JME
https://jme.guilan.ac.ir/
https://doi.org/ 10.22124/jme.2023.23967.262

دوفصلنامه سوخت و ساز و فعالیت ورزشی
سال دوازدهم، جلد دوازدهم، شماره ۱

مقاله پژوهشی
Open Access

تاثیر دو ماه تمرینات ورزشی ترکیبی بر بیان ژن IRE1α و PERK در عضله پهن جانبی رت‌های ویستار نر

زهرا اسماعیلی[۱]، فرزاد زهساز[۲*]، علیرضا نورآذر[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۹/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۳/۱ تاریخ چاپ: ۱۴۰۲/۰۲/۰۱

چکیده

هدف: آپوپتوز عضله‌ی اسکلتی نقش مهمی در بیماری‌های مرتبط با تخریب عملکرد بافتی مانند آتروفی عضلانی بازی می‌کند. تمرینات ورزشی ممکن است تعدادی از مسیرهای پیام‌رسانی مربوط به آپوپتوز را در عضله‌ی اسکلتی تحت تاثیر قرار دهد. بنابراین مطالعه حاضر با هدف تعیین تاثیر دو ماه تمرین ورزشی ترکیبی بر بیان ژن‌هایPERK و IRE1α عضله‌ی پهن جانبی رت‌های ویستار نر انجام گردید.

روش‌کار: مطالعه حاضر در قالب یک طرح تجربی سه گروهی با گروه کنترل انجام شد. ۳۵ سر رت ویستار نر به شکل تصادفی در چهار گروه کنترل(n=8)، استقامتی(n=9)، قدرتی(n=9)، استقامتی_قدرتی(n=9) جایگزین شدند و به‌غیراز گروه کنترل، سه گروه بعدی به مدت دو ماه در انجام تمرینات ورزشی شرکت کردند. پس از اجرای پروتکل تمرینی، مراحل جراحی و استخراج بافت عضله پهن جانبی انجام شد. داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌راهه در سطح معنی‌داری P <۰/۰۵ تجزیه‌وتحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد متعاقب دو ماه تمرین استقامتی بیان ژن‌های IRE1α و PERK افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشتند (p=۰/۰۰۱ و p=۰/۰۰۱). تمرین مقاومتی هیچ تأثیری بر بیان ژن IRE1α نداشت (p=۰/۰۳)، ولی باعث افزایش بیان ژن PERK نسبت به گروه کنترل شد (p=۰/۰۰۱). همچنین گروه تمرین ترکیبی در بیان ژن IRE1α هیچ تفاوتی نسبت به گروه کنترل نداشته (p=۰/۶۲)، ولی باعث افزایش بیان ژن PERK نسبت به گروه کنترل شد (p=۰/۰۰۸). **نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد دو ماه تمرین ترکیبی، قدرتی و استقامتی تاثیر قابل‌توجهی بر افزایش بیان ژن PERK در مسیر میتوکندریایی آپوپتوز عضله‌ی پهن جانبی دارد. همچنین تمرین استقامتی باعث افزایش بیان ژنIRE1α گردید. بااین‌حال اظهارنظر قطعی در مورد تاثیر تمرینات ورزشی بر شاخص‌های مربوط به آپوپتوز عضله پهن جانبی، نیازمند انجام مطالعات بیشتری است.

واژگان کلیدی: تمرین ترکیبی، عضله‌ی پهن جانبی، استرس ER، PERK، IRE1α

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد تبریز، تبریز، ایران ۲. دانشیار گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران، ۳. استادیار گروه دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.
* نشانی الکترونیک نویسنده مسئول f-zehsaz@iaut.ac.ir

Copyright © The Authors Publisher: University of Guilan

https://doi.org/ 10.22124/jme.2023.23967.262

مقدمه

آپوپتوز مرگ فیزیولوژیک سلولی است که بخش تفکیک‌ناپذیر از رشد، توسعه و هومئوستاز موجود زنده می‌باشد و برای حذف سلول‌های زائد با روشی هدفمند به کار می‌رود. همچنین آپوپتوز در ترمیم و نوسازی بافتی نقش دارد (۱). در موجودات زنده فرآیند آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول به‌عنوان روشی حفاظت‌شده است. اما سلول‌های سرطانی معمولاً قادر به فرار از آپوپتوز هستند که آن‌ها را عملاً جاودانه می‌سازد و در بسیاری از مکانیسم‌های سیستم ایمنی یا بیماری‌ها مداخله می‌کند (۲). از طرف دیگر، شبکه اندوپلاسمی (ER)[1] یک اندام درون‌سلولی است که توسط یک شبکه غشایی گسترده پوشش داده شده و در تمام سلول‌های یوکاریوتی وجود دارد و نقش مهمی در کنترل عملکردهای فیزیولوژیکی مختلف داخل سلولی ایفا می‌کند و همچنین عملکرد درست شبکه اندوپلاسمی برای بقای سلول ضروری است (۳). برخی از شرایط فیزیولوژیکی و آسیب‌شناختی و نیز انواع عوامل دارویی، می‌توانند در عملکرد شبکه اندوپلاسمی اختلال ایجاد کنند که نتیجه آن ایجاد استرس شبکه اندوپلاسمی است. وقتی استرس شبکه اندوپلاسمی (ERS[2]) اتفاق می‌افتد، هومئوستاز و عملکرد شبکه اندوپلاسمی می‌تواند آسیب‌دیده و ضعیف شود (۴). همچنین این استرس، فعال‌کننده بسیاری از پاسخ‌های امدادگر از جمله پاسخ پروتئین تانخورده (UPR[3]) است. این پاسخ نقش حفاظت از یکپارچگی سلولی را بر عهده دارد. همچنین می‌تواند خط تولید را ضعیف کرده و محصولات دارای ساختار نامناسب را حذف کند (۵). UPR دارای سه مسیر است: PERK، IRE1α و ATF6، که هر ۳ پروتئین، پروتئین‌های غشایی غدد درون‌ریز شبکه اندوپلاسمی هستند (۶).

PERK پروتئینی است که متعلق به زیر خانواده elf2α کیناز بوده و طیف گسترده‌ای از استرس سلولی، مانند فقر هِم، اشعه ماوراءبنفش، کمبود آمینواسید و عفونت ویروسی، این کینازها را فعال کرده و پس‌ازآن منجر به فسفریلاسیون elF2α می‌شود (۷). PERK یک پروتئین ساکن شبکه اندوپلاسمی است که می‌تواند سیگنال انتقال را در طول ERS، همراه با ATF6 و αIRE1 ایجاد کند. PERK نیز به‌عنوان یکی از

[1] Endoplasmic Reticulum
[2] Endoplasmic Reticulum Stress
[3] Unfolded Protein Response

مبدل‌های اصلی ERS شناخته شده است. سیگنال‌های مرگ/بقا در ERS، توسط این مبدل‌ها برای ایجاد آپوپتوز یا اتوفاژی حس می‌شود. بااین‌حال، با توجه به مطالعات قبلی، برخی از منحصربه‌فرد بودن PERK در مقایسه با مسیرهای سیگنال‌دهی ATF6 یا IRE1α در القای آپوپتوز و اتوفاژی خبر می‌دهند (۸). اما IRE1α وابسته به انقباض mRNAs [1](RIDD)، پروتئین (CHOP)، که به‌عنوان آسیب DNA شناخته شده است که عضو خانواده Bcl-2، Caspas 12 و JNK می‌باشد (۹). ERS موجب فعال شدن UPR می‌شود که این واکنش از طریق تفکیک BIP از سه پروتئین ER فعال می‌شود پس از جداسازی BIP، IRE1α فعال می‌شود که JNK را از طریق TRF2و ASK1 فعال می‌کند. IRE1α کنترل‌کننده فعال‌سازی مسیر علامت‌دهی Caspase است که موجب آپوپتوز می‌شود (۱۰).

مطالعات متعدد نشان می‌دهند که ورزش می‌تواند به‌طور موثر آسیب‌شناسی مرتبط با ERS و سنسورهای مرتبط با ER، مانند چاقی، دیابت، بیماری‌های نوروژنیک، هیپوکسی و سارکوپنی در عضلات اسکلتی، کبد، مغز و سیستم قلبی عروقی را بهبود بخشد (۱۱). همچنین در دهه‌های اخیر، ارتباط بین فعالیت و تمرینات مختلف ورزشی با آپوپتوز موردتوجه بسیاری از محققان و متخصصان ورزشی قرار گرفت است. دلیل این توجه، مدارک و شواهدی است که نشان می‌دادند که در اثر انجام انواع فعالیت‌های ورزشی ممکن است آپوپتوز شدید رخ دهد. در اواخر دهه‌ی ۹۰ و اوایل سال ۲۰۰۰ میلادی، برخی از مطالعات اشاره داشتند که یک جلسه فعالیت ورزشی شدید تا ۴۸ ساعت می‌تواند موجب تسریع در فرآیند آپوپتوز شود (۱۲). والتر و رون[2] (۲۰۱۱) گزارش کردند که ۱۲ هفته تمرین استقامتی با شدت ۷۵ درصد در رت‌های صحرایی، ERS را فعال کرده و باعث التهاب از طریق ۳ شاخه ATF6، IRE1α و PERK می‌شود (۴).

سانگ و همکاران[3] (۲۰۰۶) نیز پژوهشی با عنوان، تمرینات ورزشی تغییرات ناشی از سن در پیام‌رسانی آپوپتوز را در عضله اسکلتی موش‌های صحرایی کاهش می‌دهد انجام دادند. براین‌اساس آن‌ها از موش‌های صحرایی

[1] regulated IRE1α-dependent decay
[2] Walter and ron
[3] Song and et al

Copyright © The Authors

۳ و ۲۴ ماهه استفاده کردند و آن‌ها را تحت ۱۲ هفته تمرین روی نوارگردان قرار دادند که شدت تمرین تقریباً معادل ۷۵٪ اکسیژن مصرفی بیشینه در موش‌های پیر بود. جراحی عضلات نعلی و دوقلو نشان داد که تمرینات ورزشی قطعه‌قطعه شدن DNA را در موش-های پیر تمرین کرده در مقایسه با موش‌های پیر کنترل به صورت معنی‌دار کاهش داده بود، اما این کاهش در موش‌های جوان تمرین کرده در مقایسه با موش‌های جوان کنترل ناچیز و غیر معنی‌دار بود (۱۳). فرناندز و همکاران[1] (۲۰۱۲) ۵۶ سر موش صحرایی ۳ ماهه ویستار دیابتی شده را به مدت ۱۲ هفته در معرض تمرین شنا قرار دادند و نتایج تحقیق نشان داد که میانگین مرگ سلولی به روش آپوپتوز در موش‌های تمرین کرده به صورت معنی‌داری کمتر از موش‌های گروه کنترل بود (۱۴). همچنین مارزتی و همکاران[2] (۲۰۰۸) آپوپتوز ناشی از فعالیت ورزشی در عضله‌ی نعلی و دوقلوی ۴۰ موش صحرایی را در ۴ گروه بررسی کردند، نتایج نشان داد که فعالیت ورزشی به‌طور معنی-داری نسبت آپوپتوز را بلافاصله و ۴۸ ساعت بعد از فعالیت افزایش می‌دهد (۱۵).

هرچند در سایر کشورها در مورد اثر تمرین ورزشی استقامتی و قدرتی به‌صورت جداگانه در بافت‌های متفاوت تحقیقاتی صورت گرفته، ولی اثر تمرین ورزشی ترکیبی هم‌زمان بر روی عضله پهن جانبی به‌ندرت بررسی شده است. لذا این مطالعه بر آن شد تا تاثیر تمرین ورزشی ترکیبی بر بیان ژن PERK و IRE1α در عضله پهن جانبی رت‌های ویستار نر را موردبررسی قرار دهد.

روش پژوهش

پژوهش حاضر از نوع تجربی- آزمایشگاهی و مدل حیوانی روی ۳۵ سر رت نر نژاد ویستار انجام شد. در مراحل مختلف پژوهش، ضمن رعایت مسائل اخلاقی، مطابق دستورالعمل کمیته‌ی اخلاق، کار با حیوانات آزمایشگاهی مستخرج از دستورالعمل هلسینکی از هرگونه آزار و روش‌های غیرضروری کار با حیوانات اجتناب گردید (۱۶). رت‌ها در وزن ۴۰±۳۳۰ گرمی و در سن ۲ ماهگی از انستیتو پاستور کرج خریداری و به آزمایشگاه حیوانات منتقل و در شرایط دمایی ۳±۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت ۴۰ تا ۶۰ درصد و تحت چرخه‌ی روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲ نگهداری شدند. قبل از شروع دوره تمرینی نمونه‌ها به مدت

[1] Fernandes and et al

[2] Marzetti and et al

یک هفته تحت برنامه‌ی آشنایی با نحوه‌ی فعالیت روی نوارگردان الکترونیکی هوشمند و بالا رفتن از نردبان قرار گرفتند (۱۶). نوارگردان دارای پنج کانال مجزا بود که مقدار شیب، سرعت و زمان توسط برنامه هوشمند کنترل می‌شد. همچنین بالا رفتن از نردبان هم با در دست داشتن پروتکل تمرینی انجام می‌شد. در نوارگردان طی دوره آشنایی، شیب نوارگردان صفر درصد، سرعت ۱۵-۱۰ متر بر دقیقه و مدت تمرین ۱۰-۵ دقیقه در روز بود. در تمرین نردبان دوره آشنایی به‌صورت بالا رفتن از نردبان بدون وزنه بود(۱۶). در پایان این دوره، رت‌ها به‌طور تصادفی به چهار گروه کنترل(n= ۸)، گروه تمرین استقامتی (n= ۹)، گروه تمرین قدرتی (n=۹)، گروه تمرین ترکیبی (n=۹) جایگزین شدند. گروه‌های تمرین برای ۵ روز در هفته و به مدت ۸ هفته در برنامه‌ی تمرین هوازی و قدرتی شرکت کردند (۱۶, ۱۷). برنامه نوارگردان به این صورت بود که هفته اول بخش اصلی تمرین ۱۰ دقیقه بوده و هر هفته مدت تمرین افزایش یافت. هفته دوم ۵۰ دقیقه مدت‌زمان تمرین بود، از هفته سوم تا هفته آخر مدت تمرین به ۶۰ دقیقه رسید، شیب تردمیل تا هفته چهارم صفر بود و در هفته پنجم شیب ۵ درصد، در هفته ششم تا هفته هشتم شیب به ۱۰ درصد رسید (جدول ۱). لازم به ذکر است که قبل از تمرین ۱۰ دقیقه گرم کردن با سرعت ۱۰ الی ۱۵ متر در دقیقه در شیب صفر درصد انجام می‌شد و شیب و سرعت نوارگردان به‌صورت تدریجی افزایش می‌یافت تا به مقدار موردنظر برسد. همچنین بعد از تمرین ۵ دقیقه سرد کردن انجام می‌گرفت. در طول این ۸ هفته آزمودنی‌های گروه کنترل بدون انجام تمرین در آزمایشگاه حیوانات نگهداری می‌شدند.

تمرینی مقاومتی شامل بالا رفتن از نردبانی ۱ متری بود که با آویزان کردن وزنه به دم رت‌ها انجام می‌شد. نردبان مورداستفاده ۴۶ پله داشت و در زاویه ۸۰ درجه قرار داده می‌شد (شکل۱). برای تعیین وزنه‌ی مناسب یک‌بار وزن موش‌ها اندازه‌گیری شد. پیش از شروع تمرینات، بالا رفتن از نردبان به حیوانات آموزش داده شد. به‌منظور تحریک جهت انجام تمرینات تنها از لمس کردن دم استفاده شد. در تمام گروه‌های تمرینی در هفته اول بار معادل ۵۰ درصد وزن بدنی هر رت بود که با ۱ ست و ۸ تکرار انجام دادند. هفته دوم بار معادل ۶۰ درصد وزن بدنی رت، هفته سوم بار معدل ۷۰ درصد وزن بدنی هر

Copyright © The Authors

https://doi.org/ 10.22124/jme.2023.23967.262

رت، هفته چهارم بار معادل ۸۰ درصد وزن بدنی هر رت، هفته پنجم بار معادل ۹۰ درصد وزن بدنی هر رت، هفته ششم بار معدل ۱۰۰ درصد وزن بدنی هر رت، هفته هفتم بار معادل ۱۱۰ درصد وزن بدنی هر رت، هفته هشتم بار معادل ۱۲۰ درصد وزن بدنی هر رت بود(۱۶). به‌منظور انجام مراحل گرم کردن و سرد کردن، رت‌های نر ویستار ۲ بار بالا رفتن از نردبان (بدون وزنه) را پیش و پس از هر جلسه‌ی تمرین انجام دادند.

با هدف از بین بردن اثر حاد تمرین، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، گروه‌های تمرینی و کنترل توسط تزریق درون صفاقی کتامین (۸۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) بی‌هوش شدند. رت‌ها بلافاصله پس از بیهوشی توسط متخصص کارآزموده جراحی و عضله‌ی پهن جانبی آن‌ها استخراج و در مایع فیزیولوژیک قرار داده شد. عضله‌ی پهن جانبی رت‌ها برای بررسی میزان بیان ژنی یا mRNA ژن‌های PERK و IRE1α در دمای ۸۰- درجه نگهداری شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA استخراج RNA کل، از بافت عضله پهن جانبی با استفاده از کیت QIAzol Ltsis Reagent (Qiagen)(آلمان) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. بدین‌صورت که یک میلی‌لیتر محلول RNXTM-PLUS (سیناژن-ایران) به ازای هر ۱۰۰ نانوگرم از بافت هموژن شده عضله پهن جانبی در هاون استریل RNAse Free، افزوده شد و سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس به هر میکروتیوب µl۲۰۰ کلروفروم افزوده شد و میکروتیوب به‌شدت با دست به مدت ۱۵ ثانیه تکان داده شده و ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه انکوبه گردید و در ادامه به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط ۴ درجه و ۱۵۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. به‌دقت و بدون تکان دادن تیوب، فاز روئی که حاوی RNA بود، جداسازی گردید و به میکروتیوب دیگر منتقل شده و به محلول جدا شده حجم مساوی از ایزوپروپانول اضافه گردید و ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه انکوبه شد. بعد از آن میکروتیوب به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط ۴ درجه و ۱۵۰۰۰g سانترفیوژ شده، مایع روئی بیرون ریخته شده و سپس یک میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد به میکروتیوب اضافه گردید. بلافاصله میکروتیوب به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط ۴ درجه و ۱۵۰۰۰ g سانترفیوژ شده، مایع رویی بیرون ریخته شد و به‌دقت اتانول خالی شد و حدود ۲۰ دقیقه اجازه داده شد تا الکل تبخیر گردد. به هر میکروتیوب

۲۰ µL DEPC-treated eater افزوده‌شده و برای ادامه مراحل در فریزر ۷۰ - درجه نگهداری کردیم.

سنتز cDNA با استفاده از کیت RevertAID TM Firs Standard cDNA) synthesis (Fermentas (فرانسه) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد.

Real time-PCR بیان ژن‌های فاکتورهای موردنظر از بافت عضله پهن جانبی با تکنیک Real time-PCR سنجیده و پس از کمی سازی مقادیر بیان ژن با فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$تجزیه‌وتحلیل شد. واکنش PCR با استفاده از PCR master mix (Applied Biosystems) و برای سنجش SYBR Green از کیت (SYBR-green Real Time RT-PCR، TAKARA) (ژاپن) استفاده شد. توالی پرایمرهای مورداستفاده در تحقیق حاضر در جدول شماره ۲ درج شده است.

ملاحظات اخلاقی

این تحقیق توسط کمیته پزشکی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی تبریز به شماره کد اخلاقی IR.IAU.TABRIZ.REC.1397.006 مورد تأیید قرار گرفته است.

روش تحلیل آماری

ابتدا توزیع طبیعی وزن توسط آزمون شاپیرو ویلکز و برابری واریانس‌ها توسط آزمون لون ارزیابی شد. برای آنالیز نهایی داده‌های به‌دست‌آمده با استفاده از روش آماری تحلیل واریانس یک‌راهه و به‌کارگیری نرم‌افزار SPSS23 اقدام شد. ارزش معنی‌داری هر یک از داده‌های حاصل، با فاصله اطمینان ٪۹۵ و ضریب اطمینان ۰/۰۵ سنجش شده و گزارش گردید.

جدول۱: پروتکل تمرینات استقامتی

	متغیر				متغیر	
	مدت	سرعت	شیب		مدت	سرعت	شیب
	۵ دقیقه	۵ متردردقیقه	۰		۵ دقیقه	۸ متر در دقیقه	۵
	۵ دقیقه	۷ متردردقیقه	۰		۱۰ دقیقه	۱۳ متر در دقیقه	۵
هفته اول	۵ دقیقه	۸ متر در دقیقه	۰	هفته پنجم	۱۰ دقیقه	۱۵ متر در دقیقه	۵
	۵ دقیقه	۵ متر در دقیقه	۰		۳۰ دقیقه	۱۸ متر در دقیقه	۵
					۵ دقیقه	۸ متر در دقیقه	۰

Copyright © The Authors Publisher: University of Guilan

	۵ دقیقه	۷ متر در دقیقه	۰		۵ دقیقه	۸ متر در دقیقه	۱۰
	۱۰ دقیقه	۸ متر در دقیقه	۰		۱۰ دقیقه	۱۳ متر در دقیقه	۱۰
هفته دوم	۳۰ دقیقه	۱۰ متر در دقیقه	۰	هفته ششم	۱۰ دقیقه	۱۵ متر در دقیقه	۱۰
	۵ دقیقه	۷ متر در دقیقه	۰		۳۰ دقیقه	۱۸ متر در دقیقه	۱۰
					۵ دقیقه	۸ متر در دقیقه	۰
	۵ دقیقه	۸ متر در دقیقه	۰		۵ دقیقه	۸ متر در دقیقه	۱۰
	۱۰ دقیقه	۱۰ متر در دقیقه	۰		۱۰ دقیقه	۱۳ متر در دقیقه	۱۰
هفته سوم	۱۰ دقیقه	۱۳ متر در دقیقه	۰	هفته هفتم	۱۰ دقیقه	۱۵ متر در دقیقه	۱۰
	۳۰ دقیقه	۱۵ متر در دقیقه	۰		۳۰دقیقه	۱۸ متر در دقیقه	۱۰
	۵ دقیقه	۸ متر در دقیقه	۰		۵ دقیقه	۸ متر در دقیقه	۰
	۵ دقیقه	۸ متر در دقیقه	۰		۵ دقیقه	۸ متر در دقیقه	۱۰
	۱۰ دقیقه	۱۳ متر در دقیقه	۰		۱۰ دقیقه	۱۳ متر در دقیقه	۱۰
هفته چهارم	۱۰ دقیقه	۱۵ متر در دقیقه	۰	هفته هشتم	۱۰ دقیقه	۱۵ متر در دقیقه	۱۰
	۳۰ دقیقه	۱۸ متر در دقیقه	۰		۳۰دقیقه	۱۸ متر در دقیقه	۱۰
	۵ دقیقه	۸ متر در دقیقه	۰		۵ دقیقه	۸ متر در دقیقه	۰

جدول ۲. توالی پرایمرها

نام پرایمر	توالی پرایمر	اندازه محصول PCR بر اساس جفت باز	Tm پرایمر بر اساس درجه سانتی‌گراد
PERK-F	7	119	60/62
PERK-R	GGAAGTTTTGTGGGTGCCCT		60/22
IRE1a-F	TGTGGTCAAGATGGACTGGC	103	60/62
IRE1a –R	TCGGAGGAGGTCTCTCACAG		61/02

یافته‌ها

بر اساس آماره F برابر با ۰/۵۳، مقدار احتمال p برابر با ۰/۶۶ و در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ وزن حیوانات در چهار گروه استقامتی، مقاومتی، ترکیبی و کنترل پیش از شروع مداخله، تفاوت معنی‌دار نداشته است. با توجه به جدول ۳ در سه گروه تمرینی متعاقب دو ماه تمرین استقامتی، مقاومتی و ترکیبی تفاوت معنی‌داری در وزن رت‌ها رخ داده است. آزمون تعقیبی نشان داد که پس از اعمال مداخله، در وزن گروه کنترل هیچ تفاوت معنی‌داری دیده نشده (p=۰/۳۳)؛ ولی میانگین وزنی گروه‌های استقامتی، قدرتی و ترکیبی نسبت به قبل از شروع مداخله کاهش معنی‌داری پیدا کرد (به ترتیب، p=۰/۰۰۷، p=۰/۰۲ و p=۰/۰۳).

جدول ۳ میانگین و خطای استاندارد وزن آزمودنی‌ها و بیان ژنی IRE1α و PERK عضله پهن جانبی در گروه‌های تمرینی استقامتی، مقاومتی و ترکیبی و گروه کنترل پس از اعمال مداخله و نتیجهٔ مقایسهٔ گروه‌ها با آزمون تحلیل واریانس یک‌راهه را نشان می‌دهد.

نتایج RT-PCR نشان می‌دهد که میزان بیان ژنی IRE1α و PERK بعد از انجام تمرین استقامتی افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل دارند (p=۰/۰۰۱ و p=۰/۰۰۱). بیان ژنPERK با انجام تمرینات قدرتی و ترکیبی نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری یافت (p=۰/۰۰۱ و p=۰/۰۰۸). ولی با انجام تمرینات ترکیبی و قدرتی تفاوت معنی‌داری در میزان بیان ژنی IRE1α نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد (p=۰/۶۲ و p=۰/۰۳)

جدول ۳. مقایسهٔ وزن، بیان ژنی IRE1α و PERK پس از دو ماه مداخله

متغیر	گروه	تعداد	میانگین	خطای استاندارد	F	P
وزن (گرم)	استقامتی	۹	۳۱۰/۴	۶/۶	۵/۲۹	۰/۰۰۵*
	مقاومتی	۹	۳۰۴/۲	۱۰/۸		
	ترکیبی	۹	۳۱۶/۸	۷/۸		
	کنترل	۸	۳۴۹/۲	۷/۹		
بیان ژنی IRE1α(Ct)	استقامتی	۹	۲۷/۰۹	۰/۳۴	۱۷/۳۹	۰/۰۰۱*
	مقاومتی	۹	۲۵/۰۶	۰/۲۰		
	ترکیبی	۹	۲۴/۰۴	۰/۴۰		
	کنترل	۸	۲۴/۰۶	۰/۳۸		
بیان ژنی PERK(Ct)	استقامتی	۹	۲۵/۰۴	۰/۳۱	۱۳/۰۵	۰/۰۰۱*
	مقاومتی	۹	۲۵/۰۵	۰/۲۷		
	ترکیبی	۹	۲۴/۰۸	۰/۴۱		
	کنترل	۸	۲۳/۰۳	۰/۱۷		

سطح معنی‌داری p<۰.۰۵ می‌باشد.

Copyright © The Authors Publisher: University of Guilan

بحث

عضله اسکلتی، از مهم‌ترین بافته‌ای بدن انسان است که بیش از نیمی از توده بدن را تشکیل می‌دهد. نقش کلیدی این عضلات در حفظ ثبات بدن، تولید نیرو و نیز برای انجام حرکات و عملکرد متابولیکی، به‌خوبی مشخص‌شده است. زوال توده و قدرت عضلانی مرتبط با عوامل مختلف، باعث کاهش ظرفیت عملکردی افراد می‌شود. دراین‌بین، آپوپتوز عضله اسکلتی نقش مهمی در بیماری‌های مرتبط با تخریب عملکرد بافتی مانند آتروفی عضلانی بازی می‌کند. برخی شواهد حاکی از آن است که تمرینات ورزشی ممکن است تعدادی از مسیرهای پیام‌رسانی مربوط به آپوپتوز را در عضله اسکلتی تحت تاثیر قرار دهد (۱۸). بنابراین، تحقیق حاضر با هدف تأثیر دو ماه تمرین ورزشی ترکیبی بر بیان ژن‌های IRE1α و PERK در عضله پهن جانبی رت‌های ویستار نر بررسی شد.. نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش با نتایج پژوهش-های پریرا و همکاران[1] (۲۰۱۶) مطابقت دارد. تحقیقات آن‌ها نشان داد که ۳۵ موش صحرایی، ۸ هفته در سربالایی و سراشیبی دویدند. سطح Bip، ATF6، IRE1α، P-PERK در عضلات اکستنسور انگشتان موش‌های که ۸ هفته در سراشیبی دویدند در مقایسه با موش‌های که در سربالایی دویدند افزایش معناداری داشت. فعال شدن PERK منجر به انباشته شدن CHOP گردید. CHOPرونویسی Bim را که یک عضو پروآپوپتوتیک خانواده پروتئین BCL-2 است القا می‌کند که به‌طور مستقیم باعث مرگ سلول توسط نفوذپذیری غشای بیرونی میتوکندری می‌شود (۱۹). همسو با نتایج این تحقیق، تحقیقات لیو و همکاران[2] (۲۰۱۵) نشان داد که ۹ هفته تمرین استقامتی یکنواخت و استقامتی وامانده‌ساز باعث افزایش بیان برخی ژن‌های درگیر در آپوپتوز میتوکندریایی شد. لذا این قرارداد تمرینی با افزایش فشار اکسایشی و کاهش ظرفیت ضد اکسایشی موجب تسریع آپوپتوز شده است (۲۰). همچنین پانووف و همکاران[3] (۲۰۰۱) اثرات سه پروتکل تمرین استقامتی فوق‌العاده بر روی سطوح BiP، PERK، IRE1α، ATF6، Caspase4، Caspase12 در هیپوتالاموس موش را نشان دادند. موش‌ها به‌صورت تصادفی به سه گروه کنترل، گروه حرکت به سراشیبی، گروه حرکت به سربالایی

[1] Pereira and et al
[2] Liu and et al
[3] Phaneuf and et al

تقسیم شدند. گروه حرکت به سراشیبی نشان داد سطوح تمام نشانگرهای ERS در هیپوتالاموس در پایان هفته ۸ افزایش‌یافته است. گروه‌های سربالایی و گروه کنترل در پایان هفته در هیپوتالاموس سطح BiP، IRE1α و PERK را افزایش دادند. درنتیجه، سه پروتکل تمرین بیش‌ازحد نشان داد که ERS در پایان هفته هشتم افزایش‌یافته است (۱۲). از طرف دیگر کادیر و همکاران[1] (۲۰۱۶) در تحقیقی بررسی کردند، سطح GRP78، سه ناحیه UPR، فعال‌سازی رونویسی ATF6، IRE1α و PERK در افراد چاق افزایش می‌یابد. درنهایت، آن‌ها نشان دادند که ورزش استقامتی به‌طور قابل‌توجهی بیان و انتشار GRP78 را کاهش می‌دهد که هم‌زمان با کاهش فسفوریلاسیون IRE1α و eIF2α همراه است. نتایج نشان داد که ورزش استقامتی باعث کاهش ERS از طریق کاهش شبکه‌های سیگنال GRP78 در آزمودنی‌ها می‌شود. تناقض این مطالعه با پژوهش حاضر، احتمالا ناشی از نوع تمرین یا پروتکل تمرینی با شدت پایین‌تر و نوع آزمودنی‌ها می‌باشد (۲۱). در مورد اثر تمرین ترکیبی بر بیان ژن PERK نتایج تحقیق کانگ و همکاران[2] (۲۰۱۳) نشان داد که ورزش ترکیبی (شنا و قدرتی) سطح P-PERK، peIF2α، JNK، IKBα و NF-KBدر مدل موش‌های چاق را کاهش می‌دهد (۲۲). در مورد نتایج همسو با نتایج پژوهش حاضر، هیچ تحقیقی مشاهده نگردید. همچنین، در نتایج تحقیق حاضر، در اثر دو ماه تمرین قدرتی میزان بیان ژن PERK افزایش یافت. در تائید این نتایج، سو و همکاران[3] (۲۰۱۲) در تحقیقی که بر روی عضله‌ی اسکلتی مرتبط با ERS انجام دادند، نشان دادند که نشانگرهای ERS مانند GRP78، PERK و CHOP پس از انواع تمرین مقاومتی فعال‌شده و افزایش می‌یابد. با فعال شدن PERK یکی از مؤلفه‌های مهم آپوپتوز ناشی از ERS، به نام CHOP نیز فعال می‌شود که به‌عنوان GADD153 شناخته شده است (جلوگیری از رشد و آسیب DNA 153) (۲۳). اما همسو با نتایج این تحقیق هامپتون[4] (۲۰۰۰) در تحقیقی نشان داد که تمرین مقاومتی باعث تحریک سنتز پروتئین می‌شود. بااین‌حال، پس از تمرین

[1] Khadir and et al
[2] Kang and et al
[3] Sou and et al
[4] Hampton

Copyright © The Authors

ورزشی، تجمع پروتئین باز ممکن است UPR را فعال کند. همچنین آن‌ها ۴۸ ساعت پس از فعالیت ورزشی عضله پهن جانبی را بایوپسی کردند. نتایج نشان داد پروتئین‌های GRP78، PERK و IRE1α افزایش‌یافته‌اند. باوجود پروتئین بالا، GRP78 و PERK mRNA بدون تغییر بوده‌اند. بااین‌حال، mRNA IRE1α افزایش یافته است. این داده‌ها نشان می‌دهد که تمرین مقاومتی مسیرهای خاصی از UPR (IRE1α،ATF6) را فعال می‌کند، ولی فاکتور آغازکننده PERK و CHOP را فعال نمی‌کند. درنتیجه ورزش مقاومتی در فعال شدن UPR صرف‌نظر از سن تاثیر دارد (۲۴). با توجه به یافته‌های پژوهش حاضر می‌توان نتیجه گرفت که دو ماه تمرین ترکیبی باعث افزایش بیان ژن PERK شده، ولی هیچ تأثیری بر بیان ژن IRE1α نداشت. همچنین، تمرین استقامتی موجب افزایش بیان ژن PERK و IRE1α شده و باعث آپوپتوز بافت عضله پهن جانبی می‌شود

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی و با توجه به نتایج پژوهش حاضر می‌توان بیان کرد که با انجام دو ماه تمرین ترکیبی با شدت بالای متوسط می‌توان نتیجه گرفت که تمرینات استقامتی، قدرتی و ترکیبی باعث افزایش بیان ژن PERK می‌شود. همچنین انجام تمرین استقامتی باعث افزایش ژن IRE1α شده، ولی انجام دو ماه تمرینات قدرتی و ترکیبی تأثیری بر روی بیان ژن IRE1α ندارد. بااین‌حال می‌توان بیان کرد این پژوهش تأثیرات عملکردی مثبت همچون کاهش وزن و افزایش برخی ژن‌های درگیر در آپوپتوز مانند PERK و IRE1α و bax وbcl2 دارد که نقش کلیدی را ایفا می‌کنند. به این صورت که استرس مزمن ER، مسیر PERK را فعال می‌کند که نتیجه آن بیان ATF4 می‌باشد. که باعث آپوپتوز وابسته به کاسپاز توسط سرکوب بیانdiap1 می‌شود با توجه به محدودیت‌های پژوهش حاضر مانند عدم اندازه‌گیری تغییرات مورفولوژیکی و ارزیابی بیان سایر پروتئین‌های درگیر در آپوپتوز، اظهارنظر قطعی در زمینه آپوپتوز عضله پهن جانبی و تمرینات ورزشی مختلف منوط به انجام تحقیقات و مطالعات بیشتر می‌باشد.

منابع

1. Hunter, G.R., J.P. McCarthy, and M.M. Bamman, Effects of resistance training on older adults. Sports medicine, 2004. **34**(5): p. 329-348.
2. Ellison, G.M., et al., Physiological cardiac remodelling in response to endurance exercise training: cellular and molecular mechanisms. Heart, 2012. **98**(1): p. 5-10.
3. Eizirik, D.L., A.K. Cardozo, and M. Cnop, The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. Endocrine reviews, 2007. **29**(1): p. 42-61.
4. Walter, P. and D. Ron, The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. Science, 2011. **334**(6059): p. 1081-1086.
5. Gregor, M.F. and G.S. Hotamisligil, Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. Journal of lipid research, 2007. **48**(9): p. 1905-1914.
6. Ron, D. and S.R. Hubbard, How IRE1 reacts to ER stress. Cell, 2008. **132**(1): p. 24-26.
7. Cui, W., et al., The structure of the PERK kinase domain suggests the mechanism for its activation. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2011. **67**(5): p. 423-428.
8. Verfaillie, T., et al., PERK is required at the ER-mitochondrial contact sites to convey apoptosis after ROS-based ER stress. Cell death and differentiation, 2012. **19**(11): p. 1880.
9. Wek, R.C. and D.R. Cavener, Translational control and the unfolded protein response. Antioxidants & redox signaling, 2007. **9**(12): p. 2357-2372.
10. Zhang, B., et al., Involvement of the Nrf2 pathway in the regulation of pterostilbene-induced apoptosis in HeLa cells via ER stress. Journal of pharmacological sciences, 2014. **126**(3): p. 216-229.
11. Bourdier, G., et al., High-intensity training reduces intermittent hypoxia-induced ER stress and myocardial infarct size. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2015. **310**(2): p. H279-H289.
12. Phaneuf, S. and C. Leeuwenburgh, Apoptosis and exercise. Medicine and science in sports and exercise, 2001. **33**(3): p. 393-396.
13. Song, W., H.-B. Kwak, and J.M. Lawler, Exercise training attenuates age-induced changes in apoptotic signaling in rat skeletal muscle. Antioxidants & redox signaling, 2006. **8**(3-4): p. 517-528.
14. Fernandes, T., et al., Aerobic exercise training inhibits skeletal muscular apoptotic signaling mediated by VEGF-VEGR2 in spontaneously hypertesive rats. Revista Brasileira de Medicina do Esporte, 2012. **18**(6): p. 412-418.

Copyright © The Authors Publisher: University of Guilan

15. Marzetti, E., et al., Cellular mechanisms of cardioprotection by calorie restriction: state of the science and future perspectives. Clinics in geriatric medicine, 2009. **25**(4): p. 715-732.
16. Cassilhas, R., et al., Spatial memory is improved by aerobic and resistance exercise through divergent molecular mechanisms. Neuroscience, 2012. **202**: p. 309-317.
17. Leandro, C.G., et al., A program of moderate physical training for Wistar rats based on maximal oxygen consumption. Journal of strength and conditioning research, 2007. **21**(3): p. 751.
18. Kim, J.-s., et al., Resting and load-induced levels of myogenic gene transcripts differ between older adults with demonstrable sarcopenia and young men and women. Journal of applied physiology, 2005. **99**(6): p. 2149-2158.
19. Pereira, B.C., et al., Excessive eccentric exercise-induced overtraining model leads to endoplasmic reticulum stress in mice skeletal muscles. Life sciences, 2016. **145**: p. 144-151.
20. Liu, Y., et al., Role for the endoplasmic reticulum stress sensor IRE1α in liver regenerative responses. Journal of hepatology, 2015. **62**(3): p. 590-598.
21. Khadir, A., et al., Physical exercise alleviates ER stress in obese humans through reduction in the expression and release of GRP78 chaperone. Metabolism, 2016. **65**(9): p. 1409-1420.
22. Kang, E.-B., et al., Treadmill exercise represses neuronal cell death and inflammation during Aβ-induced ER stress by regulating unfolded protein response in aged presenilin 2 mutant mice. Apoptosis, 2013. **18**(11): p. 1332-1347.
23. Sou, S.N., K.M. Ilieva, and K.M. Polizzi, Binding of human BiP to the ER stress transducers IRE1 and PERK requires ATP. Biochemical and biophysical research communications, 2012. **420**(2): p. 473-478.
24. Hampton, R.Y., ER stress response: getting the UPR hand on misfolded proteins. Current Biology, 2000. **10**(14): p. R518-R521.

https://doi.org/ 10.22124/jme.2023.23967.262

Metabolism and Exercise
A bioannual journal

Vol 12, Number 1, 2022

University Of Guilan

The effect of two months of combined exercise training on IRE1α and PERK gene expression in the vastus lateralis muscle of male Wistar rats

Esmaili Z[1], Zahsaz F[2]*, Noorazar A[3]

Received: 11/12/2021 Accepted: 22/5/2022 Published: 21/04/2023

Abstract

Aim: Apoptosis of skeletal muscle plays an important role in diseases related to the destruction of tissue function such as muscle atrophy. Exercise training may affect a number of signaling pathways related to apoptosis in skeletal muscle. Therefore, the present study was conducted with the aim of determining the effect of two months of combined exercise training on the expression of PERK and IRE1α genes in the vastus lateralis muscle of male Wistar rats.

Method: The present study was conducted in the form of a three-group experimental design with a control group. 35 male Wistar rats were randomly replaced in four groups: control (n=8), endurance (n=9), strength (n=9), endurance-strength (n=9), and other than the control group, the next three groups They participated in sports training for two months. After the implementation of the training protocol, surgery and tissue extraction of the broad lateral muscle were performed. The data were analyzed using one-way analysis of variance at a significance level of $P<0.05$.

Results: The results of this research showed that after two months of endurance training, the expression of IRE1α and PERK genes increased significantly compared to the control group ($p=0.001$ and $p=0.001$). Resistance training had no effect on IRE1α gene expression ($p=0.03$), but increased PERK gene expression compared to the control group ($p=0.001$). Also, the combined training group had no difference in the expression of IRE1α gene compared to the control group ($p=0.62$), but increased the expression of PERK gene compared to the control group ($p=0.008$).

Conclusion: It seems that two months of combined strength and endurance training has a significant effect on increasing PERK gene expression in the mitochondrial pathway of apoptosis of the latissimus dorsi muscle. Also, endurance training increased the expression of IRE1α gene. However, making a definitive statement about the effect of exercise training on the indicators related to the apoptosis of the latissimus dorsi muscle requires more studies.

Keywords: Combined practice, Vastus lateralis muscle, ER stress, PERK, IRE1α

1.PhD student of exercise physiology, Tabriz Azad University, Tabriz, Iran, 2. Associate Professor of Exercise Physiology, Faculty of Human Sciences, Tabriz Azad University, Tabriz, Iran, 3. Assistant Professor of Veterinary Medicine, Tabriz Azad University, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz, Iran. *Email: f-zehsaz@iaut.ac.ir

Copyright © The Authors Publisher: University oF Guilan