



دوفصلنامه سوخت و ساز و فعالیت ورزشی

سال سیزدهم، جلد سیزدهم، شماره ۲



دانشگاه گیلان

Open Access

مقاله پژوهشی

تأثیر هشت هفته تمرین مقاومتی فزاینده و مکمل BCAA نانولیپوزوم بر بیان ژن HSP60، MiR-200a میتوکندری عضله سولئوس و IGF-1 سرمی رت‌های نر سالمند

اباذر تیموری^{۱*}، علیرضا روزبهانی^۲، زهرا کریمی مهر^۲

تاریخ چاپ: ۱۴۰۲/۰۹/۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۰۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۳۱

چکیده

هدف: هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر هشت هفته تمرین مقاومتی فزاینده و مکمل BCAA نانولیپوزوم بر بیان ژن MiR-200a، HSP60، میتوکندری عضله سولئوس و IGF-1 سرمی رت‌های نر سالمند بود.

روش: ۳۲ سر موش صحرایی نر ۲۴ ماهه در ۴ گروه کنترل، مکمل (BCAA نانولیپوزوم)، توام (تمرین مقاومتی + مکمل و تمرین تقسیم شدند. تمرین مقاومتی شامل هشت هفته تمرین نردبان با شدت متوسط (۷۰ درصد از MVCC) و پنج روز در هفته بود. در گروه‌های مکمل و توام ۵ روز در هفته و به مدت ۸ هفته، مکمل BCAA نانولیپوزوم و به میزان ۶۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت گاواژ دریافت شد. MiR200a و HSP60 با استفاده از روش Real-time PCR و IGF-1 سرمی به روش الایزا به دست آمد. تجزیه و تحلیل آماری با تحلیل واریانس دوطرفه، یکطرفه و آزمون تعقیبی توکی انجام شد.

یافته‌ها: نتایج بیانگر کاهش معنی‌دار MiR-200a و افزایش معنی‌دار بیان ژن HSP60 عضله سولئوس و IGF-1 سرمی در گروه توام و تمرین به نسبت گروه‌های مکمل و کنترل بود (p=۰/۰۰۱). تفاوت معنی‌داری بین دو گروه کنترل و مکمل مشاهده نشد (p=۰/۱۰۵).

نتیجه‌گیری: اثر مستقیم miR-200a و HSP60 بر سیگنال IGF-1 اثر مهمی بر رشد و آتروفی عضله ایجاد می‌کند. افزایش IGF-1 با تمرین قدرتی و مکمل BCAA باعث ایجاد هیپرتروفی و یک محیط آنابولیک شده و می‌تواند بر عوامل رشد عضلانی مرتبط با سن تأثیر و سودمندی‌هایی در این خصوص برای سالمندان داشته باشد.

واژگان کلیدی: تمرین مقاومتی، BCAA، میکرو RNA، HSP60 و سارکوپنی.

۱. استادیار، گروه تربیت بدنی دانشگاه فرهنگیان، کرج، ایران. ۲. کارشناس ارشد فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: drteimooriphd@gmail.com

مقدمه

فرضیه با از بین رفتن میتوکندری، مقادیر و عملکرد آنزیم‌های زنجیره تنفسی میتوکندری کاهش و به دنبال آن مقادیر فشار اکسایشی در سلول افزایش می‌یابد. این فرایند سبب تخریب سلولی و کاهش طول عمر به دنبال کاهش بیوژنز میتوکندری می‌شود (۱۴). بسیاری بر این باورند که کاهش ظرفیت بیوژنز میتوکندریایی در دوران سالمندی یک عامل کلیدی در پیشرفت بیماری‌های وابسته به سالمندی است (۱). بیوژنز میتوکندری با توانایی خود در ایجاد میتوکندری‌های جدید و افزایش تراکم آن می‌تواند این عوارض را به حداقل برساند (۳). مکانیسم‌های سلولی زمینه‌ساز آپوپتوزیس ناشی از سارکوپنیا در عضلات اسکلتی پیچیده و نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد. در این راستا، میکرو-ریبونوکلیک اسیدها مولکول‌های تک‌رشته‌ای کوتاه با اندازه‌ای در حدود ۱۸ تا ۲۵ نوکلئوتید هستند که با مهار ترجمه mRNA یا شکافت mRNA هدف، باعث خاموش شدن ژن پس از رونویسی می‌شوند (۵). طبق تحقیقات بالینی و آزمایش‌های حیوانی، miR ها نشانگرهای زیستی بالقوه و اهداف درمانی برای آتروفی عضلانی بشمار می‌روند (۷). در پژوهش‌های متعدد اخیر، نقش miRNAs در ترمیم بافت عضله پس از سارکوپنی بررسی شده است. براساس این مطالعات، miRNAs تمایز سلول‌های بنیادی جنینی را آغاز می‌کنند. میکروRNAهای مختلفی می‌توانند در مرگ سلولی آپوپتوزی درگیر شوند. miR-200a قادر به دستکاری مسیر پیام‌رسانی E-cadherin و Wnt/ β -catenin، که سبب کاهش E2F1 و در ادامه تضعیف فسفوریلاسیون Akt و القای

در سال‌های اخیر، مطالعات در زمینه جمعیت سالمندی بسیار مورد توجه بوده‌اند. سالمندی دوره‌ای اجتناب‌ناپذیر از زندگی انسان، یک فرایند ذاتی، جهانی، پیش‌رونده و آسیب‌رسان است که به مرور زمان و به تدریج باعث ایجاد آسیب‌های مختلف و کاهش کارایی عملکرد همئوستازی در سلول‌ها و بافت‌ها می‌شود؛ بنابراین، شناخت این دوره از زندگی و بیماری‌های مرتبط با آن ضروری به نظر می‌رسد (۲۷). با افزایش سن خطرات مرتبط با سارکوپنیا^۱ افزایش می‌یابد که کاهش تدریجی و اجتناب‌ناپذیر حجم عضلانی و قدرت است که همراه با عوامل محیطی نظیر کاهش فعالیت بدنی، مصرف ناکافی پروتئین و اختلال در سیستم هورمونی روی می‌دهد (۲۶). آتروفی عضلانی در شرایطی اتفاق می‌افتد که تجزیه پروتئین عضله بیشتر از سنتز پروتئین باشد. بنابراین هیپرتروفی^۲ یا جبران آتروفی^۳، یک هدف برای سالمندان جهت بهبود شرایط عضلانی به حساب می‌آید و لذا درک سازوکارهای تنظیم توده عضلانی مهم است (۱۹). شواهدی وجود دارد که کاهش مرتبط با سن در GH همراه با کاهش IGF-1 به توسعه سارکوپنیا کمک می‌کند (۳۱). IGF-1 تنظیم کننده مثبت رشد عضله اسکلتی است و کاهش تولید GH و کم شدن پاسخ IGF-1 به تمرین مقاومتی در سالمندی نشان داده شده است. IGF-1 نقش مهمی در هیپرتروفی عضلانی متعاقب اعمال بار مکانیکی ایفا می‌کند (۲۳). یکی از فرضیات اصلی که با تسریع در روند سالمندی همراه است، نقص در عملکرد میتوکندری است (۴). طی این

3. atrophy

1. Sarcopenia
2. hypertrophy

۳ و قطعه‌قطعه شدن DNA می‌شود (۸). از آنجایی که HSP60 می‌تواند بر آپوپتوز عضلانی تأثیر بگذارد، تصور می‌شود این چارپون در پاتوژنز نارسایبی ناشی از سارکوپنی مشارکت می‌کند. این وضعیت اساساً حالت التهاب مزمن و آسیب پیش‌رونده کشنده عضله اسکلتی است که منجر به مرگ سلول و در نتیجه آتروفی عضلانی می‌شود (۱۰).

به نظر می‌رسد فعالیت بدنی و به‌طور ویژه تمرین مقاومتی می‌تواند از کاهش توده عضلانی جلوگیری کند و حتی روند آن را معکوس سازد (۳۰). انجام تمرینات مقاومتی توسط سالمندان، منجر به هیپرتروفی عضلانی در این افراد می‌شود. مکانیسم‌های احتمالی که منجر به افزایش عضله ناشی از تمرین مقاومتی در افراد سالمند می‌شود می‌تواند به دلیل افزایش سنتز پروتئین عضلانی، فعال‌سازی و تکثیر سلول‌های ماهواره‌ای باشد (۱۶). در این راستا استبانز^۲ و همکاران (۲۰۱۹) گزارش نمودند که غلظت میوستاتین در هر دو گروه سارکوپنیا و بدون سارکوپنیا بعد از تمرین مقاومتی کاهش و در مقابل سطوح فولیستاتین افزایش یافته بود (۱۷). افزون بر انواع متفاوت فعالیت بدنی، مداخلات درمانی نوآورانه در سال‌های اخیر برای درمان آتروفی ناشی از سارکوپنی بررسی شده است که یکی از آن‌ها، مداخلات تغذیه‌ای است. عضلات اسکلتی از اسیدهای آمینه شاخه‌دار حین ورزش به‌عنوان منبع انرژی استفاده می‌کند (۱۸). تأثیر مثبت مکمل BCAA حین تمرینات مقاومتی تقریباً به‌خوبی روشن است و نتایج مطالعات نشان می‌دهد BCAA موجب افزایش توده عضلانی و هورمون‌های آنابولیک

آپوپتوز می‌شود (۱۲). بیان miR-200a همراه با سالمندی افزایش و به‌طور خاص با کاهش در مقادیر miR-1 نقش مهمی در کاهش IGF-1 دارد (۱۳). لیائو^۱ و همکاران (۲۰۱۹) اعلام نمودند که با افزایش سن مقادیر miR-200a افزایش می‌یابد که با افزایش در مقادیر آپوپتوز همراه است (۲۴). همچنین miR-200a در فعال‌سازی آپوپتوز از طریق کاهش بیان پروتئین‌های شوک گرمایی HSP60 و HSP70 مشارکت می‌کند که از مشخص‌ترین پاسخ‌های سلولی به استرس ناشی از سارکوپنی در عضلات اسکلتی هستند (۱۱). هدف از تولید این پروتئین‌ها برگرداندن هومئوستاز، ترمیم و حفاظت از سلول در برابر آسیب‌های بیشتر است (۲). هر کدام از پروتئین‌های شوک گرمایی با گروه خاصی از مولکول‌ها واکنش نشان می‌دهند (۲۸). HSP60 در میتوکندری به تسهیل تاشدگی پروتئین کمک می‌کند و به دلیل نقش اساسی در پشتیبانی از عملکرد میتوکندری به‌عنوان یکی از مهم‌ترین پروتئین‌ها برای بقای سلول به‌شمار می‌رود (۲۱). مطالعات نشان می‌دهد این چارپون در مکان‌های خارج از سلول در جایی که به‌طور مستقیم به تاشدن پروتئین وابسته نیستند، مانند تنظیم آپوپتوز، القای التهاب و سیگنالینگ سلول نیز یافت می‌شود (۱۵). سطوح mRNA HSP60 در افراد با سارکوپنی پیش‌رونده در مقایسه با گروه کنترل طبیعی دو برابر کمتر گزارش شده است (۶). کاهش HSP60 در میتوکندری‌های عضلانی منجر به تجزیه کمپلکس‌های بین چارپونی، Bak و Bax شده، آپوپتوز را القا و با انتشار و رهاسازی سیتوکروم C، منجر به فعال‌سازی کاسپاز

1. Liao
2. Estébanez

روش پژوهش

در پژوهش حاضر ۳۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با میانگین وزنی ۴۴۳/۲ گرم در سن ۲۴ ماهگی (۶۵ سالگی انسان) از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. آن‌ها در شرایط دمایی 3 ± 22 درجه سانتی‌گراد در شرایط ۱۲:۱۲ ساعت تاریکی و روشنایی و رطوبت نسبی ۳۰ تا ۵۰ درصد نگهداری شدند و با غذای مخصوص موش صحرایی و آب تغذیه شدند. همچنین، همه قوانین و نحوه رفتار با حیوانات (آشناسازی، تمرین، بیهوشی و کشتن حیوان) براساس انجمن ارزیابی و اعتباربخشی بین‌المللی مراقبت از حیوانات آزمایشگاهی و با تأیید شورای تحصیلات تکمیلی دانشگاه انجام شد. بعد از گذشت ۲ هفته آشناسازی و سازگاری حیوانات با محیط آزمایشگاه، براساس وزن اولیه موش‌ها، به‌صورت تصادفی در ۴ گروه تمرینی قرار گرفتند. گروه‌های تجربی شامل کنترل، مکمل (BCAA نانولیپوزوم)، توأم (تمرین مقاومتی + مکمل BCAA نانولیپوزوم) و تمرین (تمرین مقاومتی) بود. موش‌ها در هر دو گروه تمرین مقاومتی به‌منظور آشناسازی با نحوه اجرای پروتکل تمرینی، پنج روز بدون وزنه تمرین، بالا رفتن از نردبان را انجام دادند. پس از آخرین جلسه سازگاری، از حیوانات آزمون حداکثر ظرفیت حمل ارادی^۲ (MVCC) گرفته شد که به‌عنوان بیشترین بار حمل‌شده موفقیت‌آمیز تعریف شد (۲۲). سپس هر دو گروه تمرین مقاومتی به‌مدت پنج جلسه در هفته و به‌مدت هشت هفته تمرین مقاومتی را انجام دادند. با توجه به سازگاری حیوانات با تمرین در انتهای هر چهار هفته، از حیوانات

حین ورزش می‌شود (۲۶). در این بین تکنولوژی نانولیپوزوم روش جدیدی برای تسهیل ارائه مناسب‌تر دارو به بافت‌های موردنیاز بدن است. لیپوزوم یک ریز کیسه کروی با یک‌لایه لیپیدی است و مدت طولانی‌تری در خون باقی می‌ماند (۹). در پژوهش‌های صورت‌گرفته گزارش شده است که BCAA در طول فعالیت بدنی، با کاهش رهایش مارک‌های آسیب عضلانی موجب کاهش خستگی مرکزی می‌شود (۲۹). موریواکی^۱ و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند دریافت BCAA منجر به افزایش بیوژنز میتوکندریایی بافت عضله می‌شود (۲۵). یوشیمارا^۲ و همکاران (۲۰۱۹) نیز نشان دادند لوسین از طریق افزایش بیان نیتریک اکساید و بیوژنز میتوکندریایی به افزایش ظرفیت اکسیداتیو کمک می‌کند (۳۲).

با وجود مزیت‌های فراوان فعالیت‌های ورزشی در سلامت فیزیولوژیک عضله اسکلتی افراد سالمند، تحقیقات بسیار اندکی در زمینه تأثیر فعالیت‌های ورزشی و به‌ویژه استفاده از فن‌آوری نوین نانولیپوزوم بر محتوای هورمون IGF-1 و عوامل سلولی مولکولی میتوکندری عضلات اسکلتی متعاقب تمرینات مقاومتی صورت گرفته است. با توجه به نقش چپرون‌ها و میکرو RNA ها در بازسازی میتوکندری و نقش میتوکندری‌ها در آتروفی عضلات اسکلتی و تأثیرپذیری عضلات از تمرینات مقاومتی و مصرف مکمل‌های پروتئینی هدف از انجام تحقیق بررسی تأثیر شش هفته تمرین مقاومتی فزاینده و مکمل BCAA نانولیپوزوم بر بیان ژن HSP60، MiR200a میتوکندری عضله سولئوس و IGF-1 سرمی رت‌های نر سالمند بود.

نعلی نمونه برداری شده پس از شستشو در سرم فیزیولوژیک در میکروتیوب‌های ۱/۸ حاوی مایع RNAlater™ با نسبت ۲۰ درصد غوطه‌ور گردیده و جهت انجام آزمایش‌های ژنتیک به آزمایشگاه انتقال داده شد. برای اندازه‌گیری مقدار miR ابتدا معرف TRIZOL برای به دست آوردن ریبونوکلیک‌اسید از نمونه‌های بافت عضله نعلی استفاده و مقدار پنج نانومول بر لیتر از *Caenorhabditis Elegans miR-33* (cel-) *miR-39* ساخت شرکت applied biosystem به تمام نمونه‌های بافت عضله نعلی اضافه شد. سپس آنالیز اسپکتوفتومتری در طیف ۲۶۰ نانومتر برای ارزیابی غلظت نهایی ریبونوکلیک‌اسید موجود در هر نمونه انجام و پس از آن نمونه‌های موجود در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد فریز شدند. مقدار بیان هر یک از انواع miR ها در زمان تحلیل با استفاده از معرفها Applied Biosystems, Foster City, CA, USA و پرایمرهای TaqMan miRNA qRT-PCR تعیین شد. برای اندازه‌گیری مقدار miR بافت عضله نعلی به وسیله تکنیک Real-time PCR با استفاده از SYBR master mix (Applied Biosystems) و SYBR Green در دستگاه (Applied Biosystems, Foster City, CA) طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. به‌طور ویژه، میزان بیان mRNA نسبی از حاصل تفریق ct مربوط به U6 snRNA از Ct مربوط به mRNA مدنظر به دست آمد که باز از مقدار به‌دست‌آمده در نمونه مرجع کسر شد و cDNA با پرایمرهای مخصوص برای ژن HSP60 تکثیر شد. fold change با استفاده از

آزمون حداکثر ظرفیت حمل ارادی گرفته شد و شدت تمرین حیوانات براساس آزمون جدید تعیین شد (۲۲). پروتکل تمرین مقاومتی شامل بالا رفتن از یک نردبان تمرینی مخصوص (طول ۱۱۰ سانتیمتر، شیب ۸۰ درجه، پله و دو سانتیمتر فضای بین هر پله) شامل بود. گروه‌های تمرینی هشت هفته تمرین مقاومتی نردبان را در ۸۰ درصد از MVCC، نه تا ده بار بالا رفتن در هر جلسه و پنج روز در هفته انجام دادند. برای تعیین حداکثر ظرفیت حمل ارادی، وزنه‌ای دارای ۷۵ درصد وزن بدن حیوان به دمش متصل شد و حیوان شروع به بالا رفتن از نردبان با حمل این بار کرد. سپس، به ازای هر تکرار موفق ۳۰ گرم به بار تمرینی تکرار شده قبلی اضافه شد. در بالای نردبان دو دقیقه استراحت بین هر صعود وجود داشت. این روش تا زمانی تکرار شد که موش به صعود کل طول نردبان در سه تلاش متوالی موفق می‌شد (۲۲). موش‌های صحرائی در گروه مکمل و توام در زمان‌های مشابه با تمرین (۵ روز در هفته به مدت ۸ هفته)، مکمل BCAA نانولیپوزوم دریافت نمودند این مکمل بعد از تمرین و به میزان ۴۶ درصد لوسین، ۲۸ درصد والین و ۲۳ درصد ایزولوسین و به میزان ۶۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن گاوژا شد (۱۳).

جراحی حیوانات آزمایشگاهی و استخراج نمونه

تمامی موش‌های صحرائی، ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، توسط تزریق درون صفاقی کتامین (۹۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) بی‌هوش، جراحی انجام و استخراج بافت آغاز شد. بافت عضله

یافته‌ها

نتایج آزمون برابری واریانس‌ها و طبیعی بودن توزیع داده‌ها نشان داد که در هر سه متغیر وابسته، سطح معناداری از ۰/۰۵ بیشتر است؛ بنابراین، واریانس‌ها برابر هستند و توزیع طبیعی است. در شروع تحقیق تفاوت معنی‌داری بین میانگین وزنی گروه‌های مورد مطالعه وجود نداشت اما وزن بدن موش‌های صحرایی در هر دو گروه تمرین مقاومتی برخلاف دو گروه مکمل و کنترل در طول پژوهش با کاهش همراه بود ($P \leq 0.001$). برخی ویژگی‌های آن‌ها در جدول شماره ۱ ارائه شده است.

معادله $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد (۱۲). برای تجزیه و تحلیل داده‌ها، ابتدا از طبیعی بودن توزیع داده‌ها به کمک آزمون شاپیرو-ویلک اطمینان حاصل شد. در ادامه برای مقایسه بین گروهی داده‌ها پس از پایان مداخله، از تحلیل واریانس عاملی 2×2 استفاده شد که در صورت معنی‌دار شدن یکی از عامل‌ها و تأثیر تعاملی آن‌ها مقایسه بین گروهی داده‌ها با استفاده از تحلیل واریانس تک راهه انجام شد. همچنین در ادامه برای مقایسه دویه‌دوی گروه‌ها از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. در تمام آزمون‌ها سطح اطمینان آماری ۹۵ درصد در نظر گرفته شد.

جدول ۱. ویژگی‌های موش‌های نر صحرایی در گروه‌های پژوهش

کنترل	مکمل	تمرین	توأم
وزن ابتدایی پژوهش	۴۲۱/۲۵±۲۰/۳	۴۴۰/۷۸±۲۲/۳	۴۵۱/۶۵±۲۳/۶
وزن انتهایی پژوهش	۴۸۷/۱۳±۲۳/۵	۴۸۰/۲۵±۱۸/۷	۴۱۳/۶۸±۱۷/۵
وزن عضله نعلی (گرم)	۰/۳۹±۰/۰۶	۰/۳۸±۰/۰۵	۰/۳۱±۰/۰۸
دریافت غذا (گرم/روز)	۲۴/۲۲	۲۴/۲۲	۲۴/۲۲

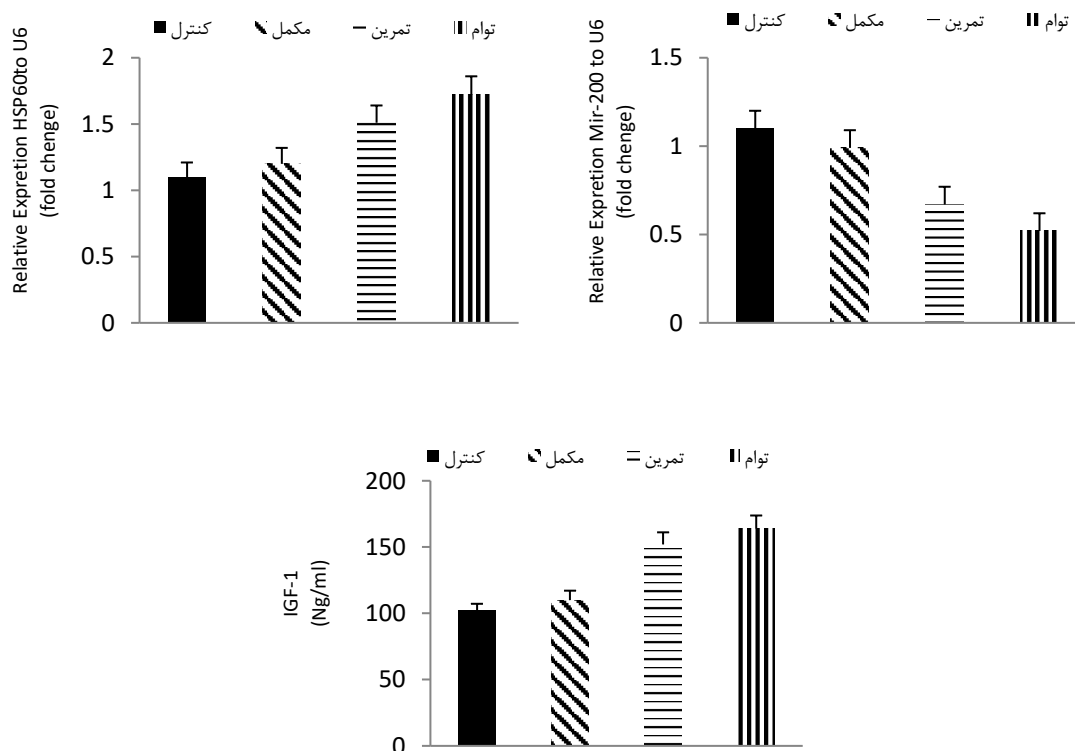
به نسبت گروه‌های مکمل و کنترل بود ($p=0/001$). همچنین تفاوت معنی‌داری بین دو گروه کنترل و مکمل مشاهده نشد ($p=0/105$).

تحلیل واریانس دوراهه برای مقایسه بیان ژن *Mir200a* و *HSP60* میتوکندری بافت عضلانی و *IGF-1* سرمی موش-های صحرایی در ۴ گروه پژوهش تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($p=0/001$). نتایج آزمون تعقیبی بیانگر کاهش معنی‌دار *Mir200* و افزایش معنی‌دار بیان ژن *HSP60* عضله نعلی و *IGF-1* سرمی موش‌های نر صحرایی در گروه توام و تمرین

جدول ۲. نتایج آنالیز واریانس یک طرفه

Sig	F	میانگین مربعات	درجه آزادی	مجموع مجذورات	ANOVA
		۲/۱۵۴	۳	۶/۱۰	درون گروهی
* ۰/۰۰۱	۸/۵۹	۰/۹۹۰	۳۰	۴/۱۲	بین گروهی
		-	۳۲	۱۰/۲۲	کل
		۲/۰۲	۳	۴/۲۱	درون گروهی
* ۰/۰۰۱	۱۰/۳۶	۱/۱	۳۰	۲/۳۰	بین گروهی
		-	۳۲	۶/۵۱	کل
		۱/۱۰۲	۳	۵۸۴۷/۲۵	درون گروهی
* ۰/۰۰۱	۵۰/۱۲	۰/۹۲	۳۰	۱۲۰/۳۰	بین گروهی
		-	۳۲	۵۹۶۷/۵۵	کل

* تفاوت معنی دار



شکل ۱. میانگین بیان ژن Mir-200a و HSP60 میتوکندری و IGF-1 سرمی در هر چهار گروه پژوهش.

بحث

داد فعالیت استقامتی بلندمدت می‌تواند با شدت متوسط و بالا موجب کاهش بیان MiR-200a در عضله قلب هر دو گروه گردد (۱۴). همچنین مطالعه مک کارتی (۲۰۱۷) نشان داد که تمرین مقاومتی موجب کاهش MiR-200a در عضله پلانتریس و نعلی می‌شود که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. با توجه به نتایج این مطالعه و همچنین مطالعات قبل به نظر می‌رسد که تاثیر فعالیت بدنی بر بیان MiR-200a با فعال‌سازی برنامه تبدیل زنجیره سنگین میوزین^۱ و اعمال نوع تمرین ورزشی و نوع تارها ارتباط دارد (۱۵).

همچنین بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر، هشت هفته تمرین مقاومتی فزاینده و مکمل BCAA نانولیپوزوم موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن میانگین HSP60 شده است که این افزایش در گروه مکمل و کنترل مشاهده نشد. در تأیید نتایج پژوهش حاضر، سانگ^۲ و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که ۱۲ هفته تمرین مقاومتی با شدت متوسط موجب افزایش معنی‌دار بیان HSP60 و کاهش قطعه‌قطعه شدن DNA در عضله اسکلتی موش‌های صحرایی سالخورده می‌شود (۲۸). این پژوهشگران عنوان داشتند که افزایش قابل‌توجه بیان HSP60 متعاقب تمرین مقاومتی با کاهش عوامل پیش‌آپوپتوزی مانند بیان پروتئین Bax و نسبت بیان پروتئین Bax به Bcl-2 و نیز افزایش معنی‌دار پروتئین ضدآپوپتوزی Bcl-2 همراه بود. این کاهش پتانسیل آپوپتوز میتوکندریایی متعاقب تمرین در موش‌های سالخورده احتمالاً با کاهش رهائش عوامل آپوپتوتیک

نتایج پژوهش حاضر بیانگر کاهش معنی‌دار MiR-200a و افزایش معنی‌دار بیان ژن HSP60 عضله نعلی و IGF-1 سرمی موش‌های نر صحرایی در گروه توام و تمرین به نسبت گروه‌های مکمل و کنترل بود (p=۰/۰۰۱). همچنین تفاوت معنی‌داری بین دو گروه کنترل و مکمل مشاهده نشد (p=۰/۱۰۵). در ارتباط با پاسخ Mirها نسبت به تمرین مقاومتی دروموند و همکاران (۲۰۰۸) در پژوهشی مردان سالم جوان و پیر را در معرض تمرین مقاومتی و دریافت مکمل اسیدآمینو قرار دادند و آن‌ها را با هم مقایسه کردند، و نشان دادند miR-200a و miR-133 چند ساعت پس از ورزش در هر دو گروه افزایش یافت، درحالی‌که miR-200a تنها در مردان جوان کاهش یافته بود که تاثیر اضافی فاکتورهای مرتبط با سن در بیان miRNA ها را نشان می‌دهد (۱۱). فرایند سازگاری و پاسخ MiR-200a به تمرینات قدرتی عمدتاً به صورت عدم‌تغییر یا کاهش بوده است و چون برنامه تمرینی پژوهش همراه با مصرف اسیدهای آمینو شاخه‌دار بود لذا نمی‌تواند تاثیر صرف تمرینات مقاومتی باشد. فعالیت‌های بدنی بلندمدت موجب القای برنامه تبدیل تار می‌شود و احتمال دارد که برنامه تبدیل تارها با کاهش بیان MiR-200a در ارتباط باشد چراکه در پاسخ به فعالیت مقاومتی حاد یکسان، MiR-200a در افراد مسن با کاهش بیشتری همراه است و لذا احتمال دارد این تفاوت ریشه در تغییر نوع تار داشته باشد که با افزایش سن رخ می‌دهد زیرا میزان تارهای تند انقباض با افزایش سن کاهش می‌یابد. مطالعه سوشی (۲۰۱۱) نیز نشان

ورزشی بر شاخص‌های آپوپتوزی بیشتر و بارزتر می‌شود (۱۸). همچنین، تفاوت در نوع بافت مورد مطالعه و زمان برداشت بافت نیز می‌تواند بر بیان و بروز متغیرهای درگیر مؤثر باشد، به طوری که در مطالعه حاضر، بافت قلبی ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین استخراج شد، ولی هو و همکاران (۲۰۱۷) بلافاصله بعد از آخرین جلسه تمرین بافت قلبی را استخراج کرده بودند. به علاوه، اگرچه در مطالعه حاضر به دلیل برخی محدودیت‌ها امکان ارزیابی شاخص‌های التهابی مانند $TNF-\alpha$ و $IL-6$ نبود، این احتمال نیز دور از انتظار نیست که افزایش $TNF-\alpha$ و $IL-6$ پلازما با فعال کردن مستقیم کاسپاز-۳ از طریق مسیر خارجی میانجی‌گری کرده باشد (۱۹). چراکه افزایش سطوح $TNF-\alpha$ گردش خون، منجر به افزایش لیگاند متصل شونده به گیرنده $TNF-\alpha$ در سارکولما شده و باعث افزایش آپوپتوز از طریق مسیر خارجی می‌شود (۲۰). علاوه بر این در شرایط استرس عواملی مثل گلوکوکورتیکوئیدها و سایتوکین‌ها با ایجاد استرس در میتوکندری، موجب تغییراتی در نفوذپذیری آن می‌شوند و سیتوکروم C که در غشای داخلی میتوکندری قرار دارد، به داخل سیتوزول آزاد و به فاکتور ۱ پروتئاز فعال‌کننده آپوپتوزیس ($Apaf-1$) متصل و ترکیبی به نام $dATP$ تشکیل می‌دهد. سپس این ترکیب، از طریق فعال‌سازی پروکاسپاز ۹، کاسپاز ۹ و کاسپاز ۳ موجب آپوپتوزیس می‌شود (۱۸).

علاوه بر این نتایج تحقیق حاکی از افزایش معنی‌دار $IGF-1$ در دو گروه تمرین و توام بود که گروه توام مزیت داشت. هانگ^۲ و

مانند پروتئین C و $Apaf-1$ همراه شده و موجب کاهش معنی‌دار بیان کاسپاز-۳ شده است (۲۸). در طی آسیب ایسکمی که در وضعیت متعاقب سارکوپنیا روی می‌دهد، تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد و افزایش $HSP60$ گردش خون، افزایش کلسیم درون سلولی، نشت H در سطوح میتوکندری و التهاب، به باز شدن منافذ نفوذپذیر میتوکندری منجر می‌شوند که این امر می‌تواند به کاهش ATP، اکسیداسیون برگشت‌ناپذیر پروتئین، چربی و DNA منجر شود و فرایند آپوپتوز را شروع کند (۳۰). بدین ترتیب بیشتر پژوهشگران، افزایش $HSP60$ را عامل خطر و تشدیدکننده آسیب قلمداد کرده‌اند اما در پژوهشی جدید، هم از فواید درمانی واکنش‌های پروتئین-پروتئینی بین انواع پروتئین‌های شوک گرمایی از جمله $HSP60$ در درمان سکته قلبی و هم از آسیب ناشی از ایسکمی-تزریق مجدد حمایت کرده‌اند، ولی چون در این زمینه قطعیت وجود ندارد و همچنین در پژوهش حاضر عملکرد و فراساختار عضله سولئوس بررسی نشده است، امکان تفسیر شفاف پیامد حاصل از افزایش بیان ژن $HSP60$ عضله موش‌ها به دنبال تمرین مقاومتی امکان‌پذیر نیست. به نظر می‌رسد دلیل اصلی تناقض مطالعه حاضر با برخی دیگر از مطالعات، سن موش‌های صحرایی باشد و در این راستا، استرس اکسایشی، سایتوکین‌های التهابی و اختلال در محافظت از استرس سلول سازوکارهای احتمالی هستند که در افزایش آپوپتوز بافت‌های پیر مشارکت می‌کنند (۸). به عبارتی، افزایش سن و پیری با افزایش قابل توجه آپوپتوز همراه است که در این صورت احتمال تأثیر تمرینات

FoxOs) شتاب می‌دهد و کاهش فسفریلاسیون FoxOs به آن‌ها اجازه می‌دهد تا به هسته منتقل شوند، جایی که آن‌ها بیان برخی از ژن‌های القا کننده آتروفی یعنی (آتروژنز) و از جمله لیگازهای E3 ویژه عضلانی را هدایت می‌کنند (۲۳). سطوح بیان miR-200a در طول میوزنز افزایش می‌یابد در حالی که سطوح بیان آن در طی هیپرتروفی عضله اسکلتی کاهش می‌یابد. اضافه بار عملکردی در موش باعث کاهش سطح بیان miR-200a با افزایش وزن عضلانی می‌شود (۲۴). تمرین مقاومتی به همراه مصرف اسیدهای آمینه، بیان miR-200a را در مردان جوان کاهش می‌دهد. تمرین مقاومتی حاد و اضافه بار باعث افزایش سطح پپتید IGF-1 در موش صحرایی و فعالیت Akt / mTOR در انسان می‌شود بنابراین، کاهش بیان miR-200a می‌تواند به فعال شدن مسیر IGF-1/Akt کمک کند. به علاوه miR-200a مسیر Akt / IGF-1 را در سلول‌های C2C12 با هدف قرار دادن IGF-1، IGF-1R و HSP60 مهار می‌کند (۲۵).

نتیجه‌گیری

این تحقیق به وضوح اهمیت miR-200a و HSP60 را در تکثیر و تمایز سلول‌های عضلانی همراه با بازسازی از آسیب ناشی از سارکوپنی نشان می‌دهد. علاوه بر این، اثر مستقیم miR-200a بر سیگنال IGF-1 اثر مهمی بر رشد و آتروفی عضله ایجاد می‌کند که از تمرینات مقاومتی که هیپرتروفی را القا می‌کنند تا آتروفی حاصل از سرطان و آتروفی فضای پرواز دیده شده است. عوامل تعیین کننده افزایش IGF-1 سرم در

همکاران (۲۰۱۷) در پژوهشی به این نتیجه رسیدند که miR-200a می‌تواند IGF-1R را در سطح پس ترجمه‌ای سرکوب کند و به صورت منفی مسیر سیگنالینگ IGF-1R/PI3K/Akt که در تکثیر، تمایز و هیپرتروفی درگیر است را تنظیم نماید (۳۰). سیلوا^۱ و همکاران (۲۰۱۷) نیز در پژوهشی نشان دادند که miRNAs نقش مهمی در تنظیم ترجمه مسیرهای کلیدی مسئول برای رشد عضله اسکلتی در پاسخ به تمرین مقاومتی با شدت بالا و پایین دارند (۱۲). بسیاری از مسیرهای سیگنالینگ وجود دارد که از طریق آن miRNAها بر میوزنز و متابولیسم عضلانی تاثیر می‌گذارند. به خوبی مشخص شده است که مسیر سیگنالینگ IGF-1 نقش‌های حیاتی مثبت در رشد عضلات ایفا می‌کند و مایوستاتین مسیرهایی را که موجب سرکوب رشد می‌شود را فعال می‌کند و یا موجب آتروفی عضلانی می‌شود (۲۱).

miR-1 ویژه عضله که با کاهش مقادیر miR-200a به شکل پلکانی کاهش می‌یابد، رشد و تمایز سلول را با هدف قرار دادن IGF-1 میانجی‌گری می‌کند. سطوح پروتئین IGF-1 و miR-1 در طی تمایز عضله اسکلتی C2C12 همبستگی معکوس دارند چراکه IGF-1 بیان miR-1 را با غیرفعال کردن فاکتور رونویسی FoxO3a تنظیم منفی می‌کند (۲۲). علاوه بر این، انتقال miR-1 و miR-200a به کاردیومیوسیت‌های موش نوزاد، هیپرتروفی ناشی از IGF-1 را از بین می‌برد. کاهش فعالیت در مسیر IGF-1، تخریب پروتئین عضلانی را از طریق تحریک سیستم پروتئازوم یوبیکیتین و با فعال شدن فاکتورهای رونویسی Foxo را

مقاومتی و مصرف مکمل BCAA می‌تواند بر عوامل رشد عضلانی مرتبط با سن تأثیر بگذارد و لذا می‌تواند سودمندی‌هایی در این خصوص برای سالمندان به همراه داشته باشد.

تشکر

بدین‌وسیله از اساتید و مدیریت دانشگاه علوم پزشکی البرز که در انجام این مطالعه کمال همکاری را داشته‌اند سپاس‌گزاری می‌گردد.

پاسخ به تمرینات ورزشی به‌درستی شناخته نشده‌اند. با این حال، افزایش IGF-1 گردش خون در هر دوی تمرینات مقاومتی با و بدون مکمل BCAA مشاهده شد. تغییر مقدار خارج سلولی IGF-1 از طریق اتوکراین یا پاراکراین باعث افزایش هیپرتروفی عضلانی می‌شود. بنابراین IGF-1 یک میتوژن مهم و فاکتور تمایز برای سلول‌های عضله اسکلتی است. این احتمال وجود دارد که افزایش آن در اثر اجرای تمرین قدرتی بیانگر آثار آن در بافت عضلانی و هیپرتروفی عضلانی و ایجاد یک محیط آنابولیک باشد. بنابراین، مطالعه حاضر نشان داد که تمرین

منابع

- Ahn B., Ranjit R., Piekarz K., Poopal A., Bian J., Sataranatarajan K., et al. (2018). Skeletal muscle specific overexpression of the mitochondrial H2O2 scavenger, peroxiredoxin 3, rescues mitochondrial dysfunction and sarcopenia phenotypes elicited by redox imbalance. *Free Radic. Biol. Med.* 128, S123. 10.1016/j.freeradbiomed.10.302.
- Allen DL, Bandstra ER, Harrison BC, Thorng S, Stodieck LS, Kostenuik PJ, et al. (2009). Effects of spaceflight on murine skeletal muscle gene expression. *Journal of Applied Physiology*; 106(2): 582-95.
- Alway S. E., Mohamed J. S., Myers M. J. (2017). Mitochondria initiate and regulate sarcopenia. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 45 (2), 58–69. 10.1249.
- Angleri, V., Soligon, S. D., da Silva, D. G., Bergamasco, J. G. A., and Libardi, C. A. (2020). Suspension training: a new approach to improve muscle strength, mass, and functional performances in older adults? *Front. Physiol.* 10. doi: 10.3389/fphys.2019.01576.
- Balan E., Schwalm C., Naslain D., Nielens H., Francaux M., Deldicque L. (2019). Regular endurance exercise promotes fission, mitophagy, and oxidative phosphorylation in human skeletal muscle independently of age. *Front. Physiol.* 10, 1088. 10.3389.
- Balan E., Schwalm C., Naslain D., Nielens H., Francaux M., Deldicque L. (2019). Regular endurance exercise promotes fission, mitophagy, and oxidative phosphorylation in human skeletal muscle independently of age. *Front. Physiol.* 10.21.
- Borges I. B. P., de Oliveira D. S., Marie S. K. N., Lenario A. M., Oba-Shinjo S. M., Shinjo S. K. (2021). Exercise training attenuates ubiquitin-proteasome pathway and increases the genes related to autophagy

- on the skeletal muscle of patients with inflammatory myopathies. *J. Clin. Rheumatol.* 27, S224–S231. 10.1097.
8. Borges I. B. P., de Oliveira D. S., Marie S. K. N., Lenario A. M., Oba-Shinjo S. M., Shinjo S. K. (2021). Exercise training attenuates ubiquitin-proteasome pathway and increases the genes related to autophagy on the skeletal muscle of patients with inflammatory myopathies. *J. Clin. Rheumatol.* 27, S224–S231.
 9. Caldo-Silva, A.; Furtado, G.E.; Chupel, M.U.; Letieri, R.V.; Valente, P.A.; Farhang, M.; Barros, M.P.; Bachi, A.L.L.; Marzetti, E.; Teixeira, A.M.; et al. (2021). Effect of a 40-weeks multicomponent exercise program and branched chain amino acids supplementation on functional fitness and mental health in frail older persons. *Exp. Gerontol.* 155, 111592.
 10. Casuso R. A., Huertas J. R. (2020). The emerging role of skeletal muscle mitochondrial dynamics in exercise and ageing. *Ageing Res. Rev.* 58, 101025.
 11. Chen J-F, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, et al. (2016). The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nature genetics*; 38(2), 228-33.
 12. Chen P. B., Yang J. S., Park Y. (2018). Adaptations of skeletal muscle mitochondria to obesity, exercise, and polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 53 (3), 271–278.
 13. Di Liu Y. B., Tao X. H., Pan W. L., Wu Y. X., Wang X. H., He Y. Q., et al. (2021). Mitochondrial quality control in sarcopenia: Updated overview of mechanisms and interventions. *Aging Dis.* 12, 2016–2030. 10.14336.
 14. Englund, D.A.; Zhang, X.; Aversa, Z.; LeBrasseur, N.K. (2021). Skeletal muscle aging, cellular senescence, and senotherapeutics: Current knowledge and future directions. *Mech. Ageing Dev.* 200, 111595.
 15. Estébanez, B.; de Paz, J.A.; Cuevas, M.J.; González-Gallego, J.(2018). Endoplasmic reticulum unfolded protein response, aging and exercise: An update. *Front. Physiol.* 9, 1744.
 16. Cadore, E.L.; Moreira, O.C.; Almar, M.; de Paz, J.A.; Gonzalez-Gallego, J.; Cuevas, M.J. Effects of a resistance-training programme on endoplasmic reticulum unfolded protein response and mitochondrial functions in PBMCs from elderly subjects. *Eur. J. Sport Sci.* 2019, 19, 931–940.
 17. Estébanez, B.; Moreira, O.C.; Almar, M.; de Paz, J.A.; Gonzalez-Gallego, J.; Cuevas, M.J. (2019). Effects of a resistance-training programme on endoplasmic reticulum unfolded protein response and mitochondrial functions in PBMCs from elderly subjects. *Eur. J. Sport Sci.* 19, 931–940.
 18. Farsijani, S.; Payette, H.; Morais, J.A.; Shatenstein, B.; Gaudreau, P.; Chevalier, S. (2017). Even mealtime distribution of protein intake is associated with greater muscle strength, but not with 3-y physical function decline, in free-living older adults: The Quebec longitudinal study on Nutrition as a Determinant of Successful Aging (NuAge study). *Am. J. Clin. Nutr.*, 106, 113–124.
 19. Fragala, M.S.; Cadore, E.L.; Dorgo, S.; Izquierdo, M.; Kraemer, W.J.; Peterson, M.D.; Ryan, E.D. (2019). Resistance Training for Older Adults: Position Statement from the National Strength and Conditioning Association. *J. Strength Cond. Res.*, 33, 2019–2052.

- ۱۱۳
20. Franceschi, C.; Garagnani, P.; Morsiani, C.; Conte, M.; Santoro, A.; Grignolio, A.; Monti, D.; Capri, M.; Salvioli, S.(2018). The Continuum The Continuum of Aging and Age-Related Diseases: Common Mechanisms but Different Rates, *Front Med (Lausanne)*. 2018; 5: 61.
 21. Gasparotto AS, Borges DO, Sassi MG, Milani A, Rech DL, Terres M, et al. (2019). Differential expression of miRNAs related to angiogenesis and adipogenesis in subcutaneous fat of obese and nonobese women. *Mol Biol Rep*; 46(1):965-73.
 22. Krug AL, Macedo AG, Zago AS, Rush JW, Santos CF, Amaral SL.(2016). High-intensity resistance training attenuates dexamethasone-induced muscle atrophy. *Muscle & nerve.*; 53(5): 779-88.
 23. Lee, D.Y.; Shin, S. (2022). Sarcopenia Is Associated with Metabolic Syndrome in Korean Adults Aged over 50 Years: A Cross-Sectional Study. *Int. J. Env. Res. Pub. Health*, 19, 1330.
 24. Liao CD, Wu YT, Tsauo JY, Chen PR, Tu YK, Chen HC, et al.(2020). Effects of protein supplementation combined with exercise training on muscle mass and function in older adults with lower-extremity osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Nutrients J Am Geriatr Soc* 2017; 65: 827– 832.
 25. Moriwaki, M.; Wakabayashi, H.; Sakata, K.; Domen, K. (2019). The Effect of Branched Chain Amino Acids-Enriched Nutritional Supplements on Activities of Daily Living and Muscle Mass in Inpatients with Gait Impairments: A Randomized Controlled Trial. *J. Nutr. Health Aging*, 23, 348–353.
 26. Neinast, M.; Murashige, D.(2019). Arany, Z. Branched Chain Amino Acids. *Annu. Rev. Physiol.* 2019, 81, 139–164.
 27. Oliveira, V.; Borsari, A.L.; Cardenas, J.; Alves, J.C.; Castro, N.F.; Marinello, P.C.; Padilha, C.S.; Webel, A.R.; Erlandson, K.M.; Deminice, R.(2021) Low Agreement Between Initial and Revised European Consensus on Definition and Diagnosis of Sarcopenia Applied to People Living With HIV. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr*, 86, e106–e113.
 28. Soci UPR, Fernandes T, Hashimoto NY, Mota GF, Amadeu MA, Rosa KT, et al. (2017). MicroRNAs 29 are involved in the improvement of ventricular compliance promoted by aerobic exercise training in rats. *Physiological genomics*; 43(11): 665-73.
 29. Ter Borg, S.; Luiking, Y.C.; van Helvoort, A.; Boirie, Y.; Schols, J.; de Groot, C. (2019). Low Levels of Branched Chain Amino Acids, Eicosapentaenoic Acid and Micronutrients Are Associated with Low Muscle Mass, Strength and Function in Community-Dwelling Older Adults. *J. Nutr. Health Aging*, 23, 27–34.
 30. Thomas, R.; Wang, W.; Su, D.M. (2020). Contributions of age-related thymic involution to immunosenescence and inflammaging. *Immun. Ageing*, 17, 2.
 31. Wilkinson, D.J.; Piasecki, M.; Atherton, P.J. (2018). The age-related loss of skeletal muscle mass and function: Measurement and physiology of muscle fibre atrophy and muscle fibre loss in humans. *Ageing Res. Rev.*, 47, 123–132.

32. Yoshimura, Y.; Bise, T.; Shimazu, S.; Tanoue, M.; Tomioka, Y.; Araki, M.; Nishino, T.; Kuzuhara, A.; Takatsuki, F. Effects of a leucine-enriched amino acid supplement on muscle mass, muscle strength, and physical function in post-stroke patients with sarcopenia: A randomized controlled trial. *Nutrition* 2019, 58, 1–6.



Metabolism and Exercise
A biannual journal

Vol 13, Number 2, 2023



The effect of eight weeks of increasing resistance training and BCAA nanoliposome supplementation on MiR-200a, HSP60, soleus muscle mitochondrial gene expression and serum IGF-1 in aged male rats.

Teimoori A^{1*}, Ruzbahani A², Karimi Mehr Z².

Received: 20/04/2023

Accepted: 28/08/2023

Published: 22/11/2023

Abstract:

Aim: The purpose of this study was to investigate the effect of eight weeks of increasing resistance training and BCAA nanoliposome supplementation on MiR-200a, HSP60, soleus muscle mitochondrial gene expression and serum IGF-1 in aged male rats.

Methods: 32 old males were randomly divided into 4 groups: control, supplement (BCAA), combined (resistant training + BCAA) and exercise. Resistance training consisted of eight weeks of ladder training with moderate intensity (70% of MVCC) and five days a week. Rats in the supplement and combined groups received BCAA nanoliposome supplement at the rate of 600 mg per kilogram of body weight by gavage 5 days a week for 8 weeks. MiR200a and HSP60 were obtained using real-time PCR method and serum IGF-1 was obtained using ELISA method. Statistical analysis was performed with two-way, one-way analysis of variance and Tukey's post hoc test.

Finding: significant decrease in MiR-200a and a increase in the expression of the HSP60 gene and serum IGF-1 of rats in the combination and exercise group compared to the supplement and control groups ($p=0.001$). No significant difference was observed between the control and supplement groups ($p=0.105$).

Conclusion: The direct effect of miR-200a and HSP60 on IGF-1 signal has an important effect on muscle growth and atrophy. The increase of IGF-1 as a result of strength training and BCAA supplementation causes hypertrophy and creates an anabolic environment and can affect age-related muscle growth factors and can bring benefits in this regard for the elderly.

Keywords: Resistance training, BCAA, micro-RNA, HSP60

1. Assistant Professor, Department of Exercise Physiology, faculty of physical education and sport Fahangian University, Karaj, Iran. 2. M.A, department of physical education and sport sciences, Markazi branch, Islamic azad university, Tehran, Iran.

*Corresponding Author: drteimooriphd@gmail.com

