Medical Journal
of
Tabriz University of Medical Sciences and Health Services

Original Article

The effect of 12-week aerobic trainings on mitochondrial biogenesis indicators in skeletal muscle among male rats

Rasoul Hashem Kandi Asadi[1], Sajad Arshadi[1]*, Abdoul Ali Banaei Far[1], Masoud Haji Rasouli[2]

[1]Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Science, South Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Science, Eslamshahr Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
*Corresponding author; E-mail: arshadi.sajad@yahoo.com

Received: 20 June 2018 Accepted: 31 July 2018 First Published online: 18 July 2020
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2020 August - September; 42(3):348-355

Abstract

Background: The mitochondrial protein sirtuin (SIRT) 3 may mediate exercise training-induced increases in mitochondrial biogenesis(activation of PGC1-α) and improvements in free radicals (Increase of SOD) handling. The aim of this research was to evaluate the effect of 12 weeks aerobic training on skeletal muscle mitochondrial biogenesis biomarkers in male rats.

Methods: In this experimental study, 17 male rat in a randomly and design were allocated in two equal groups: aerobic training group(AT) and control group(C). Aerobic exercise was performed on a treadmill for 12 weeks and 5 days a week with an intensity of 80-75% of maximum oxygen consumption (24-33 m/min with a 15% slope). Initially, during a five-week period, the duration of exercise was increased from 10 to 60 minutes in every day and was maintained until the end of the period. Gene expression or mRNA of SIRT3, PGC1-α and SOD2 proteins of soleus muscle tissue was evaluated by RT-PCR. Independent Sample T-test were used to determine the changes in two groups. All statistical analyses were performed using SPSS 18($P< 0.05$).

Results: The body and muscle weight in AT were less than control group. However, the ratio of muscle weight to weight in the AT was higher than control group. Also, 12 weeks aerobic training significantly increased the expression of SIRT3, PGC1-α and SOD.

Conclusion: It seems that increasing the expression of SIRT3, PGC1-α and SOD plays an important role in adaptations resulting from aerobic training.

Keyword: Aerobic Training, Mitochondrial Biogenesis, Male Rats

How to cite this article: Hashem Kandi Asadi R, Arshadi S, Banaei Far A A, Haji Rasouli M. [The Effect of 12-week aerobic trainings on mitochondrial biogenesis Indicators in skeletal muscle among male rats]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2020 August-September; 42(3):348-355. Persian.

© 2020 The Author(s). This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

مقاله پژوهشی

اثر ۱۲ هفته تمرین هوازی بر بیان ژن شاخص‌های بیوژنز میتوکندریایی عضله اسکلتی موش‌های صحرایی نر

رسول هاشم کندی اسدی[۱]، سجاد ارشدی[۱*]، عبدالعلی بنایی فر[۱]، مسعود حاجی رسولی[۲]

[۱]گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد تهران جنوب، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[۲]گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد اسلامشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[*]نویسنده مسوول؛ ایمیل: arshadi.sajad@yahoo.com

دریافت: ۱۳۹۷/۳/۳۰ پذیرش: ۱۳۹۷/۵/۹ انتشار برخط: ۱۳۹۹/۴/۲۸
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تبریز. مرداد و شهریور ۱۳۹۹؛ ۴۲(۳): ۳۴۸-۳۵۵

چکیده

زمینه: پروتئین میتوکندریایی سیرتوئین-۳ (SIRT3) ممکن است میانجی بروز سازگاری‌های ناشی از انجام تمرینات استقامتی از جمله بیوژنز میتوکندریایی (فعال‌سازی PGC1-α) و بهبود مقابله با افزایش تولید بنیان‌های آزاد (افزایش SOD) گردد. از اینرو هدف مطالعه حاضر تعیین تاثیر ۱۲ هفته تمرین هوازی بر بیان شاخص‌های بیوژنز میتوکندریایی عضله اسکلتی موش‌های صحرایی بود.

روش کار: در این مطالعه تجربی، ۱۷ موش صحرایی نر دو ماهه بر اساس وزن به طور تصادفی در دو گروه کنترل (C) و تمرین (AT) جایگزین شدند. تمرین هوازی به مدت ۱۲ هفته و ۵ روز در هفته با شدت ۸۰-۷۵ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه (۳۳-۲۴ متر/دقیقه با شیب ۱۵٪) روی نوارگردان اجرا شد. در ابتدا، طی یک دوره پنج هفته‌ای مدت زمان تمرین از ۱۰ به ۶۰ دقیقه در روز افزایش یافت و تا انتهای دوره تمرین حفظ شد. میزان بیان ژن یا mRNA پروتئین‌های SIRT3، PGC1-α و SOD2 بافت عضله نعلی با روش RT-PCR ارزیابی شد. داده‌های حاصله با استفاده از روش آماری T مستقل با نرم‌افزار SPSS18 تجزیه و تحلیل شد (P<۰/۰۵).

یافته‌ها: پس از اتمام پروتکل تمرینی، وزن بدن و عضله گروه تمرین کمتر از گروه کنترل بود. با این حال، نسبت وزن عضله به وزن در گروه تمرین بیشتر از گروه کنترل بود (P=۰/۰٤). همچنین، ۱۲ هفته تمرین هوازی باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن SIRT3 و SOD شد، اما تغییری در PGC1-α مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج مطالعه حاضر به نظر می‌رسد افزایش بیان SIRT3، PGC1-α و SOD احتمالاً نقش مهمی در سازگاری‌های ناشی از انجام تمرینات ورزشی هوازی دارد.

کلید واژه‌ها: تمرین هوازی، بیوژنز میتوکندریایی، موش‌های صحرایی نر

نحوه استناد به این مقاله: هاشم کندی اسدی ر، ارشدی س، بنایی‌فر ع، حاجی رسولی م. اثر ۱۲ هفته تمرین هوازی بر بیان ژن شاخص‌های بیوژنز میتوکندریایی عضله اسکلتی موش‌های صحرایی نر. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تبریز. ۱۳۹۹؛ ۴۲(۳): ۳۴۸-۳۵۵

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.
این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز تحت مجوز کریتیو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

در سال‌های اخیر، افزایش سطح سلامتی و طول عمر انسان از حوزه‌های بسیار جالب توجه و چالش برانگیزی است که توجه بسیاری از متخصصان و فیزیولوژیست‌ها را به خود جلب کرده است. در این بین، با توجه به پیشرفت علم و ابزارهای مختلف آزمایشگاهی، سازوکارهای سلولی و مولکولی موثر در این زمینه و مسیرهای پیام‌رسانی آن جایگاه مهم و بسزایی را به خود اختصاص داده‌اند. در این راستا، سیرتوئین‌ها خانواده‌ای از پروتئین‌ها هستند که در بخش‌های مختلف سلول قرار داشته و فعالیت اصلی آنها، استیل‌زدائی وابسته به نیکوتین آمین دی نوکلئوتید (NAD) می‌باشد. استیلاسیون یک تغییر مهم در پروتئین‌های درگیر در بیولوژی سلول می‌باشد که در طی مطالعات اخیر هزاران پروتئین استیله شده در پستانداران مشخص شده است (۱). استیلاسیون به منظور تغییر در ساختار پروتئین‌ها، قبل از ترجمه و بعد از ترجمه روی می‌دهد (۲). استیلاسیون N-Terminal پروتئین‌ها با چرخه تنظیم و آپوپتوز سلولی در ارتباط می‌باشد (۳, ۴). سیرتوئین‌ها در پستانداران هفت همولوگ (SIRT1-SIRT7) دارند که در این بین سه سیرتوئین SIRT3، SIRT4 و SIRT5 در میتوکندری یافت می‌شوند. SIRT3 میتوکندریایی پروتئینی است که از طریق استیل‌زدائی در بسیاری از جنبه‌های بیولوژی میتوکندری شامل اکسیداسیون مواد غذایی، تولید ATP، غیرفعال کردن و مقابله با گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) موثر است. کمبود SIRT3 احتمالاً با افزایش سرعت ابتلا به بیماری‌های مرتبط با افزایش سن مانند سرطان، سندرم متابولیک، بیماری‌های قلبی–عروقی و بیماری‌های مرتبط با عدم بازسازی دستگاه عصبی مرتبط است (۵). کمبود SIRT3 در میتوکندری موش‌ها باعث اختلال در عملکرد چرخه انتقال الکترون می‌شود و SIRT3 نقش کلیدی در تنظیم اکسایش میتوکندری بازی می‌کند (۲). از میان سیرتوئین‌های میتوکندریایی SIRT3 قوی‌ترین فعالیت استیل‌زدایی را دارد، با این حال اطلاعات کمی در مورد نقش فیزیولوژیک SIRT3 در دست می‌باشد (۶). همچنین، SIRT3 احتمال در تنظیم بیوژنز و عملکرد متابولیکی میتوکندری شامل متابولیسم اسیدهای چرب مشارکت دارد. SIRT3 در تنظیم محتوا و زیر رده‌های میتوکندری شرکت دارد، به عنوان مثال، SIRT3 در بافت چربی قهوه‌ای باعث افزایش PGC-1α می‌شود و بیوژنز میتوکندری را تحریک می‌کند، برعکس در موش‌هایی که SIRT3 در آنها مهار شده است، اکسیداسیون اسیدهای چرب در بسیاری از بافت‌ها و عضله اسکلتی کاهش می‌یابد و احتمالاً به افزایش استیله شدن پروتئین‌های میتوکندریایی و (یا) کاهش محتوای میتوکندری منجر می‌شود. در این مسیر، PGC-1α تنظیم‌کننده اصلی عملکرد میتوکندریایی، اکسیژن مصرفی و فسفریلاسیون اکسایشی و اکسایش بافت چربی قهوه‌ای می‌باشد. PGC-1α باعث ترشح فاکتورهایی از عضله می‌شود که بر عملکرد بافتهای دیگر تاثیر گذارند (۷). از طرفی، برخی از گزارش‌ها حاکی است که مهار SIRT3 در موش‌ها موجب کند شدن پیام‌رسانی انسولین از طریق کاهش فسفوریلاسیون زیر واحد گیرنده انسولین–۱ (IRS-1)، AKT و ERK و در نتیجه افزایش تولید ROS و نیز کاهش آنزیم سوپراکسید دسموتاز (SOD2) در میتوکندری شود (۸). SOD2 یکی از آنزیم‌های اصلی آنتی اکسیدانی است که در خط مقدم مقابله با رادیکال‌های آزاد سوپراکسید تولید شده توسط چرخه انتقال الکترون قرار دارد. همچنین، شواهد مبنی بر ارتباط نزدیکی بین SIRT3، PGC-1α و SOD2 وجود دارد و بر اساس این شواهد افزایش SIRT3 و PGC-1α با افزایش پاسخ‌های آنتی اکسیدانی و بیان پروتئین SOD2 همراه است (۹). بنابراین پژوهشگران همواره به دنبال اتخاذ راهکارهای مناسب برای حمایت از این اندامک حیاتی، آسیب‌های احتمالی مرتبط با آن و افزایش طول عمر هستند. ورزش منظم به طور گسترده برای پیشگیری و مدیریت بیماریهای متابولیکی چون چاقی، پر فشار خونی، عارضه شریان کرونر و دیابت، توصیه شده است. فعالیت بدنی یا انقباض عضلانی نه تنها انرژی درون سلولی را مصرف می‌کند، بلکه همچنین موجب تنظیم افزایشی پروتئینهای درگیر در سوخت و ساز انرژی می‌شود. از اینرو، در سال‌های اخیر تأثیر تمرینات ورزشی مختلف بر این موضوع توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده است (۱۰, ۱۱). برخی از مطالعات اشاره دارند که تمرینات ورزشی می‌تواند موجب تحریک و افزایش بیان پروتئین‌های درگیر در بیوژنز میتوکندریایی شود. در این راستا، Cheng و همکاران گزارش کردند که تمرین دویدن باعث افزایش پروتئین SIRT3 وSOD2 در سلول‌های عصبی می‌شود (۹). البته روش‌های به کارگرفته شده در این تحقیقات متفاوت از روش بکار گرفته شده در تحقیق حاضر می‌باشد در این راستا می‌توان به تحقیق انجام شده توسط Huang و همکاران اشاره کرد که در این تحقیق ۱۲ هفته تمرین شنا باعث تنظیم مثبت مسیر SIRT3/ PGC-1α شد (۱۲). با این وجود برخی تناقضات نیز در این زمینه وجود دارند به طوری که در این راستا Liu و همکاران دریافتند که هشت هفته تمرین شنای طاقت فرسا در موش‌ها به طور معنی‌داری باعث کاهش فعالیت SOD و افزایش مالون دی الدهید (MDA) عضلانی و سرمی و نیز باعث افزایش رادیکال‌های آزاد و آپوپتوز عضله اسکلتی می‌شود (۱۳). Venditti و همکاران اشاره کردند که تمرینات طاقت فرسا در موش‌ها باعث افزایش ROS و آسیب بافتی می‌شود (۱۴). از طرفی در تحقیقی که Pinho و همکاران انجام دادند مشخص شد که انجام تمرین روی تردمیل باعث افزایش نسبت سوپراکسید دسموتاز به آنزیم کاتالاز (SOD/CAT) می‌شود (۴). همچنین، Koo و همکاران گزارش کردند که تمرین روی تردمیل باعث افزایش SIRT3 و PGC-1α

می‌شود (۱۵). این تناقضات ممکن است عمدتاً ناشی از شدت، مدت و نوع تمرینات بدنی باشد و یا ناشی از وضعیت سن، سلامت و آمادگی آزمودنی‌های مورد مطالعه باشد. هر چند تا کنون مطالعه جامعی به ویژه در داخل کشور در این زمینه انجام نشده است و مطالعات معدود در این زمینه اغلب اثر تمرین ورزشی بر بیوژنز میتوکندری (PGC-1α) و پروتئین‌های درگیر (SIRT3 و SOD) در آن به شکل مجزا مورد بررسی قرار داده‌اند. لذا به دلیل عدم شناسایی دقیق اثر تمرینات ورزشی بر تنظیم فرآیندهای سازگاری میتوکندریایی (به ویژه بیوژنز) و نقش و ارتباط SIRT3 و PGC-1α با تعدیل دفاع آنتی اکسیدانی و سازوکار زیربنایی در بروز سازگاری‌های ورزشی و با توجه به نقش احتمالی تمرینات ورزشی در کاهش بیماری‌ها از طریق این مسیر و افزایش احتمالی طول، تحقیق حاضر با هدف بررسی تاثیر ۱۲ هفته فعالیت هوازی روی تردمیل بر بیان ژن های SIRT3، PGC-1α و SOD2 انجام شد.

روش‌کار

در این مطالعه تجربی، با توجه به شرایط مناسب مدل حیوانی برای مطالعه‌ی حاضر، ۱۷ موش صحرایی نر دو ماهه ویستار ۱۴۸۴۸ از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. جهت جلوگیری از استرس و تغییر شرایط فیزیولوژیکی، نمونه‌ها به مدت دو هفته تحت شرایط جدید نگهداری شدند. لازم به ذکر است که دما (۲±۲۲سانتی‌گراد)، رطوبت محیط (۵±۵۰ درصد) و چرخه روشنایی- تاریکی ۱۲:۱۲ ساعته کنترل شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۴ روز تحت برنامه‌ی آشنایی با نحوه فعالیت روی نوارگردان قرار گرفتند. در طی این دوره، شیب نوارگردان صفر درصد، سرعت ۱۵-۱۰ متر بر دقیقه و مدت تمرین ۱۰-۵ دقیقه در روز بود. در پایان این دوره، موش‌ها پس از مطابقت وزنی به طور تصادفی به دو گروه کنترل و تمرین جایگزین شدند. گروه تمرین برای پنج روز در هفته (یکشنبه، دوشنبه، سه‌شنبه، پنج‌شنبه و جمعه) و به مدت ۱۲ هفته در برنامه تمرین هوازی روی نوارگردان الکترونیکی هوشمند حیوانی شرکت کردند. شدت نسبی کار در سرتاسر برنامه تمرین معادل ۸۰-۷۵ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه (۳۳-۲۴ متر/دقیقه با شیب ۱۵ درصد) حفظ شد. مدت زمان تمرین از ۱۰ دقیقه در روز در هفته اول شروع و به ۶۰ دقیقه در روز در هفته‌ی پنجم رسیده و تا انتهای دوره حفظ شد و تلاش شد که موش‌ها در بخش میانی تردمیل بدوند. آزمودنی‌های گروه کنترل و تمرین به صورت آزادانه از غذای استاندارد و آب در طول دوره پژوهش استفاده کردند. تمامی موش‌های صحرایی، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه‌ی تمرین پس از بیهوشی با استفاده از تزریق کتامین به روش بدون درد توسط متخصصین کارآزموده کشته و جراحی شدند. سپس وزن کلی و وزن عضلات بدن پس از جداسازی عضلات به دقت اندازه‌گیری شد. سپس بخشی از بافت عضله نعلی آزمودنی‌ها با دقت برداشته شده و برای بررسی میزان بیان ژنی یا mRNA پروتئین‌های SIRT3، PGC1-α و SOD2 از روش RT-PCR استفاده شد. برای استخراج RNA از نمونه‌ها، طبق روش پیشنهادی کیت (Thermo K0731, USA) و با اندکی تغییرات به شرح زیر عمل شد. حدود ۵۰ میلی‌گرم از بافت عضله اسکلتی در حضور یک میلی لیتر از بافر لیز کننده هموژنه شده و سپس به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس به هر میکروتیوب ۰/۲ میلی‌لیتر کلروفروم افزوده شد و میکروتیوب به شدت با دست به مدت ۱۵ ثانیه تکان داده شده و پنج دقیقه در دمای چهار درجه انکوبه گردید و در ادامه به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط چهار درجه و ۱۳۷۰۰ g سانتریفیوژ شد. سپس به دقت 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 سرد اضافه گردید و برای ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه انکوبه شد. بعد از آن میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در شرایط چهار درجه و ۱۳۷۰۰ g سانترفوژ شده، مایع روئی بیرون ریخته شده و سپس یک میلی لیتر اتانول ۸۰ درصد به میکروتیوب اضافه گردید. بلافاصله میکروتیوب به مدت پنج دقیقه در شرایط چهار درجه و ۱۳۷۰۰ g سانترفوژ شده، مایع رویی بیرون ریخته شد و به دقت اتانول خالی شد و حدود ۲۰ دقیقه اجازه داده شد تا الکل تبخیر گردد. سپس مجدداً به هر میکروتیوب ۰/۰۲ میلی‌لیتر آب تیمار شده با دی اتیل پیروکربنات (DEPC, Diethylpyrocarbonate) افزوده شد. RNA استخراج شده برای استفاده بعدی در دمای ۷۰- درجه نگهداری شد. پس از استخراج RNA باید کیفیت و کمیت RNA استخراج شده تعیین گردد. برای تعیین مقدار RNA از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگاروز استفاده شد. در روش اسپکتروفتومتری از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد، بطوریکه حجم معینی از RNA استخراج شده را با آب مقطر یا بافر TE رقیق کرده و به حجم خاصی رسانده شد. نسبت مذکور فاکتور رقت (Dilution factor) نامیده می‌شود. برای کالیبره نمودن دستگاه، حجم خاصی از آب مقطر یا TE درون کوت کوارتز ریخته و طیف جذبی آن در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر روی صفر تنظیم شد. A۲۶۰، میزان جذب نور متوسط DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر و A۲۸۰، میزان جذب نور متوسط RNA در طول موج ۲۸۰ نانومتر است. پس از کالیبره شدن، حجم خاصی از نمونه RNA رقیق شده داخل کوت ریخته شده، A۲۶۰ و A۲۸۰ و همین‌طور نسبت بین این دو از دستگاه خوانده می‌شد. نمونه‌های RNA استخراج شده به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی گردید. در بیشتر موارد کیفیت نمونه‌ها مطلوب بود به طوری که نسبت A۲۶۰/A۲۸۰، مناسب و بین ۱/۹ تا ۲ بود. در روش الکتروفورز روی ژل آگاروز نیز

نمونه‌های RNA با غلظت‌های متفاوت بر روی ژل آگاروز (۱/۸درصد) الکتروفورز شدند. جهت ساخت cDNA از کیت RevertAID ™ Firs Standard cDNA (Fermentas., Canada) synthesis و طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. برای اندازه‌گیری میزان بیان ژنی پروتئین‌های مورد نظر از دستگاه مربوطه Rotor gene-6000 (Corbett, USA) استفاده شد. جفت پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از نرم افزار Primer 3 طراحی و توسط بایونیر (Bioneer, Germany) سنتز شده و برای کار با غلظت نهایی ۱۰۰ نانو مول مورد استفاده قرار گرفتند. اصول کلی روش Real-time PCR مشابه PCR معمولی است با این تفاوت که در این تکنیک، الگو cDNA بوده و کمّیت آن همگام با پیشرفت واکنش PCR توسط دستگاه آشکارسازی می‌شود. این قابلیت به دلیل وجود ترکیباتی در محیط واکنش PCR است، که رفتار متغیری از نظر نشر نور فلئورسانس در دو حالت متصل و جدا از DNA از خود نشان می‌دهند.

برای سنجش کمی بیان ژن GAPDH (مرجع) با استفاده از SYBR-green Real Time RT-PCR از کیت SYBR-green Real Time RT-PCR, TAKARA استفاده شد و طبق دستورالعمل مربوطه اندازه‌گیری صورت گرفت، و برای سنجش کمی بیان ژن‌های مورد نظر با استفاده از SYBR-green Real Time RT-PCR از کیت SYBR-green Real Time RT-PCR, TAKARA استفاده شد و طبق دستورالعمل مربوطه اندازه‌گیری صورت گرفت. پس از اتمام واکنش تکثیر، برای هر واکنش PCR یک نمودار رسم و سپس بر این اساس C_T تعیین شد. در پایان قبل از آنالیز داده‌ها، منحنی ذوب به دست آمده از هر واکنش Real-time PCR بررسی شد تا اوج مربوط به ژن مورد نظر و فقدان پرایمر دایمر تایید شود. برای آنالیز داده‌ها ابتدا، $C_t\Delta$ ژن در هر نمونه از افتراق Ct ژن مربوطه و Ct ژن بتا-آکتین به عنوان رفرنس محاسبه شد. فرمول‌ها برای محاسبه به ترتیب زیر می‌باشد:

$$\Delta C_T = C_T \text{ target} - C_T \text{ reference}$$
$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ test sample} - \Delta C_T \text{ control sample}$$

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{target})^{\Delta c}T \text{ target}(control - sample)}{(E_{\beta-actin})^{\Delta c}T \text{ target}(control - sample)}$$

در این معادله E_{target} کارایی real-time PCR برای نسخه‌برداری از ژن هدف و T_{target} زمان مورد نیاز طی real-time PCR برای نسخه‌برداری از ژن هدف است. پس از تائید نرمال بودن توزیع داده‌ها، داده‌های حاصله با استفاده از روش آماری T مستقل در سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ به کمک نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها

در جدول شماره ۱ مشخصات پیکرشناختی موش‌های صحرایی (تعداد =۱۷) ارائه شده است. همچنین، در جدول شماره ۲ مقادیر متغیر وابسته در هر دو گروه ذکر شده است.

جدول ۱: برخی ویژگی‌های جسمانی موش‌های صحرایی قبل و متعاقب تمرین هوازی

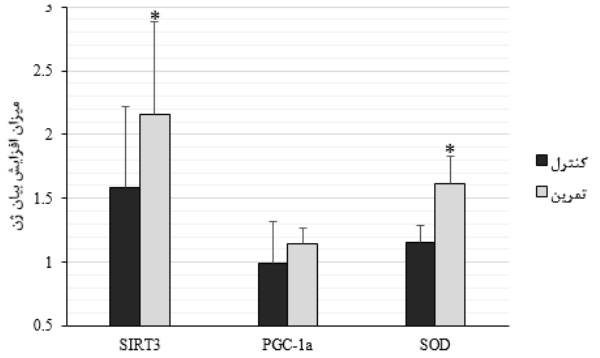
شاخص	گروه	تعداد	میانگین	انحراف استاندارد
وزن بدن (گرم)	Con	۸	۳۸۵/۲۵	۳۹/۶۱
	ET	۹	۳۴۶/۲۲	۲۲/۰۸
وزن عضله (گرم)	Con	۸	۰/۰۷	۰/۰۱۲
	ET	۹	۰/۰۶	۰/۰۲۲
نسبت وزن عضله به وزن بدن (گرم/کیلوگرم)	Con	۸	۰/۱۹	۰/۰۴۳
	ET	۹	۰/۱۹	۰/۰۶۶

وزن بدن گروه تمرینی (ET) حدود ۱۰ درصد کمتر از گروه کنترل بود. با این حال، وزن عضله گروه‌های تمرینی (ET)، به ترتیب حدود ۱۵ درصد کمتر از گروه کنترل بود. از طرفی نسبت وزن عضله به وزن در گروه تمرین بیشتر از گروه کنترل بود. به طوری که نسبت وزن عضله به وزن بدن در گروه تمرین (ET) چهار درصد بیشتر از گروه کنترل بود (P<۰/۰۵).

جدول ۲: میزان بیان ژن‌های مربوط به بیوژنز میتوکندریایی در موش‌های صحرایی متعاقب تمرین هوازی

شاخص	گروه	تعداد	میانگین	انحراف استاندارد
SIRT3	Con	۸	۱/۵۸	۰/۶۴
	ET	۹	۲/۱۶	۰/۷۲
PGC1-α	Con	۸	۰/۹۹	۰/۳۳
	ET	۹	۱/۰۴	۰/۱۳
SOD	Con	۸	۱/۱۵	۰/۱۴
	ET	۹	۱/۶۱	۰/۲۲

بیان ژن SIRT3 در گروه تمرین (ET) به طور معنی‌داری و حدود ۲۷ درصد بیشتر از گروه کنترل بود (P<۰/۰۵). در رابطه با بیان ژن PGC1-α، داده‌های جدول ۴-۲ نشان می‌دهد که بیان این ژن در گروه تمرین حدود ۵ درصد بیشتر از گروه کنترل بود و تغییر معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). در رابطه با بیان ژن SOD داده‌ها حاکی است که افزایش قابل توجهی در میزان بیان ژن SOD در گروه تمرین (ET) مشاهده شد. میزان بیان این ژن در گروه تمرین (ET) نسبت به گروه کنترل (Con) ۲۶ درصد بیشتر بود (P<۰/۰۵).



نمودار شماره ۱: میزان بیان پروتئین SIRT3، PGC-1α و SOD2 موش‌های صحرایی گروه‌های مختلف

* معنی‌داری درون گروهی در سطح ($P<$ ۰/۰۵).

بحث

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که پس از ۱۲ هفته تمرین هوازی، وزن بدن و عضله موش‌های صحرایی گروه تمرین به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود. با این حال، نسبت وزن عضله به وزن کل در گروه تمرین هوازی بیشتر از گروه کنترل بود. همچنین، ۱۲ هفته تمرین هوازی باعث افزایش بیان ژن SIRT3 و SOD نسبت به گروه کنترل شد، اما تفاوت معنی‌داری در PGC1-α بین گروه تمرین و کنترل مشاهده نشد، اگرچه این شاخص حدود ۵ درصد افزایش یافته بود. نتایج مطالعه حاضر مبنی بر افزایش بیان ژن SIRT3، PGC1-α و SOD نسبت به گروه کنترل در موش‌های صحرایی پس از ۱۲ هفته تمرین هوازی در راستای نتایج برخی مطالعات انسانی و حیوانی از جمله Edgett و همکاران، Karvinen و همکاران، Huang و همکاران و Vargas-Ortiz و همکاران قرار دارد و در این مطالعات علاوه بر افزایش همزمان پروتئین و بیان SIRT3 و PGC1-α گزارش شده است همبستگی مثبتی به سطوح این دو عامل مرتبط با بیوژنز میتوکندریایی گزارش شده است (۱۲, ۱۶–۱۸). این ارتباط و همبستگی مثبت ناشی از این واقعیت است که سلول‌هایی که باعث افزایش بیان SIRT3 می‌شوند متعاقباً موجب فعال‌سازی نسخه‌برداری از PGC1-α می‌شوند (۱۹). علاوه بر این، Palacios و همکاران گزارش کردند که افزایش SIRT3 متعاقب تمرینات ورزشی همبستگی مثبتی با افزایش فسفوریلاسیون عنصر پیوندی پاسخ cAMP (CREB, cAMP response-binding element) و دنبال آن القاء بیان PGC1-α می‌شود. همچنین، کاهش SIRT3 به طور قابل توجهی باعث مهار فسفوریلاسیون CREB و پروتئین کیناز فعال شده با AMP (AMPK) و در نتیجه کاهش بیان و نسخه‌برداری از PGC1-α می‌شود. این نکته باید خاطر نشان شود که در شرایط داخل بدن موجود زنده (in vivo) فسفوریلاسیون CREB و AMPK برای فعال‌سازی فرآیندهای مرتبط با افزایش بیان PGC1-α ضروری است (۲۰). بنابراین، نتایج مطالعه حاضر مبنی بر افزایش بیان ژن SIRT3، PGC1-α و SOD در موش‌های صحرایی احتمالاً منعکس کننده بهبود عملکرد میتوکندریایی پس از ۱۲ هفته تمرین هوازی است. از طرفی ارتباط بیوژنز میتوکندریایی (PGC1-α) و ظرفیت اکسایشی (SOD) عضلات و سلامت سلولی از طریق SIRT3 امری اثبات شده است. از پروتئین‌های اصلی هدف SIRT3، PGC1-α می‌باشد و افزایش مقادیر SIRT3 به افزایش فعالیت PGC1-α و در نهایت بیوژنز میتوکندریایی سلول منجر می‌شود. از آنجا که میتوکندری اندام اصلی تولید انرژی در بافت عضلانی است، نتایج مطالعات پیشنهاد می‌کنند که اختلال در عملکرد میتوکندریایی احتمالاً در ایجاد و توسعه سارکوپنی (کاهش شدید توده عضلانی) از طریق کاهش ذخایر انرژی و آپوپتوز با واسطه میتوکندریایی نقش دارد. بنابراین اختلال میتوکندری با مرگ سلولی و در نتیجه کاهش طول عمر ارتباط نزدیکی دارد. همچنین، تمرینات ورزشی از طریق اثر گذاری بر PGC1-α و SIRT3 به ترتیب باعث افزایش فرآیندهای مرتبط با بیوژنز میتوکندریایی و کاهش تولید ROS، افزایش اکسیژن مصرفی بیشینه، بهبود اکسیداسیون لیپید و فسفوریلاسیون اکسایشی می‌شود (۲۱). به علاوه، تمرینات ورزشی با اثرگذاری بر SIRT3 باعث افزایش بیان PGC1-α و زیر واحدهای II و IV سیتوکروم اکسیداز C و بیان ATP ستاز باعث افزایش فسفوریلاسیون اکسایشی می‌شود (۲۲). بنابراین، این احتمال وجود دارد که از طریق افزایش بیان SIRT3 باعث القاء بروز سازگاری‌های میتوکندریایی شوند که باعث افزایش فسفوریلاسیون میتوکندریایی می‌شود(۱۸). این مسئله به این دلیل روی می‌دهد که خانواده پروتئین SIRT از طریق داستیلاسیون PGC1-α در سلول‌های عضله اسکلتی تنظیم کننده اصلی بیوژنز میتوکندریایی است (۲۳). به علاوه، این خانواده از طریق تعدیل و تغییر نسبت $NAD^+/NADH$ سیتوزولی در طی انقباض عضلانی نقش مهمی در بروز سازگاری‌های عضلانی با تمرینات ورزشی استقامتی ایفاء می‌کند. در این راستا، Suwa و همکاران نشان دادند که افزایش بیان این پروتئین‌ها پس از اتمام تمرینات استقامتی باعث تسهیل بروز سازگاری‌های سوخت و سازی می‌شود (۲۴). به علاوه، Palacios و همکاران گزارش کردند که پس از حس شدن بروز استرس انرژی توسط AMPK که حسگر بر هم خوردن تعادل انرژی و رابط بین تغییر در محتوای سوبستراهای انرژی و بروز فرآیندهای نسخه‌برداری و بیان پروتئین است به صورت غیرمستقیم باعث فعال‌سازی SIRT3 و به دنبال آن تعدیل بیان و غلظت پروتئین‌های پایین دستی مانند PGC1-α و SOD می‌شود (۶). با این حال، برخی مطالعات مانند Lanza و همکاران گزارش کردند که تمرینات ورزشی هوازی روزانه باعث افزایش ۵۰ درصدی بیان SIRT3 در افراد جوان در مقایسه با همتایان کم تحرک آنها گردیده است. بیشتر بودن افزایش بیان SIRT3 در این مطالعه نسبت مطالعه حاضر ممکن است ناشی از تعداد جلسات تمرینی (۶ جلسه

تمرین در هفته)، نوع آزمودنی (انسانی در مقایسه با حیوانی) و تغییر دریافت کالری (محدودیت کالری) باشد (۲۵). علاوه بر این، در راستای نتایج مطالعه حاضر مبنی بر کاهش معنی‌دار وزن بدن موش‌های صحرایی پس از ۱۲ هفته تمرین هوازی، Huang و همکاران گزارش کردند که ۱۲ هفته تمرین شنا باعث کاهش معنی‌دار وزن موش‌های صحرایی ۱۸ ماهه شده است، با این حال، تغییر معنی‌داری در وزن موش‌های ۳ ماهه پس از ۱۲ هفته تمرین شنا مشاهده نشد (۱۲). در این مطالعه استدلال شده است که افزایش بیوژنز و غلظت آنزیم‌های میتوکندریایی مرتبط با بتا-اکسیداسیون چربی و افزایش دسترسی به ذخایر چربی موضعی و زیرپوستی باعث کاهش وزن بدن از طریق کاهش چربی بدنی کل شده است، در عین حال به دلیل آنکه کاهش وزن بدن عمدتاً ناشی از کاهش چربی بدنی بوده است، افزایش نسبت توده عضلانی به وزن بدن در این مطالعه مشاهده شده است (۱۲). به طور کلی، به نظر می‌رسد استفاده از تمرینات ورزشی هوازی با شدت متوسط با تغییر بیان پروتئین‌های مرتبط با بیوژنز میتوکندریایی و کاهش وزن ناشی کاهش چربی بدنی دارای آثار مثبتی بر فرآیندهای مرتبط با آپوپتوز سلولی و استیلاسیون پروتئین‌های مرتبط با افزایش طول عمر سلولی به ویژه SIRT3، PGC1-α و SOD است. با این حال، یکی از محدودیت‌های مطالعه حاضر و مطالعات آتی دشواری ارزیابی این سازگاری‌ها در نمونه‌های انسانی و انجام آن در نمونه‌های حیوانی است که تا حدودی استنباط بیرونی تحقیق را کاهش می‌دهد.

نتیجه‌گیری

در مجموع، بر اساس نتایج مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً حداقل برخی از سازگاری‌های سوخت و سازی و به دنبال آن بروز تغییرات عملکردی ناشی از انجام تمرینات هوازی و استقامتی بر اثر افزایش بیان پروتئین‌های SIRT3، PGC1-α و SOD روی می‌دهد و اینگونه تمرینات ورزشی احتمالاً روش مناسبی برای دستیابی به فواید سلامتی و آثار مرتبط با افزایش طول عمر سالم است. با این حال، تا زمان انجام تحقیقات بیشتر و بررسی تاثیر سایر انواع تمرینات ورزشی باید با احتیاط نتیجه گیری شده و از نتیجه گیری قطعی اجتناب شود.

قدردانی

مطالعه حاضر حاصل رساله دانشجوی دکتری از گروه فیزیولوژی ورزشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب به شماره ۱۴۱۲۱۴۰۷۹۵۲۰۰۸ بوده و از متن آن استخراج شده است.

منافع متقابل

مؤلف اظهار می‌دارد که منافع متقابلی از انتشار این مقاله ندارد.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه و طرح تحقیق آن ملاحظات اخلاقی را شامل نمی‌شود.

مشارکت مؤلفان

۱.س ا به عنوان استاد راهنما در انتخاب موضوع، پروتکل، و تدوین مقاله مطالعه و ۲. ر ه ک ا انتخاب موضوع، طراحی پروتکل، اجرا، تحلیل نتایج و تدوین مقاله مطالعه و ۳. ع ب ف و م ح ر در طراحی و اجرای پروتکل تحقیق نقش داشتند.

References

1. Fritz K S, Galligan J J, Hirschey M D, Verdin E, Petersen D R. Mitochondrial acetylome analysis in a mouse model of alcohol-induced liver injury utilizing SIRT3 knockout mice. *J proteome Res* 2012; **11**(3): 1633-1643. doi: 10.1021/pr2008384.
2. Zhao S, Xu W, Jiang W, Yu W, Lin Y, Zhang T, et al. Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science*. 2010; **327**(5968): 1000-1004. doi: 10.1126/science.1179689
3. Caroline H Y, Pan H, Seebacher J, Jang I-H, Hyberts S G, Heffron GJ, et al. Metabolic regulation of protein N-alpha-acetylation by Bcl-xL promotes cell survival. *Cell* 2011; **146**(4): 607-620. doi: 10.1016/j.cell.2011.06.050
4. Pinho R A, Andrades M E, Oliveira M R, Pirola A C, Zago M S, Silveira P C, et al. Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. *Cell Biol Int* 2006; **30**(10): 848-853. doi: 10.1016/j.cellbi.2006.03.011.
5. McDonnell E, Peterson B S, Bomze H M, Hirschey M D. SIRT3 regulates progression and development of diseases of aging. *Trends Endocrinol Metab* 2015; **26**(9): 486-492. doi: 10.1016/j.tem.2015.06.001.
6. Palacios OM, Carmona J J, Michan S, Chen K Y, Manabe Y, Ward Iii JL, et al. Diet and exercise signals regulate SIRT3 and activate AMPK and PGC-1α in skeletal muscle. *Aging (Albany NY)* 2009; **1**(9): 771. doi: 10.18632/aging.100075.
7. Singh S P, Schragenheim J, Cao J, Falck J R, Abraham N G, Bellner L. PGC-1 alpha regulates HO-1 expression, mitochondrial dynamics and biogenesis: Role of epoxyeicosatrienoic acid. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2016; **125**: 8-18. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2016.07.004.

8. Green M F, Hirschey M D. SIRT3 weighs heavily in the metabolic balance: a new role for SIRT3 in metabolic syndrome. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2012; **68**(2): 105-107. doi: 10.1093/gerona/gls132.
9. Cheng A, Yang Y, Zhou Y, Maharana C, Lu D, Peng W, et al. Mitochondrial SIRT3 mediates adaptive responses of neurons to exercise and metabolic and excitatory challenges. *Cell metab* 2016; **23**(1): 128-142. doi: 10.1016 /j.cmet.2015.10.013
10. Islam H, Edgett B A, Gurd B J. Coordination of mitochondrial biogenesis by PGC-1α in human skeletal muscle: A re-evaluation. *Metab. Clin Exp* 2018; **79**: 42-51. doi: 10.1016/j.metabol.2017.11.001
11. Villena J A. New insights into PGC-1 coactivators: redefining their role in the regulation of mitochondrial function and beyond. *FEBS j* 2015; **282**(4): 647-672. doi: 10.1111/febs.13175
12. Huang C-C, Wang T, Tung Y-T, Lin W-T. Effect of exercise training on skeletal muscle SIRT1 and PGC-1α expression levels in rats of different age. *Int j med sci* 2016; **13**(4): 260. doi: 10.7150/ijms.14586
13. Liu W, He W, Li H. Exhaustive training increases uncoupling protein 2 expression and decreases Bcl-2/Bax ratio in rat skeletal muscle. *Oxid med cell longev* 2013; **2013**. doi: 10.1155/2013/780719
14. Venditti P, Meo S D. Effect of Training on Antioxidant Capacity, Tissue Damage. *Int J Sports Med* 1997; **18**: 497-502. doi: 10.1055/s-2007-972671.
15. Koo J-H, Kang E-B, Oh Y-S, Yang D-S, Cho J-Y. Treadmill exercise decreases amyloid-β burden possibly via activation of SIRT-1 signaling in a mouse model of Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 2017; **288**: 142-152. doi: 10.1016/j.expneurol.2016.11.014.
16. Edgett B A, Bonafiglia J T, Baechler B L, Quadrilatero J, Gurd B J. The effect of acute and chronic sprint-interval training on LRP130, SIRT3, and PGC-1α expression in human skeletal muscle. *Physiol Rep* 2016; **4**(17). doi: 10.14814/phy2.12879
17. Karvinen S, Silvennoinen M, Vainio P, Sistonen L, Koch L G, Britton S L, et al. Effects of intrinsic aerobic capacity, aging and voluntary running on skeletal muscle sirtuins and heat shock proteins. *Exp Gerontol* 2016; **79**: 46-54. doi: 10.1016/J.Exger.2016.03.015.
18. Vargas-Ortiz K, Perez-Vazquez V, Diaz-Cisneros F J, Figueroa A, Jiménez-Flores L M, Rodriguez-DelaRosa G, et al. Aerobic training increases expression levels of SIRT3 and PGC-1α in skeletal muscle of overweight adolescents without change in caloric intake. *Ped Exer Sci* 2015; **27**(2): 177-184. doi: 10.1123/pes.2014-0112
19. Shi T, Wang F, Stieren E, Tong Q. SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes. *J Biol Chem* 2005; **280**(14): 13560-13567.
20. López-Lluch G, Irusta P M, Navas P, de Cabo R. Mitochondrial biogenesis and healthy aging. *Exp gerontol* 2008; **43**(9): 813-819. doi: 10.1016/j.exger.2008.06.014
21. Ahn B-H, Kim H-S, Song S, Lee IH, Liu J, Vassilopoulos A, et al. A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci* 2008; **105**(38):14447-14452. doi: 10.1073/pnas.0803790105.
22. Kong X, Wang R, Xue Y, Liu X, Zhang H, Chen Y, et al. Sirtuin 3, a new target of PGC-1α, plays an important role in the suppression of ROS and mitochondrial biogenesis. *PloS one* 2010; **5**(7): e11707. doi: 10.1371/journal.pone. 0011707
23. Gerhart-Hines Z, Rodgers JT, Bare O, Lerin C, Kim SH, Mostoslavsky R, et al. Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1α. *EMBO J* 2007; **26**(7): 1913-1923. doI 10.1038/sj.emboj.7601633
24. Suwa M, Nakano H, Radak Z, Kumagai S. Endurance exercise increases the SIRT1 and peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1α protein expressions in rat skeletal muscle. *Metab Clin Expl* 2008; **57**(7): 986-988. doi: 10.1016/j.metabol.2008.02.017
25. Lanza I R, Short D K, Short K R, Raghavakaimal S, Basu R, Joyner M J, et al. Endurance exercise as a countermeasure for aging. *Diabetes* 2008; **57**(11): 2933-2942. doi: 10.2337/db08-0349.