قلب به دنبال تمرین ورزشی و بی‌تمرینی بررسی شده است.

روش بررسی: موش‌های نر پس از آشناسازی به صورت تصادفی به گروه کنترل و تمرین تقسیم شدند. گروه تمرین HIIT بعد از شش هفته تمرین تناوبی به صورت تصادفی به ۳ گروه ۸ تایی تقسیم شد. گروه اول ۴۸ ساعت پس از دوره تمرینی و گروه دوم و سوم به ترتیب پس از ۷ و ۱۴ روز بی‌تمرینی پس از دوره تمرینی شش هفته‌ای بافت برداری شدند. از روش RT-PCR برای بررسی تغییرات بیان ژن‌ها استفاده شد.

یافته‌ها: تمرین به طور معناداری میزان وزن عضله قلبی و نعلی نسبت به وزن بدن را افزایش داد. اما این رشد بعد از ۷ و ۱۴ روز بی‌تمرینی [به ترتیب ۱۵٪ و ۲۲٪ در عضله قلبی(p=۰/۰۰۲)، و ۹٪ و ۱۶٪ در عضله نعلی (p=۰/۰۰۱)] کاهش داشت. بیان AKT در هر دو عضله قلبی و نعلی بعد از تمرین ورزشی افزایش یافت و از طرف دیگر میزان FoxO3a کاهش یافت. در طی بی‌تمرینی افزایش فعالیت FoxO3a سبب فعال شدن MAFbx و MuRF1 در عضله قلب و تنها فعال شدن MAFbx درعضله نعلی شد.

بحث و نتیجه‌گیری: در کاردیومیوسیت‌ها همانند عضله اسکلتی، FoxO3a نسخه‌برداری از MAFbx را فعال می‌کند که منجر به کند کردن یا جلوگیری از هایپرتروفی می‌شود. اما تغییرات در MuRF1 نشان داد که احتمالاً مسیر FoxO3a/MuRF1 در عضله قلبی و اسکلتی مکانیسم‌های تنظیم کننده متفاوتی دارند و به شکل متفاوتی واکنش نشان می‌دهند.

کلمات کلیدی: تمرین ورزشی، بی‌تمرینی، پروتئین Foxo3a، پروتئین AKT-binding

۱. دکترای فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه شیراز، گروه فیزیولوژی ورزشی، شیراز، ایران
۲. دانشیار، دانشگاه شیراز، گروه فیزیولوژی ورزشی، شیراز، ایران (*مؤلف مسئول)
daryanoosh@shirazu.acs.ir
۳. دانشیار، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی، شیراز، ایران
۴. استادیار، دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم انسانی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، شهرکرد، ایران
۵. دکترای ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی، شیراز، ایران
۶. کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد صدرا، گروه فیزیولوژی ورزشی، شیراز، ایران

فصلنامه علمی پژوهشی ابن‌سینا / اداره بهداشت، امداد و درمان نهاجا (سال بیست و دوم، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۹، مسلسل ۷۱)
تاریخ دریافت: ۹۹/۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۹/۳/۲۶

مقدمه

عضلات اسکلتی و قلبی نقش مهمی در سلامتی بدن دارند و حجم عضلانی مناسب سبب بهبود عملکرد و اجرا می‌شود [۱، ۲]. همچنین عدم استفاده از عضلات سبب افزایش تجزیه پروتئین و کاهش پیشرونده در قدرت عضلانی وابسته به سطح مقطع تارهای عضلانی می‌گردد. وضعیتی که در شرایطی مانند کاهش حرکت اندام[1] یا کاهش در بار عضلانی[2] دیده می‌شود [۳، ۴]. نشان داده شده است که هایپرتروفی عضله قلبی و اسکلتی در پاسخ به فشار و بارمکانیکی افزایش می‌یابد. پژوهش‌های متعددی فرایند هایپرتروفی و مسیرهای سیگنالینگ را در عضله قلبی و اسکلتی بررسی کرده‌اند. تعدادی از مطالعات نشان داده‌اند که سرین-ترئونین کیناز AKT نقش مهمی در رشد تارهای عضلانی دارند و محرک‌های متعددی از قبیل IGF1 [۵] و فشار مکانیکی [۶] سبب فعال شدن AKT می‌شوند و بیان بیش از حد AKT منجر به ارتقا قابلیت انقباض [۷] و هایپرتروفی [۸] می‌گردد اما در مورد ساز و کاری که آتروفی و هایپرتروفی را به صورت منفی تنظیم می‌کند اطلاعات کمی وجود دارد. عنوان شده است که FoxO3a، هدف پایین دست AKT واسطه مهمی در تجزیه پروتئین و آتروفی است [۹] مسیر AKT/FoxO3a/MAFbx-MuRF1 نقش مهمی در آتروفی عضلات اسکلتی و قلبی دارد. مشخص شده که تمرینات ورزشی تناوبی با شدت بالا سبب هایپرتروفی عضلات اسکلتی و قلبی می‌شوند و در نتیجه منجر به بهبود عملکرد و توانایی می‌گردند و در مقابل عدم استفاده می‌تواند سبب آتروفی و کاهش عملکرد شود. بنابراین مهم است که نقش ژن‌های پیش آتروفی که در این فرایند درگیر می‌شوند به خوبی شناسایی شود.

اخیراً مشخص شده که فاکتور نسخه برداری FoxO3a، تعادل بین فاکتورهای پیش آتروفی و ضدآتروفی را در پاسخ به بار و فشار مکانیکی تنظیم می‌کند و تکرار آن بر بیان تأثیر می‌گذارد. فعالیت FoxO3a با افزایش فعالیت AKT - پروتئین مشهور در افزایش حجم عضلانی - به صورت منفی تنظیم می‌شود و فسفوریلاسیون AKT منجر به فسفوریلاسیون FoxO3a می‌شود. بنابراین FoxO3a در سیتوزل باقی می‌ماند و نمی‌تواند فاکتورهای نسخه برداری را فعال کند [۱۰]. در وضعیت‌های آتروفی مانند بی‌تحرکی، عدم استفاده و یا بیماری، FoxO3a وارد هسته می‌شود و با فعال کردن فاکتورهای نسخه‌برداری مانند MAFbx و MuRF1، اندازه سلولی را کاهش می‌دهد [۱۱]. خانواده آتروژنزها مانند MAFbx و MuRF1 معمولاً در طی آتروفی در عضلات تنظیم می‌شوند [۱۲، ۱۳]. در عضلات فعال شدن محور AKT/FoxO3a سبب فعال شدن MAFbx و MuRF1 می‌شود و آنها را به سوبسترای FoxO3a تبدیل می‌کند و این مجموعه سبب تخریب پروتئوزومی می‌شوند [۱۳]. نقش این دو پروتئین در آتروفی عضلات اسکلتی و قلبی تقریباً به خوبی بررسی شده است [۱۴] اما در گزارشات مختلف تناقض‌هایی وجود دارد. برای مثال افزایش در میزان Atrogin و MuRF1 در عضله قلبی، در پاسخ به تمرین دویدن اختیاری و در وضعیت هایپرتروفی مشاهده شده است [۱۵] در مقابل افزایش سطوح mRNA MAFbx و MuRF1 به طور معناداری در هایپرتروفی پاتولوژیکی عضله قلبی [۱۶] و نارسایی قلبی [۱۷] که شرایط کاملاً متفاوتی با فعالیت ورزشی دارند، نیز مشاهده شده است. یک جلسه تمرین حاد سطوح پروتئین FoxO3a را افزایش می‌دهد در حالی که تکرار تمرین به مدت ۱۴ روز FoxO3a را به صورت منفی و معناداری تنظیم می‌کند [۳]. مطالعات قبلی نیز نشان داده‌اند که فاکتور نسخه‌برداری FoxO3a قادر است که فرایند رشد را به صورت منفی تنظیم کند. در بررسی میلکیویچ و همکاران (۲۰۱۱) حذف FoxO3a سبب تسریع هایپرتروفی در پاسخ به تکرار جلسات تمرین استقامتی شد [۱۸]. مطالعات کیشلانسکی و همکاران (۲۰۱۰) نشان داد که میزان فاکتور نسخه‌برداری FoxO3a و همچنین سطوح پروتئین آنها ۲ ساعت بعد از یک

1. hypokinesia
2. hypodynamia

جلسه تمرین ورزشی حاد افزایش یافت. افزایش این دو فاکتور برخی از ژن‌های پایین دست و هدف آنها را نیز فعال کرد که نشان می‌دهد یک جلسه تمرین حاد بر اهداف پایین دستی FoxO3a نیز اثرگذار بوده است [۱۹].

در سال‌های اخیر توجه خاصی بر شناسایی مسیرهای درگیر در کاهش حجم عضلانی و محدود کردن فاکتورهای پیش آتروفی و پروهایپرتروفیک با استفاده از شیوه‌های دارویی شده است [۲۰] اما درمان دارویی نتوانسته است به طور معناداری از تغییرات پاتولوژیکی یا آتروفی ناشی از عدم استفاده جلوگیری نماید [۲۱]. بنابراین عقیده براین است که مسیرهای غیردارویی مانند فشار مکانیکی و تمرینات ورزشی با توجه به اثرات مثبت شناخته شده از آنها می‌توانند جایگزین یا مکمل دارویی مناسبی باشند. بنابراین شناسایی و کشف تنظیم کننده‌های آتروفی و هایپرتروفی و پاسخ آنها به فعالیت ورزشی می‌تواند استراتژی کاربردی مؤثری در این زمینه باشد.

اگرچه مسیر AKT/ FoxO3a /MAFbx/ MuRF1 نقش مهمی در آتروفی عضلات اسکلتی و قلبی دارد اما اکثریت دانسته‌های ما از مسیرهای سیگنالینگ از مدل‌های پاتولوژیکی منشأ می‌گیرد و اثرات ورزش در این رابطه کمتر مورد توجه قرار گرفته است [۲۲]. همچنین تا کنون مطالعات محدودی بر اثرات بی‌تمرینی پس از یک دوره تمرینی تمرکز داشته‌اند و نقش این مسیرها در عضلات اسکلتی و قلبی به دنبال توقف تمرین واضح نیست. از این رو هدف پژوهش حاضر بررسی پاسخ AKT/ FoxO3a /MAFbx/ MuRF1 به یک دوره تمرین و بی‌تمرینی است.

روش بررسی

دراین پژوهش ۳۲ سر موش نر ۲ ماهه نژاد اسپراگ‌داولی با میانگین وزنی ۱۱/۱۳ ± ۳۰۰/۵۶ گرم استفاده شده است. رت‌ها از مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شیراز خریداری شدند. موش‌ها در قفس‌های ویژه از جنس پلی‌کربنات شفاف ۴۲×۳۰×۱۵ cm و در محیط آزمایشگاهی ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۵۰ تا ۶۰٪ و چرخه روشنایی به تاریکی ۱۲:۱۲ و با دسترس 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.

جهت جلوگیری از استرس و تغییر شرایط فیزیولوژیک نمونه‌ها به مدت ۲ هفته تحت شرایط جدید نگهداری شدند که هفته دوم شامل آشنایی با نحوه فعالیت روی نوارگردان بود (۵ جلسه در یک هفته راه رفتن و دویدن با سرعت ۶ تا ۱۲ متر/دقیقه و شیب صفر درجه) سپس مطابق با برنامه تمرینی خود شش هفته فعالیت کردند. پس از دوره آشناسازی موش‌ها به گروه کنترل و تمرین تقسیم شدند. سپس گروه تمرینی بعد از شش هفته تمرین تناوبی به صورت تصادفی به ۳ گروه ۸ تایی تقسیم شد. گروه اول ۴۸ ساعت پس از دوره تمرینی و گروه دوم و سوم به ترتیب پس از ۷ و ۱۴ روز بی‌تمرینی پس از دوره تمرینی بی‌هوش و سپس بافت‌برداری شدند.

در مراحل تشریح موش‌ها با تزریق درون صفاقی ترکیبی از زایلازین و کتامین (۸۰-۱۰ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن) بی‌هوش و در شرایط اخلاقی بافت‌برداری شدند. پس از بی‌هوشی عضله نعلی از اندام تحتانی حیوان بافت‌برداری، در سرم فیزیولوژیک شستشو داده شدند، در ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ گرم وزن‌کشی گردید. سپس بلافاصله در ازت مایع منجمد و برای سنجش‌های بعدی به فریزر با دمای ۸۰- منتقل گردید.

تمرین تناوبی با شدت بالا شامل ۴ تکرار ۴ دقیقه‌ای با شدت ۸۵ تا ۱۰۰٪ با استراحت ۲ دقیقه و ۲ تکرار ۳ دقیقه‌ای با شدت ۶۵ تا ۷۵٪ حداکثر سرعت در زمان واماندگی انجام گرفت. در هفته اول تکرارها دارای سرعت ۱۵ متر/دقیقه 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٪ حداکثر سرعت در زمان واماندگی گرم و با همین زمان و شدت سرد

می‌کردند [۲۳].

استخراج RNA با استفاده از ۵۰ میلی گرم عضله نعلی صورت گرفت. بافت با استفاده از یک میلی مول RNAx هموژن شد سپس با اضافه کردن ترکیبی از RB بافر و بتامرکاپتواتانول نمونه لیز شده و با دستگاه همگن کننده بافت هموژن شد. در مرحله بعد نمونه بر روی فیلتر سفید قرار داده شد و به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. ماده زیر توری سفید بدون رسوب ایجاد شده در آن به میکروتیوب جدید انتقال داده شد. RNA استخراج شده با ۴۵۰ میکرولیتر اتانول سرد ۷۰٪ شستشو و خشک شد و سپس به آن آب استریل (به میزان ۱/۵۰۰ میکرولیتر) اضافه و ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در مرحله بعد آب استریل به میزان ۷۵۰ میکرولیتر اضافه و ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ صورت گرفت. این مرحله ۲ بار تکرار شد. سپس RNAase free water اضافه شد و ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ با دور بالا صورت گرفت و در نهایت نمونه‌ها برای استفاده در مراحل بعدی به فریزر منتقل شدند. برای سنجش RNA استخراج شده از دستگاه بایوفتومتر با طول موج nm۲۶۰ استفاده شد. میانگین OD خوانده شده ۱/۹۲ بود که نشانگر کارایی مناسب RNA است.

جهت استخراج cDNA برای هر نمونه طی ۳ مرحله ساخت cDNA انجام گرفت. بدین ترتیب ۸ میکروگرم از RNA استخراج شده با ۰/۸ واحد لیتر از آنزیم DNAase و ۲ واحد لیتر بافر X۱۰ آن و آب DEDC خورده مخلوط شد و حجم نمونه به ۲۰ واحد لیتر رسانده شد. محصول ایجاد شده در دستگاه ترموسایکلر انکوبه شد. ۵ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد، ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، ۳۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد (مرحله ساخت cDNA به وسیله آنزیم کریپتاسیون RT) و ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد (جهت فعال‌سازی 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

جدول ۱- پرایمر مورد استفاده در پژوهش

فاکتور	نمونه	پرایمر
FoxO3a	Rat spragudawely	F: 5- TTCGCAAGGACCCAATGA-3 R: 5- TCCAAGCTCCCATTGAACAT-3
AKT	Rat spragudawely	F: 5-TCACCTCTGAGACCGACACC-3 R:5-ACTGGCTGAGTAGGAGAACTGG-3
MAFbx	Rat spragudawely	F: 5- CCATCAGGAGAAGTGGATCTATGTT-3 R: 5- GCTTCCCCCAAAGTGCAGTA-3
MuRF1	Rat spragudawely	F:5- TGTTCTGGTAGGTCGTTTCCG-3 R: 5- ATGCCGGTCCATGATCACTT-3

شده و در دستگاه واکنش زنجیره پلی مراز واقعی[1] با برنامه‌زیر pcr شدند: ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد (واسرشته شدن اولیه)، ۱۰ثانیه 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 واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز زمان واقعی استخراج گردید و در نهایت Ct mean سه مرتبه ثبت شد. پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش در جدول ۱ آورده شده‌اند. برای کمّی‌سازی مقادیر بیان ژن هدف، از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده شد.

نتایج ارائه شده بیان ژن، حاصل از سه تکرار (Mean±Sd[2]) آزمایش مستقل است. میانگین سطح بیان mRNA نمونه‌های تیمار شده با میانگین نمونه‌های کنترل مقایسه شدند.

در متغیرهای AKT و FoxO3a برای مقایسه بین گروهی و مقایسه با گروه کنترل از آزمون آنوای یک طرفه استفاده گردید و در ادامه برای مقایسه تفاوت بین گروه‌ها از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. برای مقایسه متغیرهای درون گروهی (۴۸ ساعت پس از تمرین، ۷ روز پس از تمرین، ۱۴روز پس از تمرین) ژن AKT و FoxO3a در گروه HIIT از آزمون تحلیل واریانس با اندازه‌گیری‌های تکراری استفاده شد. کلیه محاسبات آماری از طریق نرم افزار آماری SPSS ویرایش ۱۸ انجام شد و نمودارها نیز با کمک نرم افزار اکسل ۲۰۱۰ طراحی شدند.

1. Corbett
2. Standard Error Mean

یافته‌ها

تمرین ورزشی میزان وزن عضله قلبی و نعلی نسبت به وزن بدن را به ترتیب ۲۲٪ و ۳۲٪ نسبت به گروه کنترل غیرفعال افزایش داد (p=۰/۰۰۱). اما این رشد بعد از ۷ و ۱۴ روز بی‌تمرینی [به ترتیب ۱۵٪ و ۲۲٪ در عضله قلبی (p=۰/۰۰۲) و ۹٪ و ۱۶٪ در عضله نعلی (p=۰/۰۰۱)] کاهش داشت. در کل بعد از بی‌تمرینی عضله قلبی درصد تغییرات کاهشی بیشتری نسبت به عضله نعلی داشته است (p=۰/۰۱).

تأثیر تمرین و بی‌تمرینی بر بیان ژن‌ها در عضله نعلی

شش هفته تمرین تناوبی با شدت بالا سبب افزایش۳/۰۶ برابری بیان AKT نسبت به گروه کنترل شد. ۷ و ۱۴روز بی‌تمرینی به ترتیب سبب کاهش ۱ و ۲/۳ برابری AKT نسبت به پس از دوره تمرینی شد (p=۰/۰۰۲).

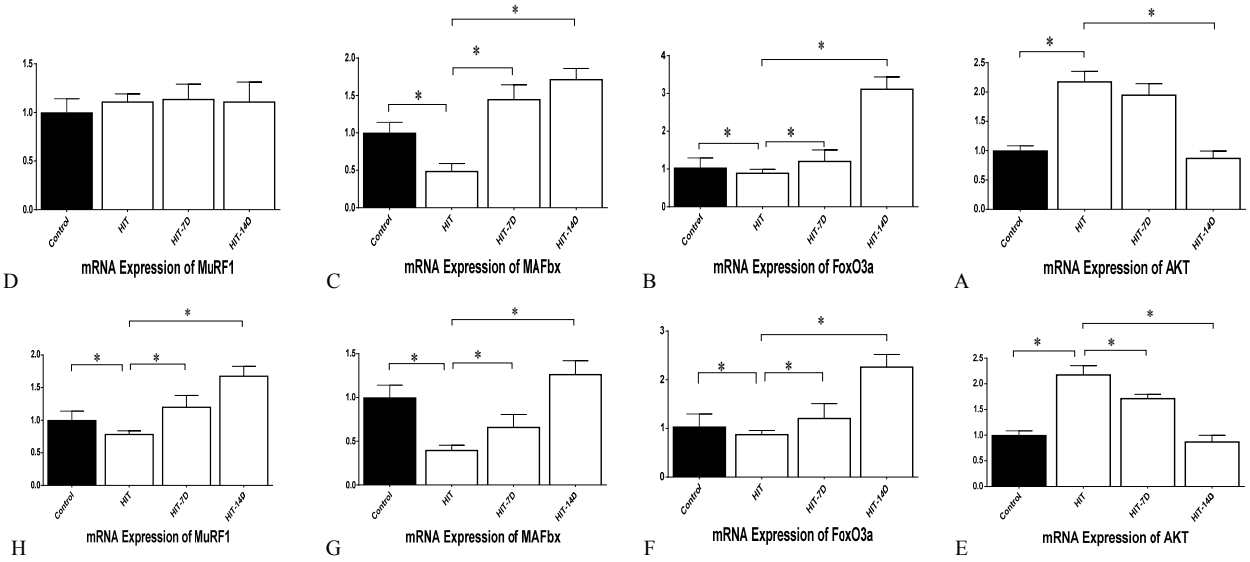
شش هفته تمرین تناوبی با شدت بالا سبب کاهش بیان ژن FoxO3a به میزان ۰/۳۳ و ۷ و ۱۴ روز بی‌تمرینی سبب افزایش ۰/۵۹و ۱/۳۱ برابری شد (p=۰/۰۰۲). همچنین تمرین سبب کاهش ۰/۶ برابری و بی‌تمرینی ۷ و ۱۴ روزه به ترتیب سبب افزایش تقریبی ۱ و ۱/۷ برابری در MAFbx شد (p=۰/۰۰۱). تغییری در بیان ژن MuRF1 مشاهده نشد (p=۰/۰۶۴).

تأثیر تمرین و بی‌تمرینی بر بیان ژن‌ها در عضله قلبی: شش هفته تمرین تناوبی با شدت بالا سبب افزایش ۲/۰۱ برابری بیان AKT نسبت به گروه کنترل شد. ۷ و ۱۴روز بی‌تمرینی به ترتیب سبب کاهش ۰/۵ و ۱/۵ برابری شدند (p=۰/۰۰۲).

شش هفته تمرین تناوبی با شدت بالا سبب کاهش بیان ژن FoxO3a به میزان ۰/۴۱ و ۷ و ۱۴ روز بی‌تمرینی سبب افزایش ۰/۴۷ و ۰/۶۲ برابری نسبت به گروه تمرین شد. همچنین تمرین سبب کاهش ۰/۸ برابری و بی‌تمرینی ۷ و ۱۴ روزه به ترتیب سبب افزایش ۰/۴۲ و ۰/۸۷ نسبت به تمرین در ژن MAFbx شد. تمرین سبب کاهش ۰/۳ برابری در ژن MuRF1 و بی‌تمرینی ۷ و ۱۴ روز به ترتیب سبب افزایش ۰/۵ و ۱/۳ برابری نسبت به گروه تمرین شد.

مقایسه تأثیرتمرین بر بیان ژن‌ها در عضله قلبی و نعلی

نتایج نشان می‌دهد که تمرین تناوبی با شدت بالا تأثیر مشابهی در بیان ژن‌های درگیر در فرایند آتروفی و هایپرتروفی دارد. تنها تفاوت در بیان ژن MuRF1 است که تحت تأثیر تمرین و بی‌تمرینی در عضله قلب بیان آن تغییرکرد اما در عضله نعلی تفاوت معناداری در هیچ کدام از مراحل مشاهده نشد. نمودار ۱ نتایج حاصل از RT-PCR را نشان می‌دهد.



شکل ۱- تغییرات بیان ژن در عضله نعلی: A: AKT، B: FOXO3a، C: MAFbx، D: MuRF1

تغییرات بیان ژن در عضله قلبی: E: AKT، F: FOXO3a، G: MAFbx، H: MuRF1

*** معناداری p < ۰/۰۵**

بحث و نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر یکی از جدیدترین مطالعاتی است که نقش فعالیت بدنی تناوبی با شدت بالا را در تغییرات و پاسخ ژن‌های AKT، FoxO3a و MuRF1/MAFbx در عضله نعلی و قلب موش‌های اسپراگ‌داولی به طور همزمان در زمان توقف تمرین بعد از یک دوره فعالیت ورزشی شش هفته‌ای مورد بررسی قرار می‌دهد. مطالعه حاضر نشان داد که تمرین ورزشی به طورمعناداری میزان وزن عضله قلبی و نعلی نسبت به وزن بدن را به ترتیب ۳۲٪ و ۲۲٪ نسبت به گروه کنترل غیرفعال افزایش داد اما این رشد بعد از ۷ و ۱۴ روز بی‌تمرینی به ترتیب (۱۵٪ و ۲۲٪ در عضله قلبی و ۹٪ و ۱۶٪ در عضله نعلی) کاهش یافت. در کل بعد از بی‌تمرینی عضله قلبی درصد تغییرات کاهشی بیشتری نسبت به عضله نعلی داشته است. همچنین مطالعه حاضر نشان داد که AKT، FoxO3aوMuRF1/MAFbx به دسته‌ای از ژن‌ها تعلق دارند که به تمرین ورزشی پاسخ می‌دهند و نتایج نشان می‌دهند که شش هفته تمرین تناوبی با شدت بالا تأثیر مشابهی در بیان ژن‌های درگیر در فرایند آتروفی و هایپرتروفی در عضله قلبی و اسکلتی دارد. تنها تفاوت در بیان ژن MuRF1 است که تحت تأثیر تمرین و بی‌تمرینی در عضله قلب، بیان آن همسو با تغییرات FoxO3a و Atrogin-1 تغییرکرد اما در عضله نعلی تفاوت معناداری در هیچ کدام از مراحل مشاهده نشد. مطالعات گذشته نشان داده‌اند که AKT نقش مهمی در هایپرتروفی عضله قلبی و اسکلتی دارد [۲۱] در توافق با مطالعات گذشته، در این پژوهش افزایش در فعالیت AKT پس از دوره تمرینی در هر دو عضله قلبی و اسکلتی همزمان با افزایش هایپرتروفی مشاهده شد. اگرچه محرک تمرینی متوقف شد اما فعالیت AKT به طور معناداری ۷ روز بعد از تمرین در عضله نعلی بالا بود اما در عضله قلبی کاهش یافت. همچنین در ۱۴ روز بی‌تمرینی همزمان با کاهش (۲۲٪ در وزن عضله قلبی و ۱۶٪ در وزن عضله نعلی نسبت به وزن بدن) AKT در هر دو عضله کاهش یافت.

FoxO3a یکی از اهداف پایین دست AKT است و کاهش فعالیت AKT سبب افزایش بیان FoxO3a آن می‌شود. در بررسی لی و همکاران (۲۰۰۷) افزایش در میزان MAFbx و MuRF1 در عضله قلبی در پاسخ به تمرین دویدن اختیاری و در وضعیت هایپرتروفی مشاهده شده است [۱۵] و با نتایج پژوهش حاضر در عضله قلبی همسو است. علی رغم این که دیگر پژوهش‌ها افزایش در FoxO3a و اهداف آن یعنی MuRF1 /MAFbx را همسو دانسته‌اند [۹] در این پژوهش همسویی FoxO3a و MuRF1 در عضله اسکلتی مشاهده نشد و شاید به این دلیل باشد که FoxO3a می‌تواند مستقیماً به موتیف F-box درMAFbx متصل شود اما اتصال آن بهMuRF1 به صورت غیر مستقیم است [۱۴] احتمالاً دیگر مسیرها در مرحله برگشت پذیری در دوره بی‌تمرینی در فعال کردن MuRF1 نیز نقش دارند. همچنین فعال شدن MuRF1 در عضله قلبی می‌تواند نشان دهنده حساسیت بیشتر عضله قلبی نسبت به محرک‌ها باشد.

در مطالعه‌ای تمرین بازکردن زانو با شدت متوسط ۶۰ تا ۸۰٪ یک تکرار بیشینه سبب کاهش MAFbx mRNA چهار تا ۲۴ ساعت بعد از تمرین در عضله چهارسر انسان شد اما میزان MuRF1 را یک تا چهار ساعت بعد از تمرین افزایش داد [۲۴] همچنین انجام تمرینات کانسنتریک در یک پا و تمرین اکسنتریک در پای دیگر منجر به افزایش MuRF1 سه ساعت بعد از تمرین در پایی شد که تمرین کانسنتریک انجام داده بود و سبب کاهش MAFbx ۳ تا ۲۴ ساعت بعد از تمرین در پایی شد که تمرین اکسنتریک انجام داده بودند [۲۵] نتایج آنها با یافته‌های پژوهش حاضر همسو 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 موش‌ها سبب افزایش سازگاری‌های میتوکندریایی از جمله افزایش PGC-1α و TFAM شد و میزان FoxO3a کاهش یافت [۲۶]. اگرچه یانگ و همکاران (۲۰۰۶) و کاستک و همکاران (۲۰۰۷) تمرینات با شدت متفاوتی را انجام دادند [۲۴، ۲۵] اما

کاهش MAFbx بعد از دوره تمرین با نتایج این پژوهش همسو و با افزایش MuRF1 همخوانی ندارد.

در مطالعه‌ای لیگر و همکاران (۲۰۰۶) بر روی انسان‌ها، نشان دادند که هشت هفته تمرین مقاومتی با شدت ۸۵ تا ۹۵٪ بیشینه، میزان FoxO3a mRNA و MAFbx را در عضلاتی که هایپرتروفی شده بودند افزایش داد [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 شد [۲۷] که با نتایج پژوهش حاضر همخوانی ندارند. تفاوت در نتایج احتمالاً ناشی از تفاوت در آزمودنی‌ها و نوع بار مکانیکی وارد شده بر عضلات است. همچنین ممکن است ناشی از فعالیت بیشتر مسیر سیگنالینک AKT-FoxOA3a در حیوانات نسبت به انسان باشد. از طرف دیگر 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] که با نتایج پژوهش حاضر همخوانی ندارد. تفاوت احتمالاً ناشی از مدت زمان تمرینی است زیرا در پژوهش حاضر شش هفته تمرین و در پژوهش لوئیس و همکاران (۲۰۰۷) فقط یک جلسه تمرین ۳۰ دقیقه‌ای صورت گرفته است [۲۸]. احتمالاً برای ایجاد تنظیم منفی FoxO3a به مدت زمانی بیش از یک جلسه تمرینی نیاز است. به طوری که تمرین شش هفته‌ای در این پژوهش سبب ایجاد سازگاری و تنظیم منفی فعالیت فاکتورهای پیش‌آتروفی شده است.

تانیا هولی وی و همکاران (۲۰۱۵) تأثیر تمرین ET و HIT بر روی فاکتورهای آتروفی در موش‌ها را بررسی کردند. موش‌ها 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 هیچ‌گونه تغییری در وضعیت فاکتورهای آتروفی از جمله FoxO3a، MAFbx و MuRF4 ایجاد نشده است [۱۳]. مطالعات موریسکات و همکاران (۲۰۱۰) نشان داد که افزایش FoxO3a و MuRF-1 بعد از عصب‌برداری در فیبرهای عضلانی نوع ۲ نسبت به فیبرهای نوع ۱ اولویت دارد و به میزان بالایی در این تارها در وضعیت آتروفی بیان می‌شود. در واقع ۵ تا ۱۴ روز بعد از عصب برداری، پروتئین $MuRF_1$ در فیبرهای نوع ۲ به میزان بیشتری بالا بود. $MuRF_1$ در عضله تیبیال قدامی موش‌ها که غنی از فیبرهای نوع دو در مقایسه با عضله نعلی که ترکیبی از فیبرها است میزان بالاتری را نشان داد. بنابراین نتیجه گرفتند که $MuRF_1$ و FoxO3a تنها در طی آتروفی عضلانی و زمانی که فیبرهای نوع دو در حال تغییر هستند بیان می‌شود و این حالت زمانی است که فیبرهای عضلانی تحت فشار پاتوفیزیولوژیکی هستند [۲۹]. اما مکانیسم مولکولی کاملاً شناخته شده نیست. با توجه به نتایج این پژوهش و یافته‌های موریسکات و همکاران (۲۰۱۰) می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً مسیر FoxO3a/MAFbx و نه FoxO3a/MuRF1 سبب آتروفی در عضله نعلی و قلبی شده است و فعال شدن MuRF1 در عضله قلبی احتمالاً ناشی از تغییر و تبدیل تارها (از نوع ۱ به نوع ۲) در اثر فشار این نوع تمرین بر عضله قلبی بوده است.

مطالعه حاضر نشان می‌دهد که فعالیت ورزشی تناوبی با شدت بالا با افزایش فعالیت AKT فعالیت FoxO3a را کاهش داد و سبب رشد عضلانی و هایپرتروفی گردید. در طی بی‌تمرینی با برداشته شدن بار مکانیکی و با کاهش فعالیت AKT فعالیت FoxO3a افزایش و آتروفی ایجاد شد. از طرف دیگرتغییرات MuRF1 نشان داد که فعال شدن MuRF1 در عضله قلبی و اسکلتی احتمالاً تحت تأثیر مسیرهای متفاوتی است و فعال شدت مسیر FoxO3a/MAFbx برای شروع فرایند آتروفی ضروی است اما حضور MuRF1 در عضله نعلی ضروری نیست و یا اینکه در شرایط حادتر و پاتولوژیکی تحت تأثیر قرار می‌گیرد. همچنین ممکن است MuRF1 نشان‌گر مناسبی برای هایپرتروفی و آتروفی ناشی از بی‌باری و بی‌تمرینی نباشد و احتمالاً تغییرات آن در شرایط پاتولوژیک بیشتر حائز اهمیت است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه بخش از کار پژوهشی رساله دکتری فیزیولوژی ورزشی مصوب دانشگاه شیراز است. این مطالعه با کد اخلاق IR.SUMS.REC.1396.S444 به تصویب رسیده است. نویسندگان پژوهش حاضر بر خود لازم می‌دانند که از مرکز پرورش و نگهداری حیوانات و مؤسسه پژوهشی سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی شیراز که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند، تشکر و قدردانی نمایند.

تعارض در منافع

بین نویسندگان هیچ گونه تعارضی در منافع انتشار این مقاله وجود ندارد.

Refrences

1. 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.
2. Okin P. Life study investigators. Regression of electrocardiographic left ventricular hypertrophy during antihypertensive treatment and the prediction of major cardiovascular events. JAMA. 2004;292:2343-2349.
3. Slopack D, Roudier E, Liu ST, Nwadozi E, Birot O, Haas TL. Forkhead BoxO transcription factors restrain exercise-induced angiogenesis. The Journal of physiology. 2014;592(18):4069-4082.
4. Schenkman M, Hall DA, Barón AE, Schwartz RS, Mettler P, Kohrt WM. Exercise for people in early-or mid-stage Parkinson disease: a 16-month randomized controlled trial. Physical therapy. 2012;92(11):1395-1410.
5. Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, et al. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1–PGC-1α interaction. Nature. 2003;423(6939):550-555.
6. Leick L, Lyngby SS, Wojtasewski JF, Pilegaard H. PGC-1α is required for training-induced prevention of age-associated decline in mitochondrial enzymes in mouse skeletal muscle. Experimental gerontology. 2010;45(5):336-342.
7. Johnson ML, Robinson MM, Nair KS. Skeletal muscle aging and the mitochondrion. Trends in endocrinology & metabolism. 2013;24(5):247-256.
8. Sheibani S, Daryanoosh F, Salesi M, Koushkie jahromi M, Tanideh N. The effect of high-intensity training and detraining on FOXO3a/MuRF1 and MAFbx levels in soleus muscle of male rats. Ebnesina. 2018;20(1):31-39. [Persian]
9. Skurk C, Maatz H, Kim H-S, Yang J, Abid MR, Aird WC, et al. The Akt-regulated forkhead transcription factor FOXO3a controls endothelial cell viability through modulation of the caspase-8 inhibitor FLIP. Journal of biological chemistry. 2004;279(2):1513-1525.
10. Willis MS, Schisler JC, Portbury AL, Patterson C. Build it up–tear it down: protein quality control in the cardiac sarcomere. Cardiovascular research. 2009;81(3):439-448.
11. Sengupta A, Molkentin JD, Yutzey KE. FoxO transcription factors promote autophagy in cardiomyocytes. Journal of biological chemistry. 2009;284(41):28319-28331.
12. 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.
13. 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.
14. Sandri M, Lin J, Handschin C, Yang W, Arany ZP, Lecker SH, et al. PGC-1alpha 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.
15. 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.
16. 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. Journal of cell biology. 2009;185(6):1083-1095.
17. Galasso G, De Rosa R, Piscione F, Iaccarino G, Vosa C, Sorriento D, et al. Myocardial expression of FOXO3a–Atrogin-1 pathway in human heart failure. European journal of heart failure. 2010;12(12):1290-1296.

18. Milkiewicz M, Roudier E, Doyle JL, Trifonova A, Birot O, Haas TL. Identification of a mechanism underlying regulation of the anti-angiogenic forkhead transcription factor FoxO1 in cultured endothelial cells and ischemic muscle. The American journal of pathology. 2011;178(2):935-944.
19. Kishlyansky M, Vojnovic J, Roudier E, Gineste C, Decary S, Forn P, et al. Striated muscle angio-adaptation requires changes in Vasohibin-1 expression pattern. Biochemical and biophysical research communications. 2010;399(3):359-364.
20. Razeghi P, Sharma S, Ying J, Li Y-P, Stepkowski S, Reid MB, et al. Atrophic remodeling of the heart in vivo simultaneously activates pathways of protein synthesis and degradation. Circulation. 2003;108(20):2536-2541.
21. Frey N, Katus HA, Olson EN, Hill JA. Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? Circulation. 2004;109(13):1580-1589.
22. Mujika I, Padilla S. Detraining: loss of training-induced physiological and performance adaptations. Part I. Sports medicine. 2000;30(2):79-87.
23. Burniston JG. Adaptation of the rat cardiac proteome in response to intensity-controlled endurance exercise. Proteomics. 2009;9(1):106-115.
24. 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.
25. 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;31:42-52.
26. Léger B, Cartoni R, Praz M, Lamon S, Dériaz O, Crettenand A, et al. Akt signalling through GSK-3β, mTOR and Foxo1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. The Journal of physiology. 2006;576(3):923-933.
27. Williamson DL, Raue U, Slivka DR, Trappe S. Resistance exercise, skeletal muscle FOXO3A, and 85-year-old women. Journals of Gerontology Series A: biomedical sciences and medical sciences. 2010;65(4):335-343.
28. 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.
29. 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.

Effect of high intensity interval training and detraining on gene expression of AKT/FoxO3a in cardiac and soleus muscle of male rats

Shahin Sheibani[1], *Farhad Daryanoosh[2], Nader Tanideh[3], Mostafa Rahimi[4], Iman Jamhiri[5], Mohammad-Ali Refahiat[6]

Abstract

Background: The Akt / FoxO3a pathways is an important player in skeletal and cardiac muscle atrophy. In this study, the expression of Akt / FoxO3a / MAFbx / MuRF1 genes in soleus and heart muscle following exercise and detraining was investigated.

Materials and methods: Male mice were randomly assigned to the control and exercise group after familiarization. HIIT training group was randomly divided into three groups of eight after six weeks of intermittent training. After a six-week training period, tissue removal was performed for the 1st, 2nd, and 3rd groups respectively after 48 hours, seven days, and 14 days of inactivity. The RT-PCR method was used to investigate gene expresion changes.

Results: Exercise significantly increased the weight of the heart and soleus muscle relative to body weight. However, it decreased after seven and 14 days of inactivity [15% and 22% in the heart muscle (p=0.002) and 9% and 16% in the soleus muscle (p=0.001), respectively]. AKT expression increased in both the heart and the soleus muscles after exercise, while FoxO3a decreased. During exercise, increased FoxO3a activity lead to activation of MAFbx and MuRF1 in the heart muscle and only MAFbx in the soleus muscle.

Conclusion: In cardiomyocytes, like skeletal muscle, FoxO3a activates MAFbx transcroption, which slows or prevents hypertrophy. But changes in MuRF1 showed that the FoxO3a / MuRF1 pathway in the heart and skeletal muscles may have different regulatory mechanisms and react differently.

Keywords: Exercise Training, Foxo3a protein, AKT-binding protein

1. PhD of sport physiology, School of Physical Education and Sport Science, Shiraz University, Shiraz, Iran
2. Associate professor, Department of Sport Physiology, School of Physical Education and Sport Science, Shiraz University, Shiraz, Iran
(*Corresponding author)
daryanoosh@shirazu.ac.ir
3. Associate professor, Stem Cells Technology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
4. Assistant professor, Department of Physical Education and Sport Science, Faculty of Humanities, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
5. PhD, Stem Cells Technology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
6. MSc, Department of Physical Education and Sport Science, Islamic Azad University, Sadra Branch, Shiraz, Iran