

## تأثیر سه ماه تمرین هوازی بر مسیر پیام رسانی Wnt عضله اسکلتی موش‌های صحرائی نر

جعفر حبیبی: کارشناسی ارشد فیزیولوژی ورزشی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران. mahdibas@gmail.com

\*جبار بشیری: دانشیار و متخصص فیزیولوژی ورزشی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران (\*نویسنده مسئول). bashiri.jabbar@gmail.com

علیرضا نورآذر: استادیار و متخصص فیزیولوژی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران. noura347@yahoo.com

حسن پوررضی: دکتری فیزیولوژی ورزشی، تبریز، ایران. purrazi.h@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۹۶/۶/۲۸

تاریخ دریافت: ۹۶/۳/۲۳

### چکیده

**زمینه و هدف:** آتروفی عضله اسکلتی نقش مهمی در بیماری‌های مرتبط با تخریب عملکرد بافتی مانند سارکوپنیا بازی می‌کند. در این راستا، نشان داده شده است که مسیر Wnt نقش مهمی در تکامل عضله اسکلتی دارد. برخی شواهد حاکی است که تمرینات ورزشی ممکن است تعدادی از مسیرهای مربوط به هایپرتروفی عضله اسکلتی را تحت تأثیر قرار دهد. بنابراین، مطالعه حاضر با هدف تعیین اثر سه ماه تمرین هوازی بر مسیر پیام‌رسانی Wnt عضله اسکلتی موش‌های صحرائی نر انجام گردید.

**روش کار:** این مطالعه در قالب طرح تجربی دوگروهی انجام شد. ۱۶ سر موش صحرائی نر سه ماهه به شکل تصادفی در دو گروه تمرین (۸سر) و کنترل (۸سر) جایگزین شدند. آزمودنی‌های گروه تمرین سه ماه در برنامه تمرین هوازی ( $VO_{2max}$  ۸۰-۷۵٪) شرکت کردند. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، عضله نعلی آزمودنی‌ها استخراج و بیان ژن‌های بتا-کاتنین و گلیکوژن سنتاز کیناز ۳-بتا با استفاده از روش RT-PCR بررسی شد. داده‌های حاصله توسط آزمون مستقل، در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ با استفاده از نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** بیان ژن بتا-کاتنین عضله نعلی در گروه تمرین ( $1/11 \pm 0/17$ ) به‌طور غیر معنی‌داری کمتر از گروه کنترل ( $1/60 \pm 0/99$ ) بود ( $p=0/154$ ). با این حال، بیان ژن گلیکوژن سنتاز کیناز ۳-بتا عضله نعلی گروه تمرین ( $1/0/36 \pm 3/51$ ) به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل ( $1/99 \pm 1/2$ ) بود ( $p=0/001$ ).

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد، سه ماه تمرین هوازی در افزایش بیان ژن کلیدی گلیکوژن سنتاز کیناز ۳-بتا عضله اسکلتی تأثیر قابل توجهی دارد و این موضوع ممکن است با افزایش خطر آتروفی عضلانی همراه باشد. با این حال، اظهار نظر قطعی در مورد نحوه تأثیرپذیری شاخص‌های مربوط به مسیر Wnt در عضله اسکلتی از تمرینات ورزشی مختلف، منوط به انجام تحقیقات و مطالعات بیشتر در این زمینه می‌باشد.

**کلیدواژه‌ها:** تمرین هوازی، عضله اسکلتی، مسیر پیام رسانی Wnt

### مقدمه

بنابراین در سال‌های اخیر توجه بسیاری به مکانیسم‌های مولکولی محرک هایپرتروفی عضلانی مانند مسیر IGF-1/Akt/mTOR، میوآستاتین، میوژنیک‌ها و آتروژن شده است (۱ و ۲).

در این راستا، برخی از شواهد و مدارک اخیر اشاره دارند که مسیر پیام‌رسانی Wnt و پروتئین‌های دخیل در آن، یکی از مهم‌ترین مسیرهای پیام‌رسانی درگیر در هایپرتروفی عضلات اسکلتی هستند که موجب سازگاری سلول‌های عضلانی در پاسخ به تحریکات مکانیکی می‌شوند (۱، ۲، ۴). مسیر Wnt جزو مسیرهای پیام‌رسانی سلولی برای کنترل فعالیت ژنتیکی سلول محسوب

عضله اسکلتی از مهم‌ترین بافت‌های بدن انسان است که نقش مهمی در حرکت، اعمال متابولیکی و اجرای فعالیت‌های ورزشی بازی می‌کند. در این راستا، اغلب ورزشکاران و حتی افراد مختلف با توجه به ماهیت فعالیت و عملکرد خود به دنبال افزایش حجم، توده و قدرت عضلانی هستند (۱) و (۲). از طرفی هرگونه آتروفی، کاهش توده و قدرت عضلانی ارتباط تنگاتنگی با افت عملکرد و همچنین افزایش خطر ناتوانی جسمانی و بیماری‌های عضلانی از جمله سارکوپنیا، دیستروفی‌های عضلانی و تخریب عضله دارد (۳)؛

شده‌اند به طوری که لیال و همکاران گزارش دادند که هشت هفته تمرینات توانی موجب افزایش فعالیت مسیر Wnt و بیان پروتئین بتا-کاتنین در عضله اسکلتی آزمودنی‌های انسانی شد (۲). همچنین در یک مطالعه اخیر، اسپیلان و همکاران، تأثیر یک جلسه تمرین مقاومتی بالاتنه و تمرین بالاتنه-پائین تنه را بر محتوی پروتئین بتا-کاتنین عضله پهن جانبی آزمودنی‌های انسانی بررسی کردند. نتایج نشان داد که میزان پروتئین بتا-کاتنین در سه و ۲۴ ساعت پس از تمرین مقاومتی بالاتنه-پائین تنه به طور معنی‌داری بیشتر از تمرین مقاومتی بالاتنه بود (۱). با این حال، مطالعات بسیار اندکی در مورد تأثیر تمرینات هوازی و استقامتی بر مسیر پیام‌رسانی Wnt و پروتئین‌های آن مانند بتا-کاتنین و گلیکوژن سنتاز کیناز ۳ وجود دارد که اغلب نتایج متناقضی را گزارش کرده‌اند. در این راستا، فوجی ماکی و همکاران اشاره داشتند که چهار هفته دویدن اختیاری و با شدت آرام روی چرخ‌گردان موجب بیش‌تنظیمی مسیر Wnt و افزایش بتا-کاتنین در گروه تمرین شد؛ به طوری که این موضوع سبب فعال شدن سلول‌های ماهواره‌ای و افزایش نسخه‌برداری ژن‌های میوژنیک در گروه تمرین شد (۳). با این حال، آمین و همکاران اشاره داشتند که تغییری در میزان بیان پروتئین بتا-کاتنین متعاقب فعالیت ورزشی در موش‌های صحرایی مشاهده نشد (۱۰). لذا، این موضوع متصور است که تمرینات استقامتی بر خلاف تمرینات قدرتی مانع تحریک هایپرتروفی عضلانی می‌شوند.

بر این اساس، شناخت بیشتر اثرات تمرینات ورزشی مختلف به ویژه تمرینات هوازی و استقامتی بر تغییرات بافت عضلانی و فرآیند هایپرتروفی با توجه به مکانیسم‌های مولکولی بسیار حائز اهمیت است. با این وجود، مطالعات بسیار اندکی به‌ویژه در کشورمان در زمینه‌ی تأثیر تمرینات هوازی بر مسیر پیام‌رسانی Wnt عضله‌ی اسکلتی و تغییرات احتمالی پروتئین‌های بتا-کاتنین و گلیکوژن سنتاز کیناز ۳-بتا انجام شده است؛ لذا، انتظار می‌رود با انجام تحقیق حاضر بتوان ضمن پاسخ به برخی ابهامات موجود و تعیین تأثیر تمرینات

می‌شود که از طریق اتصال لیگاند به گیرنده آن فعال شده و موجب فعال شدن عامل‌های رونویسی ویژه خود در سیتوزول می‌گردد. طبق مدل فعلی مسیر Wnt، بازیگر اصلی مسیر تبدیل پیام درون سلولی Wnt در مهره داران، بتا-کاتنین نام دارد. این پروتئین چند عملکردی هم به عنوان عامل رونویسی و هم به عنوان پروتئین رابط بین غشاء و اسکلت سلولی عمل می‌نماید. در غیاب پیام Wnt، بتا-کاتنین توسط مجموعه‌ای متشکل از مولکول‌های زیر فسفریله می‌شود: گلیکوژن سنتاز کیناز-۳ (Glycogen synthase kinase3-beta) (GSK3) یعنی همان پروتئین کینازی که گلوکز خون را تنظیم می‌نماید؛ پروتئین پولیپ آدنومایی کولون (Tumor suppressor adenomatous polyposis coli -APC) که یک سرکوب‌گر مهم تومور در انسان است؛ و آکسین که یک پروتئین داربستی می‌باشد. سپس بتا-کاتنین فسفریله، یوبی کوئیتینه شده و در پروتئازوم‌ها تجزیه می‌گردد (۸-۴). با این حال و در حضور Wnt، آکسین به ناحیه سیتوزولی کمک-گیرنده متصل می‌شود. این اتصال، مجموعه حاوی GSK3 و بتا-کاتنین را متلاشی کرده، مانع از فسفریلاسیون بتا-کاتنین توسط GSK3 و موجب پایدار شدن بتا-کاتنین در سیتوزول می‌شود. در این بین، بتا-کاتنین رها شده به هسته منتقل می‌شود تا به کمک عامل‌های رونویسی مختلف، بیان ژن‌های هدف خاص را کنترل نماید (۸-۴). لذا، تنظیم افزایشی مسیر Wnt در عضلات اسکلتی می‌تواند با افزایش بیان پروتئین بتا-کاتنین و به تبع آن با کاهش بیان و فعالیت پروتئین گلیکوژن سنتاز کیناز-۳ همراه شود که نتیجه آن افزایش فعالیت فاکتورهای رونویسی میوژنیک و هایپرتروفی عضلانی است.

در این راستا، برخی از شواهد و مدارک حاکی از آن است که فعالیت‌های جسمانی و فشارهای مکانیکی وارده به عضله اسکلتی احتمالاً با افزایش فعالیت مسیر Wnt همراه باشد (۱، ۲، ۷، ۹). اغلب این مطالعات روی تأثیر تمرینات مقاومتی و قدرتی بر مسیر پیام‌رسانی Wnt و فعال شدن ژن‌های درگیر در هایپرتروفی عضله اسکلتی متمرکز

جدول ۱- برنامه ۱۲ هفته تمرین هوازی روی نوارگردان

هفته‌های تمرین											
اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم	هفتم	هشتم	نهم	دهم	یازدهم	دوازدهم
۱۰	۲۰	۳۵	۴۵	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰
۲۴	۲۴	۲۵	۲۵	۲۶	۲۷	۲۸	۲۹	۳۰	۳۱	۳۲	۳۳
۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵

مدت تمرین (دقیقه در روز)

سرعت نوارگردان (متر بر دقیقه)

شیب نوارگردان (درصد)

اکسیژن مصرفی بیشینه (۲۴-۳۳ متر/دقیقه با شیب ۱۵٪) حفظ شد. مدت زمان تمرین از ۱۰ دقیقه در روز در هفته‌ی اول شروع و به ۶۰ دقیقه در روز در هفته‌ی پنجم رسیده و تا انتهای دوره حفظ شد (جدول ۱) (۱۱).

۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه‌ی تمرین، موش‌ها تحت جراحی قرار گرفتند. بدین صورت که ابتدا توسط استنشاق اتر بی‌هوش شدند. سپس توسط متخصصین کارآموده جراحی انجام و عضله نعلی آنها استخراج و وزن‌کشی شد. سپس، نمونه در کرایوتیوب در نیتروژن مایع قرار داده شد و برای بررسی‌های بعدی در دمای ۷۰- درجه نگهداری شد.

برای استخراج RNA از نمونه‌ها، طبق روش پیشنهادی کیت (Thermo, K0731, USA) حدود ۵۰ میلی‌گرم از بافت عضله‌ی نعلی با استفاده از یک میلی‌لیتر RNXTM-PLUS (سیناژن، ایران) هم‌وزن شده و در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه انکوبه گردید. پس از اضافه کردن ۰/۲ میلی‌لیتر کلروفورم به هر میکروتیوب و تکان دادن آن با دست به مدت ۱۵ ثانیه، میکروتیوب ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه انکوبه گردید و در ادامه به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط ۴ درجه و ۱۳۷۰۰g سانتریفیوژ شد. سپس به دقت و بدون تکان دادن تیوب، قسمت بالایی که حاوی RNA بود، جدا شده و به میکروتیوب دیگری انتقال داده شد. به محلول جدا شده حجم مساوی از ایزوپروپانول سرد اضافه گردید و برای ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه انکوبه شد. سپس، میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه و ۱۳۷۰۰g سانتریفیوژ شده، مایع روئی بیرون ریخته شد و یک میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد به میکروتیوب اضافه گردید. بلافاصله میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه در شرایط ۴ درجه و ۱۳۷۰۰g سانتریفیوژ شده، مایع رویی آن بیرون

هوازی بر مسیر پیام‌رسانی Wnt عضله اسکلتی، پیشنهادات کاربردی متناسبی در راستای انواع و نحوه‌ی انجام تمرینات هوازی و نیز پیش‌بینی پیامدهای احتمالی مانند تغییرات ژن‌های محرک هایپرتروفی یا آتروفی عضلانی ارائه داد.

## روش کار

برای مطالعه‌ی حاضر، ۱۶ موش صحرایی نر دو ماهه‌ی ویستار ۱۴۸۴۸ 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±۲۲ سانتی‌گراد)، رطوبت محیط (۵±۵ درصد) و چرخه‌ی روشنایی- تاریکی ۱۲:۱۲ ساعته کنترل شد. آزمودنی‌ها به صورت آزادانه از غذای استاندارد و آب در طول دوره‌ی پژوهش استفاده کردند. لازم به ذکر است که نگهداری حیوانات آزمایشگاهی مطابق با راهنمای انستیتوی ملی سلامت انجام شد. همچنین تمامی اعمال انجام شده روی حیوانات، مطابق دستورالعمل کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی مستخرج از دستورالعمل هلسینکی بود.

در ابتدا نمونه‌ها به مدت ۱۴ روز تحت برنامه‌ی آشنایی با نحوه‌ی فعالیت روی نوارگردان قرار گرفتند. در طی این دوره، شیب نوارگردان صفر درصد، سرعت ۱۰-۱۵ متر بر دقیقه و مدت تمرین ۱۰-۵ دقیقه در روز بود. در پایان این دوره، موش‌ها پس از مطابقت وزنی به طور تصادفی در دو گروه کنترل و تمرین جایگزین شدند. گروه تمرین برای ۵ روز در هفته (یکشنبه، دوشنبه، سه‌شنبه، پنجشنبه و جمعه) و به مدت ۱۲ هفته در برنامه تمرین هوازی روی نوارگردان الکترونیکی هوشمند حیوانی شرکت کرد. شدت نسبی کار در سرتاسر برنامه‌ی تمرین معادل ۸۰-۷۵ درصد

یک میکرولیتر آنزیم M-Minus RT-Aid™ در ادامه در صورت استفاده از پرایمر oligo (dt)، ۶ دقیقه در ۴۲ درجه و در صورت استفاده از پرایمر Random hexamer، ابتدا ۵ دقیقه در ۲۵ درجه و به دنبال آن ۹۰ دقیقه در ۴۲ درجه انکوباسیون صورت گرفت. واکنش با قرار دادن تیوب به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه پایان پذیرفت و نمونه در فریزر ۷۰- درجه نگهداری شد.

**Real-time PCR:** اندازه‌گیری میزان بیان ژنی پروتئین‌های بتاکاتنین و گلیکوژن سنتاز کیناز ۳- بتا با استفاده از دستگاه Corbett-Rotor gene-6000 (Corbett Research Australia) انجام گردید. جفت پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از نرم افزار Primer 3 طراحی و توسط بایونیر (Bioneer-Germany) سنتز شد و با غلظت نهایی ۸۰ nm مورد استفاده قرار گرفت.

**پرایمرها:** واکنش‌ها بر مبنای استفاده از رنگ Syber green انجام شد. رنگ Syber green واکنش Real-time PCR به DNA دو رشته‌ای متصل شده و نور فلورسنت ساطع می‌کند. در جدول ۲ توالی پرایمرهای بیان ژنی برای موش‌های صحرایی مشخص شده است. به عنوان بلانک از تیوبی که حاوی همه مواد موجود در واکنش به جز cDNA بود، استفاده شد و به جای cDNA، به تیوب مربوطه DEPC water اضافه گردید. پس از اتمام واکنش تکثیر، برای هر واکنش PCR یک نمودار رسم و سپس بر این اساس CT تعیین شد. در پایان قبل از آنالیز داده‌ها، منحنی ذوب (Melting curve) به دست آمده از هر واکنش Real-time PCR بررسی شد تا پیک مربوط به ژن مورد نظر و فقدان پرایمر دایمر تایید شود.

ریخته شد و به دقت اتانول خالی شد و حدود ۲۰ دقیقه اجازه داده شد تا الکل تبخیر گردد. سپس در آب تیمار شده با دی اتیل پیروکربنات (DEPC) حل شد. پس از استخراج RNA، مقدار و خلوص آن توسط روش اسپکتروفتومتری (Bio-Rad, CA, USA) تعیین گردید. همچنین، RNA تام به وسیله الکتروفورز روی ژل آگاروز حاوی اتیدیوم بروماید قرار گرفت و دو باند مشخص ۱۸s و ۲۸s مربوط به RNA ریبوزومی مشاهده و کنترل شد. RNA استخراج شده جهت استفاده در مراحل بعدی در دمای ۸۰- درجه نگهداری شد.

جهت ساخت cDNA، طبق دستورالعمل کیت Revert AID™ First Standard cDNA synthesis (Fermentas, Canada) یک میکرولیتر RNA و یک میکرولیتر از DNase I reaction buffer 10X در یک تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شده و توسط DEPC-treated water به حجم ۹ میکرولیتر رسید. برای از بین بردن آلودگی احتمالی با DNA، یک میکرولیتر DNase به تیوب اضافه و پس از افزودن یک میلی‌لیتر از اتانول مطلق، تیوب مربوطه به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر ۷۰- درجه قرار گرفت. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط ۴ درجه و ۱۴۰۰۰g سانترفیوژ شد و پس از آن، در زیر هود به دقت اتانول آن خالی شده و حدود ۱۰ دقیقه اجازه داده شد تا الکل تبخیر گردد. به تیوب یک میکرولیتر DEPC-treated water و یک میکرولیتر پرایمر oligo (dt) یا پرایمر Random hexamer افزوده شد و ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه بر روی Dry block انکوبه گردید. چهار میکرولیتر 5X reaction buffer و دو میکرولیتر 10mM mix dNTP و یک میکرولیتر Ribo lock Ribo nuclease Transcription Inhibitor به تیوب افزوده شد و پس از سانترفیوژ مختصر، به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه گردید.

جدول ۲- توالی پرایمرهای بیان ژنی عضله نعلی موش‌های صحرایی

Genes	Primer sequence	Product	Length (bp)
-catenin	F: 5' GTCAGTGCAGGAGCCGAG 3' R: 5' GCAGCTTTTCTGTCCGGCTC 3'		148
GSK3-	F: 5' CCTTTGCGGAGAGCTGCAAG 3' R: 5' ACTGACTTCCTGTGGCCTGT 3'		140
GAPDH	F: 5' GGAAAGCCTGCCGGTGACTA 3' R: 5' CACCCGGAGGAGAAATCGGG 3'		110

تی، تفاوت معنی‌داری بین توده‌ی بدنی آزمودنی‌های گروه کنترل ( $251/75 \pm 22/6$ ) و گروه تمرین ( $202/33 \pm 18/3$ ) مشاهده شد ( $p=0/031$ )، به طوری که توده‌ی بدن گروه تمرین  $19\%$  کمتر از گروه کنترل بود. با این حال، تفاوت معنی‌داری در وزن عضله نعلی و نسبت وزن عضله نعلی به توده‌ی بدن گروه کنترل (به ترتیب  $0/072 \pm 0/01$ ؛  $0/064 \pm 0/02$ ) و تمرین (به ترتیب  $0/29 \pm 0/05$ ؛  $0/32 \pm 0/03$ ) مشاهده نگردید (به ترتیب  $P=0/731$  و  $p=0/346$ ). این در حالی بود که میانگین وزن عضله نعلی گروه تمرین حدود  $11\%$  کمتر از گروه کنترل بود.

در رابطه با شاخص‌های مربوط به مسیر پیام‌رسانی Wnt عضله نعلی، نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل و تمرین هوازی در بیان ژن بتاکاتنین وجود ندارد ( $p=0/154$ ). با این حال، میزان بیان ژن بتاکاتنین در گروه تمرین هوازی ( $1/11 \pm 0/17$ ) حدود  $30\%$  کمتر از گروه کنترل ( $1/60 \pm 0/99$ ) بود. همچنین، نتایج حاکی

برای آنالیز داده‌ها ابتدا،  $C_t$  ژن در هر نمونه از افتراق  $C_t$  ژن مربوطه و  $C_t$  ژن GAPDH به عنوان رفرنس محاسبه شد. فرمول‌ها برای محاسبه به ترتیب زیر می‌باشد:

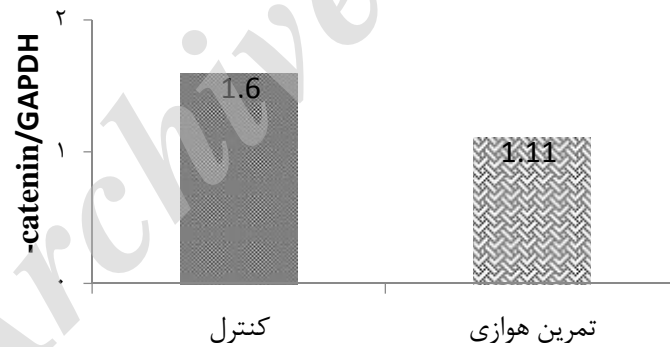
$$C_T = C_T \text{ target} - C_T \text{ reference}$$

$$C_T = C_T \text{ test sample} - C_T \text{ control sample}$$

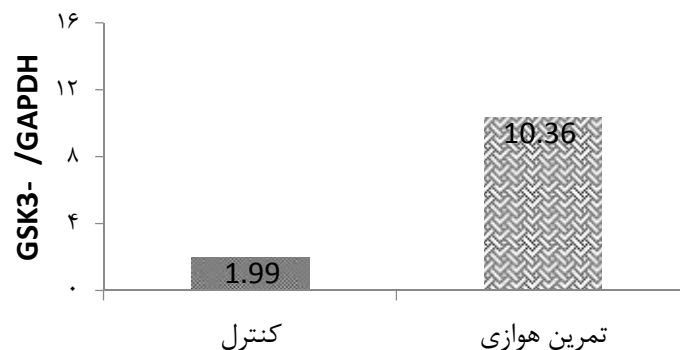
توزیع طبیعی داده‌ها و برابری واریانس‌ها با استفاده از آزمون شاپیروویلیک و لون مشخص شد. سپس برای تعیین اختلاف میزان شاخص‌های مورد نظر بین دو گروه کنترل و تمرین هوازی از آزمون تی مستقل استفاده گردید. تمامی محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ در سطح معنی‌داری  $p < 0/05$  انجام شد.

#### یافته‌ها

در رابطه با تأثیر سه ماه تمرین هوازی روی نوارگردان بر ویژگی‌های بدنی، با استفاده از آزمون



شکل ۱- میزان بیان ژن بتاکاتنین در دو گروه کنترل و تمرین هوازی



شکل ۲- میزان بیان ژن گلیکوژن سنتازکیناز-۳ بتا در دو گروه کنترل و تمرین هوازی

۳- بتا عضله نعلی موش‌های صحرایی شده است. چندین پژوهش اشاره داشتند که گلیکوژن سنتاز کیناز ۳-بتا به عنوان یک تنظیم کننده منفی (Negative regulator) هایپرتروفی در سلول‌های عضلانی  $C_2C_{12}$  عمل می‌کند (۱۳ و ۱۴)؛ در حالی که کاهش بیان گلیکوژن سنتاز کیناز ۳-بتا و فسفریله شدن آن با تجمع هسته‌ای بتاکاتنین همراه است. تجمع هسته‌ای بتاکاتنین منتج به افزایش شکل‌گیری کمپلکس‌هایی با خانواده فاکتورهای نسخه‌برداری (Lymphoid) LEF (enhancer factors) و TCF (T cell factor) می‌شود (۱۵). این فرآیند با فعال‌سازی نسخه‌برداری ژن‌های هدف برای تحریک سنتز، ترمیم و باززایی سلول‌های عضلانی همراه است (۳ و ۱۵). با این حال، پروتئین گلیکوژن سنتاز کیناز ۳-بتا علاوه بر کاهش تجمع هسته‌ای بتاکاتنین، نقش پیچیده‌ای از طریق پروتئین‌های مختلف پیام‌رسان در سلول بازی می‌کند.

برخی از مطالعات نشان دادند که افزایش تام بیان پروتئین گلیکوژن سنتاز کیناز ۳-بتا و یا فسفریله شدن آن موجب مهار سنتز پروتئین و هایپرتروفی سلول‌های عضلانی از طریق کاهش بیان پروتئین‌های نسخه‌برداری ویژه می‌شود (۱۸-۱۶). همچنین، گلیکوژن سنتاز کیناز ۳-بتا به واسطه توقف بیان پروتئین‌های Myc و سایکلین‌ها می‌تواند باعث کاهش تکثیر و تمایز سلول‌های عضلانی شود (۱۳). لذا، با توجه به نتایج حاصل از پژوهش حاضر این احتمال وجود دارد که تمرینات استقامتی شدید و طولانی مدت با افزایش قابل توجه بیان گلیکوژن سنتاز کیناز ۳-بتا و یا کاهش بتا-کاتنین مانع هایپرتروفی سلول‌های عضلانی شوند.

در این راستا، فوجی ماکی و همکاران عنوان داشتند این احتمال وجود دارد که فعالیت‌های استقامتی شدید مانند دوهای شدید و طولانی مدت، خطر آتروفی عضلانی و سارکوپنیا را به ویژه در افراد سالخورده و مسن افزایش دهد (۳). در این راستا، برخی از گزارش‌ها حاکی از آن است که گلیکوژن سنتاز کیناز ۳-بتا حتی می‌تواند مستقیماً با فسفریله کردن پروتئین‌های پیش‌آپوپتوزی مانند

از آن بود که تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل و تمرین هوازی در بیان ژن گلیکوژن سنتاز کیناز ۳-بتا وجود دارد ( $p=0/001$ ). به طوری که میزان بیان ژن گلیکوژن سنتاز کیناز ۳-بتا در گروه تمرین هوازی ( $10/36 \pm 3/51$ ) به طور معنی‌داری و حدود ۴۲٪ بیشتر از گروه کنترل ( $1/99 \pm 1/2$ ) بود. به عبارتی سه ماه تمرین هوازی روی نوارگردان موجب افزایش قابل توجه بیان ژن گلیکوژن سنتاز کیناز ۳-بتا عضله نعلی موش‌های صحرایی شده است (اشکال ۱ و ۲).

### بحث و نتیجه گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که سه ماه تمرین هوازی موجب کاهش معنی‌دار وزن بدن موش‌های صحرایی شد (۱۹٪). با این حال، با وجود کاهش معنی‌دار وزن بدن متعاقب سه ماه تمرین هوازی، تفاوت معنی‌داری در وزن عضله نعلی و نسبت وزن عضله نعلی به توده‌ی بدن گروه کنترل و تمرین مشاهده نگردید. اگرچه، میانگین وزن عضله نعلی گروه تمرین حدود ۱۱٪ کمتر از گروه کنترل بود. به عبارتی، سه ماه تمرین هوازی با شدت نسبی ۷۵-۸۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه، در کنار کاهش قابل توجه وزن بدن، موجب کاهش جزئی توده عضله نعلی شده است. به علاوه، براساس نتایج پژوهش حاضر، میزان بیان ژن بتاکاتنین در گروه تمرین هوازی به طور غیرمعنی‌داری و حدود ۳۰٪ کمتر از گروه کنترل بود. آمین و همکاران در تایید نتایج پژوهش حاضر، اشاره داشتند که تغییر معنی‌داری در میزان بیان پروتئین بتا-کاتنین متعاقب فعالیت ورزشی در موش‌های صحرایی مشاهده نشد (۱۰). ویسینگ و همکاران نیز عنوان داشتند که ۱۰ هفته تمرین استقامتی تغییر معنی‌داری در سطوح پایه پروتئین‌های پیام‌رسان مانند Akt-mTORC1، بتا-کاتنین و گلیکوژن سنتاز کیناز ۳-بتا ایجاد نکرد (۱۲). با این حال، در پژوهش حاضر میزان بیان ژن گلیکوژن سنتاز کیناز ۳-بتا در گروه تمرین هوازی به طور معنی‌داری و حدود ۴۲٪ بیشتر از گروه کنترل بود. به عبارتی سه ماه تمرین هوازی روی نوارگردان موجب افزایش قابل توجه بیان ژن گلیکوژن سنتاز کیناز

طولانی شدن تمرینات هوازی شدید و نیاز به حفظ قند خون، مسیر پیام‌رسانی AKT دچار تنظیم کاهشی شده و در نتیجه میزان فعالیت و بیان پروتئین گلیکوژن سنتاز کیناز ۳-بتا و به تبع آن تجزیه گلیکوژن عضلانی افزایش یابد. افزایش تام و فعال شدن پروتئین گلیکوژن سنتاز کیناز ۳-بتا با فسفریله شدن بتا-کاتین همراه است. سپس بتا-کاتین فسفریله، یوبی کوئیتینه شده و در پروتئازوم‌ها تجزیه می‌گردد (۲۱).

همچنین، به نظر می‌رسد عدم همخوانی نتایج مطالعه حاضر با مطالعه لیال و همکاران نیز چندان دور از انتظار نباشد، زیرا لیال و همکاران اثر هشت هفته تمرینات قدرتی-توانی را بر فعالیت مسیر Wnt و بیان پروتئین بتا-کاتین در عضله اسکلتی مورد ارزیابی قرار داده بودند، در حالی که پروتکل تمرینی مطالعه حاضر، تمرینات هوازی بالایی متوسط و طولانی مدت بود. برخی از مطالعات قبلی نیز اشاره داشتند که تمرینات قدرتی-توانی علاوه بر فعال کردن مسیرهای منجر به سنتز پروتئین عضلانی و هایپرتروفی مانند IGF-1/Akt/mTOR، میواستاتین، میوژنیک‌ها و سایکلین‌ها (۱، ۱۲، ۱۴، ۱۶)، می‌توانند از طریق اعمال اضافه بار مکانیکی به عضله اسکلتی موجب فعال‌سازی مسیر پیام‌رسانی Wnt شوند که نتیجه آن تجمع بتا کاتین همراه با افزایش mFzd-1 (mFrizzled-1)، Dvl-1 (Dishevelled) و فسفوریلاسیون گلیکوژن سنتاز کیناز ۳-بتا است (۱۸). با این حال، با توجه به محدودیت‌های پژوهش حاضر مانند عدم اندازه‌گیری تغییرات مورفولوژیکی، ارزیابی بیان سایر ژن‌های درگیر در مسیر پیام‌رسانی Wnt، بررسی سایر مسیرهای پیام‌رسانی مرتبط با آنزیم گلیکوژن سنتاز کیناز ۳-بتا و اندازه‌گیری محتوی پروتئین‌های مورد نظر توسط روش وسترن بلات، اظهار نظر قطعی در مورد نحوه تأثیرپذیری شاخص‌های مربوط به مسیر پیام‌رسانی Wnt در عضله اسکلتی از تمرینات ورزشی مختلف، منوط به انجام تحقیقات و مطالعات بیشتر در این زمینه می‌باشد.

در کل و بر اساس نتایج مطالعه حاضر می‌توان عنوان کرد که تمرینات هوازی طولانی مدت و با

Bax (Bcl-2-like protein X) موجب فعال‌سازی آن شود و یا بیان پروتئین Bim (Bcl-2-like protein 11) را افزایش دهد (۱۹ و ۲۰). به عبارتی گلیکوژن سنتاز کیناز ۳-بتا با تحریک آپوپتوز می‌تواند زمینه را برای تسریع آتروفی عضلانی و سارکوپنیا آماده کند. با این حال، بر خلاف نتایج مطالعه حاضر، لیال و همکاران گزارش دادند که هشت هفته تمرینات قدرتی-توانی موجب افزایش فعالیت مسیر Wnt و بیان پروتئین بتا-کاتین در عضله اسکلتی شد (۲). همچنین، فوجی‌ماکی و همکاران اشاره داشتند که چهار هفته دویدن اختیاری و با شدت آرام روی چرخ‌گردان موجب بیش‌تنظیمی مسیر Wnt و افزایش بتا-کاتین در گروه تمرین شد (۳). به نظر می‌رسد دلیل اصلی تناقض مطالعه حاضر با پژوهش فوجی‌ماکی و همکاران و برخی از مطالعات پیشین که اشاره به فعال شدن مسیر پیام‌رسانی Wnt و افزایش بیان پروتئین بتا کاتین داشتند (۱)، نوع، شدت و مدت پروتکل تمرینی مورد استفاده در مطالعه حاضر باشد؛ زیرا این احتمال وجود دارد که تمرینات هوازی شدید و طولانی مدت، با توجه به استرس بالای مکانیکی-متابولیکی میزان بیان و فعالیت گلیکوژن سنتاز کیناز ۳-بتا عضله اسکلتی را افزایش دهد و از این طریق مانع تجمع هسته‌ای بتا کاتین شود.

آزمودنی‌های مطالعه فوجی‌ماکی و همکاران روی چرخ‌گردان و با شدت ملایم و زیر متوسط تمرین کرده بودند به طوری که تمرین آن‌ها جزء تمرینات ورزشی داوطلبانه و اختیاری محسوب می‌شود؛ در حالی که آزمودنی‌های پژوهش حاضر ۱۲ هفته تمرین هوازی روی نوارگردان را با شدت نسبی ۸۰-۷۵ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه (سرعت ۳۳ متر بر دقیقه در هفته آخر) اجرا کردند. همچنین، با توجه به نقش حساس آنزیم گلیکوژن سنتاز کیناز ۳-بتا در تنظیم قند خون (۵ و ۲۱)، به نظر می‌رسد که همراستا با تمرینات هوازی شدید و طولانی مدت و افت قند خون، نیاز به تجزیه گلیکوژن عضلانی از طریق گلیکوژن سنتاز کیناز ۳-بتا و ورود آن به داخل جریان خون افزایش می‌یابد. لذا، این احتمال وجود دارد که با

Harb Perspect Biol; 2012.4:a007864.

5. Sakamoto K, Arnolds DE, Ekberg I, Thorell A, Goodyear LJ. Exercise regulates Akt and glycogen synthase kinase-3 activities in human skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*; 2004. 319(2):419-25.

6. Li F, Chong ZZ, Maiese K. Winding through the WNT pathway during cellular development and demise. *Histol Histopathol*; 2006.21(1):103-24.

7. Bu s, Chen Y, Wang S. Treadmill training regulates  $\beta$ -catenin signaling through phosphorylation of GSK-3 in lumbar vertebrae of ovariectomized rats. *Eur J Appl Physiol*; 2012.112(9):3295-304.

8. Dawson K, Aflaki M, Nattel S. Role of the Wnt-Frizzled system in cardiac pathophysiology: a rapidly developing, poorly understood area with enormous potential. *J Physiol*; 2013.;591(6):1409-32.

9. Brack AS, Conboy MJ, Roy S, Lee M, Kuo CJ, Keller C. Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science*; 2007.317(5839):807-10.

10. Amin H, Vachris J, Hamilton A, Steuerwald N, Howden R, Arthur ST. GSK3 inhibition and Lef1 upregulation in skeletal muscle following a bout of downhill running. *J Physiol Sci*; 2014.64(1):1-11.

11. Natio H, Powers SK, Demirel HA, Aoki J. Exercise training increases heat shock protein in skeletal muscles of old rats. *Med Sci Sports Exerc*; 2001.33(5):729-34.

12. Vissing K, McGee S, Farup J, Kjolhede T, Vendelbo M, Jessen N. Differentiated mTOR but not AMPK signaling after strength vs endurance exercise in training-accustomed individuals. *Scand J Med Sci Sports*; 2013.23(3):355-66.

13. Vyas DR, Spangenburg EE, Abraha TW, Childs TE, Booth FW. GSK-3 negatively regulates skeletal myotube hypertrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*; 2002.283:545-51.

14. Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, et al. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol*; 2001.3:1009-13.

15. Petropoulos H and Skerjanc IS. Beta-catenin is essential and sufficient for skeletal myogenesis in P19 cells. *J Biol Chem*; 2002.277:15393-9.

16. Ishido M, Uda M, Masuhara M, Kami K. Alterations of M-cadherin, neural cell adhesion molecule and  $\beta$ -catenin expression in satellite cells during overload-induced skeletal muscle hypertrophy. *Acta Physiol*; 2006.187:407-18.

17. Aschenbach WG, Ho RC, Sakamoto K, Fujii N, Li Y, Kim YB, et al. Regulation of Dishevelled and  $\beta$ -catenin in rat skeletal muscle: an alternative exercise-induced GSK-3 signaling pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;291(1):152-8.

شدت بالای متوسط، با وجود تأثیرات عملکردی مثبت همچون کاهش وزن بدن، احتمالاً می‌تواند موجب کاهش جزئی وزن عضله اسکلتی شود. همچنین، این روند با افزایش معنی‌دار بیان ژن گلیکوژن سنتاز کیناز ۳-بتا و کاهش غیرمعنی‌دار بتا-کاتنین به عنوان پروتئین‌های کلیدی درگیر در مسیر پیام‌رسانی Wnt همراه است که نهایتاً می‌تواند باعث توقف سنتز پروتئین و هایپرتروفی عضله اسکلتی شود. لذا، این احتمال وجود دارد که فعالیت‌های استقامتی شدید مانند دوهای شدید و طولانی مدت، خطر آتروفی عضلانی و سارکوپنیا را به ویژه در افراد سالخورده و مسن افزایش دهد. با این حال، اظهار نظر قطعی در زمینه مسیرهای منجر به هایپرتروفی عضله اسکلتی و تمرینات ورزشی مختلف، منوط به انجام تحقیقات و مطالعات بیشتر می‌باشد.

### تقدیر و تشکر

مقاله حاضر مستخرج از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد فیزیولوژی ورزشی آقای جعفر حبیبی می‌باشد. لذا، از مساعدت و همکاری صمیمانه مسئولین و تمام افرادی که موجب تسهیل اجرای پایان‌نامه شدند، تقدیر و تشکر به عمل می‌آید. ضمناً تمامی هزینه‌های پایان‌نامه به صورت شخصی بوده و هیچ سازمانی حمایت مالی نکرده است.

### منابع

1. Spillanea M, Schwarz N, Willoughby DS. Upper-body resistance exercise augments vastus lateralis androgen receptor-DNA binding and canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling compared to lower-body resistance exercise in resistance-trained men without an acute increase in serum testosterone. *Steroids*; 2015.98:63-71.

2. Leal ML, Lamas L, Aoki MS, Ugrinowitsch C, Ramos MSC, Tricoli V, et al. Effect of different resistance-training regimens on the WNT-signaling pathway. *Eur J Appl Physiol*; 2011. 111:2535-45.

3. Fujimaki Sh, Hidaka R, Asashima M, Takemasa T, Kuwabara T. Wnt Protein-mediated satellite cell conversion in adult and aged mice following voluntary wheel running. *J of Bio Chem*; 2014. 289(11): 7399-7412.

4. Willert K, Nusse R. Wnt Proteins. Cold Spring



18. Armstrong DD, Esser KA. Wnt/  $\beta$ -catenin signaling activates growth-control genes during overload-induced skeletal muscle hypertrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*; 2005.289:853-9.

19. Linseman DA, Butts BD, Precht TA, Phelps RA, Le SS, Laessig TA, et al. Glycogen synthase kinase-3 phosphorylates Bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis. *J Neurosci*; 2004.24:9993-10002.

20. Beurel E, Jope RS. The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Prog Neurobiol*; 2006.79(4):173-89.

21. Sharma M, Chuang WW, Sun Z. Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt stimulates androgen pathway through GSK3 inhibition and nuclear  $\beta$ -catenin accumulation. *J Biol Chem*; 2002.277(34):30935-41.

Archive of SID

## Effect of three months aerobic training on Wnt-signaling pathway in skeletal muscle of male rats

**Jafar Habibi**, MSc of Exercise Physiology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran. mahdibas@gmail.com

\***Jabbar Bashiri**, PhD, Associate Professor of Exercise Physiology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran (\*Corresponding author). bashiri.jabbar@gmail.com

**Alireza NourAzar**, PhD, Assistant Professor of Exercise Physiology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran. noura347@yahoo.com

**Hassan Purrazi**, PhD in Exercise Physiology, Tabriz, Iran. purrazi.h@gmail.com

### Abstract

**Background:** Atrophy in skeletal muscle plays an important role in disease-related tissue dysfunction such as sarcopenia. The Wnt-signaling pathway has been shown to be critical for skeletal muscle development. Current evidence suggests that exercise trainings may alter hypertrophy-related signaling in skeletal muscle. Therefore, the purpose of this study was investigating the effect of three months aerobic training on Wnt-signaling pathway in skeletal muscle of male rats.

**Methods:** This study was conducted as a two-group experimental design and sixteen 3-month-old male rats were selected and randomly divided into two groups of aerobic training (n=8) and control (n=8). Rats in trained group participated in the aerobic training program for three months (75-80%  $\dot{V}O_{2max}$ ). 48 hours after the last training session, the soleus muscle of rats were extracted and  $\beta$ -catenin and glycogen synthase kinase-3 mRNA evaluated by Real Time-PCR. Independent t-test was applied for statistical analysis of the data ( $p < 0.05$ ).

**Results:**  $\beta$ -catenin gene expression of trained group ( $1.11 \pm 0.17$ ) was not significantly lower than the control group ( $1.60 \pm 0.99$ ) (30%,  $p = 0.154$ ). However, glycogen synthase kinase-3 gene expression of trained group ( $10.36 \pm 3.51$ ) was significantly higher than the control group ( $1.99 \pm 1.2$ ) (420%,  $p = 0.001$ ).

**Conclusion:** In general, it seems that a three months aerobic training was effective in increasing glycogen synthase kinase-3 gene expression in skeletal muscle. This may be associated with an increased risk of muscle atrophy. However, more researches are needed to identify the effects of different exercise trainings on Wnt-signaling pathway.

**Keywords:** Aerobic training, Skeletal muscle, Wnt signaling pathway