زیست‌شناسی جانوری، سال چهاردهم، شماره دوم، زمستان ۱۴۰۰، صفحات ۷۹- ۶۹

مقاله پژوهشی

پاسخ پروتئین‌های mTOR، AKT و ژن مرتبط با اتوفاژی-۱ به تمرینات مقاومتی اکسنتریک و کانسنتریک مجزا در افراد سالم

علی رضا همتی سراپرده[۱*]، فاطمه شب خیز[۲]، خسرو ابراهیم[۳]

۱- گروه فیزیولوژی ورزشی، پردیس بین‌الملل کیش، دانشگاه تهران، کیش، ایران

۲- گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی وعلوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳- گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: ah.sport 91@gmail.com

DOI: 10.22034/ascij.2021.687829

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۲۲

چکیده

تغییر ساختار عضله اسکلتی به‌عنوان یکی از تغییرات اصلی عضله درنتیجه تمرینات ورزشی شناخته‌شده است؛ بنابراین هدف از پژوهش حاضر بررسی پاسخ پروتئین‌های AKT،mTOR و ژن مرتبط با اتوفاژی-۱ به تمرینات مقاومتی اکسنتریک و کانسنتریک مجزا در افراد سالم بود. ۱۰ مرد سالم به‌صورت تصادفی در دو گروه (۵ نفر در گروه کانسنتریک و ۵ نفر در گروه اکسنتریک) تقسیم شدند. انقباض آیزوکینتیک شامل اکسنتریک و کانسنتریک اکستنشن زانو با حداکثر قدرت و سرعت بود. به منظور همسان‌سازی بارکاری در هر دو پروتکل یکسان در نظر گرفته شد و سرعت رفت‌وبرگشت ۶۰ درجه بر ثانیه بود. انقباض‌ها شامل ۱۲ ست ۱۰ تکراری برای پای راست، زمان استراحت بین هر ست ۳۰ ثانیه در نظر گرفته شد. در ابتدا و انتهای مطالعه بایوپسی انجام شد. بایوپسی در دو جهت دیستال و پروگزیمال عضله پهن جانبی انجام شد. برای بررسی بیان پروتئین‌های mTOR و AKT و ژن مرتبط با اتوفاژی-۱ در هر گروه بررسی بافت‌ها با تکنیک ایمونوسیتوشیمی استفاده شد. برای تجزیه‌وتحلیل داده‌های از روش آماری تی وابسته و آزمون کوواریانس استفاده شد. برای تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS21 و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Exell 2013استفاده شد. نتایج نشان داد، تغییرات درون‌گروهی پروتئین‌های mTOR و AKT، در گروه اکسنتریک و کانسنتریک معنادار بود ($p \leq ۰/۰۵$). بااینحال تغییرات بین گروهی پروتئین‌های mTOR و AKT نشان‌دهنده عدم تفاوت بین دو گروه بود. همچنین نتایج نشان داد یک جلسه فعالیت اکسنتریک به‌طور معناداری مقادیر Atg-1 را کاهش داد ($p \leq ۰/۰۵$). علاوه براین تغییرات بین گروهی در مقادیر پس‌آزمون بین دو گروه اکسنتریک و کانسنتریک معنادار بود ($p \leq ۰/۰۵$). مطالعه حاضر نشان داد یک جلسه فعالیت اکسنتریک و کانسنتریک منجر به تغییر فاکتورهای درگیر در، هایپرتروفی و اتوفاژی عضلات اسکلتی می‌شود. علاوه براین، این تغییرات در انقباض اکسنتریک بیش از کانسنتریک است.

کلمات کلیدی: انقباض اکسنتریک، انقباض کانسنتریک، mTOR، AKT، Atg-1.

مقدمه

پروتئین کیناز B که به نام AKT نیز شناخته می‌شود، کیناز پروتئینی است که در انواع مختلف سلولی در بدن یافت می‌شود و نقش حیاتی را در مسیرهای سیگنالی متعددی ایفا می‌کند. برای مثال به تنظیم رشد سلولی و تقسیم سلولی، تمایز و بقای سلول کمک می‌کند. (۲۲). فعالیت AKT روی اهداف پایین‌دست، عملکرد آن را در روندهای قلبی عروقی مثل بقای سلولی، رشد، تکثیر،رگ زایی، اتساع عروق و متابولیسم سلولی مشخص می‌کند. پروتئین کیناز B (AKT) بقای سلولی را از طریق فعالیت‌های، کاسپاز ۹، YAP، Bcl-2 و Bcl-X پیش می‌برد. مهار پروتئین‌های FoxO به‌وسیله AKT از طریق مکانیسم‌های نسخه‌برداری، سبب افزایش بقای سلولی می‌شود. AKT رشد و تکثیر سلولی را از طریق mTORC1 تحریک می‌کند. همچنین ترشح VEGF افزایش داده و فسفریلاسو eNOS، اتساع عروق و رگ‌زایی را میانجیگری می‌کند. AKT متابولیسم سلولی را از طریق اهداف پایین‌دست مثل GLUT4 و GSK3 افزایش می‌دهد. (۱). راپامایسین هدف یک پروتئین ۲۹۰ کیلو دالتونی است که در دهۀ ۱۹۷۰ از جداسازی یک مخمر مقاوم در برابر ویژگی‌های مهاری رشد سلول به وجود آمده است. راپامایسین می‌تواند یک عامل ضد سرطانی، ضد قارچ و همچنین ضد سرکوب‌کنندۀ سیستم ایمنی بدن از طریق یک ترکیب تولیدشده از نوعی باکتری به نام راپانوئی باشد (۲). اختلال آن منجر به بروز بیماری‌هایی از قبیل سرطان (سینه، پروستات، تخمدان)، هایپرتروفی قلب و آتروفی عضلانی می‌شود. راپامایسین هدف به دو شکل وجود دارد: مجموعه راپامایسین هدف ۱ (TORC1) و مجموعه راپامایسین هدف ۲ (TORC2). هر مجموعه با سوبسترای متفاوتی فسفریله می‌شودوبه‌عنوان کنترل‌کنندۀ اصلی دررشد سلول شناخته می‌شوند (۲۰).

MTOR در پستانداران به‌صورت راپامایسین هدف پستانداران وجود دارد که خود به دو مجموعۀ MTORC1 و MTORC2 تقسیم می‌شود. هر کمپلکس با توجه به محل قرارگیری‌اش در سلول وظایف مختلفی را انجام می‌دهد. MTORC1 ترکیبی از MTOR، S6K، RAPTOR و GβL می‌باشد که رشد سلول را از طریق هماهنگ کردن سنتز پروتئین تنظیم کرده و باعث تجمع توده‌ای از سلول‌ها می‌شود (هایپرتروفی). همچنین در بایوژنز هسته، لیپوژنز، گلیکولیز و آتوفاژیا (خودخوری) نقش دارد. از طرفی MTORC2 از MTOR، RICTOR، SIN1 و GβL تشکیل‌شده است (۱۹). این مسیر در تنظیم لیپوژنز، متابولیسم گلوکز، فعالیت اسکلت سلولی و آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول) نقش دارد. MTOR در بدن انسان شرایطی را به وجود می‌آورد که برای رشد مثبت سلول بسیار مناسب می‌باشد؛ مثلاً در بیان ژن و ترجمۀ پروتئین‌های مختلف سلول (آنزیم‌ها و پروتئین‌های انقباضی)، بایوژنز ریبوزومی، فعال کردن مسیر سنتزی پروتئین کیناز C (PKC) که باعث رشد عضله می‌شود و همچنین استحکام اسکلت سلولی درگیر می‌شود. از طرفی باعث جلوگیری از آپوپتوز، پروتئین سوزی (آتوفاژیا) و ترناور بیش‌ازاندازۀ ناقل-های مواد مغذی ازجمله ناقل گلوکز و اسیدهای آمینه می‌شود (۷).

محرک‌های تحریک‌کنندۀ مسیر سیگنالینگ MTOR1-2، مواد مغذی (اسیدهای آمینه و گلوکز)، عوامل رشدی (IGF-1 و انسولین)، فشارمکانیکی، سایتوکین-ها (IL6) و هورمون‌های استروئیدی می‌باشند. مهار کننده‌های این مسیر خود مخمر راپامایسین، استرس، التهاب و رادیکال‌های آزاد هستند و نشان‌دهندۀ این موضوع است که رشد سلول فقط در شرایط مطلوب اتفاق می‌افتد.

یکی از محرک‌های اصلی فعال‌سازی مسیر mTOR، فشار و بار مکانیکی واردشده به عضله است. عوامل رشدی، مواد مغذی، هورمون‌ها و سایتوکین‌ها از دیگر محرک‌های مسیر mTOR هستند. تمرین ورزشی از نوع مقاومتی-قدرتی با تحریک مکانیکی همراه است که این تحریک یک عامل بسیار قوی برای افزایش تودهٔ عضلهٔ اسکلتی است. این افزایش به دلیل ترشح IGF-1 یا MGF (فاکتور رشد مکانیکی) در عضله می‌باشد؛ که متعاقباً منجر به فعال شدن یک آبشار سیگنالینگ در سلول می‌شود که به ترتیب شامل PI3K،PDK1، PDK2 و AKT می‌باشد. بعدازاین مرحله AKT باعث بهبود فعالیت دو مسیر mTOR و گلیکوژن سنتاز کیناز ۳ بتا می‌شود؛ که نقش کلیدی در مسیر هایپرتروفی عضله اسکلتی در پاسخ به تمرینات قدرتی دارند. بعد از فسفریله شدن mTOR، PV0s6k که محرک سنتز پروتئین است، فسفریله می‌شود از طرف دیگر عامل‌های مهاری رشد عضله یعنی 4e-bpi و eif2 مهار می‌شوند (۱۵).

یکی دیگر از اهمیت‌های مسیر AKT/mTOR، مهار و غیر فعال‌سازی عامل FOXO یا FKHR می‌باشد. FOXO عامل اصلی در فعال‌سازی سیستم یوبی کوئیتین-پروتئازم است که باعث تجزیهٔ پروتئین‌های انقباضی می‌شود. درواقع مسیر AKT/mTOR با فعالیتش از آتروفی و تجزیهٔ پروتئین‌های عضلات اسکلتی جلوگیری می‌کند. تحقیقات نشان می‌دهد که تمرینات قدرتی از طریق فعال‌سازی مسیر AKT/mTOR، باعث مهار عامل FOXO وآتروژنین می‌شود و درنتیجه از آتروفی عضلات جلوگیری می-کند (۸). فعالیت مسیر AKT/mTOR به سن، جنس، نوع و شدت فعالیت انجام‌شده، نوع و میزان سرعت انقباض (درونگرا-برونگرا) و همچنین نوع تار بستگی دارد.

بر اساس تحقیقاتی که درزمینه ارتباط بین مسیر mTOR/ AKT و فعالیت ورزشی صورت گرفته است، می‌توان گفت که این مسیر به‌طور ویژه در تمرینات قدرتی و به‌منظور هایپرتروفی فعال می‌شود. البته باید گفت که این مسیر وظایف دیگری را نیز بر عهده دارد. ولی در کل یک مسیر آنابولیسمی می‌باشد؛ اما در اینکه آیا مدت، شدت و نوع تمرین چگونه سطوح mTOR/ AKT را در انسان تحت تأثیر قرار می‌دهد هنوز بی‌پاسخ‌مانده است. فعالیت مسیر mTOR/ AKT به سن، جنس، نوع و شدت فعالیت انجام‌شده، نوع و میزان سرعت انقباض (درونگرا-برونگرا) و همچنین نوع تار بستگی دارد. لذا پژوهشگر در پژوهش حاضر در نظر دارد تا به مقایسه یک جلسه فعالیت اکسنتریک و کانسنترک مجزا بر بیان پروتئین‌های mTOR/ AKT را مورد ارزیابی قرار دهد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربی بوده ودر این راستا ۱۰مرد سالم با رنج سنی ۱۸ تا ۳۰ سال که به‌صورت تفریحی تمرین قدرتی انجام می‌دهند (افرادی که به‌منظور سلامت عمومی بدن و ارتقای ترکیب بدنی ۳ تا ٦ روز در هفته تمرین می‌کنند) و به‌صورت تصادفی در هر یک از گروه‌ها (گروه کانسنتریک ۵ نفر- گروه اکسنتریک ۵ نفر) تقسیم شدند. در این پژوهش برای به حداقل رساندن تأثیر بین جنسی در بیان ژن، تنها از مردان استفاده شد. به‌منظور تعیین سلامتی آزمودنی‌ها و به حداقل رساندن خطرهای مرتبط با سیستم قلبی عروقی از راهنمای سلامت دانشکده پزشکی ورزشی آمریکا استفاده شد. از طرفی افراد حاضر در پژوهش با توجه به خود اظهاری، در ٦ ماه منتج به تمرین از هیچ مکمل ورزشی استفاده نکرده بودند. همچنین کد اخلاق این پژوهش IR.UT.SPORT.REC.1397.029

که توسط دانشگاه تهران صادر و در سایت وزارت بهداشت جمهوری اسلامی ایران موجود است.
آزمودنی‌ها دو جلسه در آزمایشگاه حضور پیدا کردند. هدف از جلسه اول آشنایی با محیط آزمایشگاه، سیستم آیزوکینتیک (دستگاه دینامومتر آیزوکینتیک ساخت کمپانی Biodex کشور آمریکا) و اندازه‌گیری قد، وزن، توضیح پرسشنامه درک فشار تمرین بورگ و تعیین گشتاور بود. در جلسه دوم، آزمودنی‌ها به‌صورت تصادفی یکی از پروتکل‌های اکسنتریک یا کانسنتریک را در ساعت ۸ تا ۹ صبح انجام دادند.
پروتکل تمرین: آزمودنی‌ها در هر جلسه ابتدا پس از مراجعه به آزمایشگاه به مدت ۱۰ دقیقه به حالت نشسته استراحت کردند و مراحل کار بار دیگر برای آن‌ها به‌منظور اطمینان از درک آن‌ها از نحوه اجرای تمرین مرور شد. پس‌ازآن آزمودنی بر روی صندلی دینامومتر نشسته و تنظیمات برای آماده‌سازی دستگاه صورت گرفت. این تنظیمات شامل جهت-گیری دینامومتر ۹۰ درجه، تیلت دینامومتر. درجه، جهت‌گیری صندلی ۹۰ درجه، تیلت پشتی صندلی ۸۵ درجه، دامنه حرکت ۰ تا ۹۰ درجه و محور چرخش دینامومتر در صفحه ساجیتال در راستای خطی که از کندیل خارجی محور می‌گذرد انتخاب شد. گرم کردن اختصاصی با سیستم آیزوکینتیک شامل ۲ ست ۵ تایی و زمان استراحت بین هر ست ۳۰ ثانیه بود. آزمودنی‌ها سپس یکی از دو پروتکل مختلف انقباض عضلانی آیزوکینتیک که از قبل و به‌صورت تصادفی برای آن‌ها تعیین‌شده بود را با پای راست اجرا کردند. پس از اتمام فعالیت پای تمرین کرده بدون هیچ فشاری تا زمان انجام بایوپسی ثابت نگاه داشته شد. بایوپسی از هر آزمودنی ۳ تا ٤ ساعت پس از اتمام پروتکل تمرینی انجام شد. طی اجرای پروتکل در انتهای هر ست میزان درک فشار با استفاده از مقیاس ۲۰ نمره‌ای بورگ (RPE) تعیین گردید. مقیاس بورگ همبستگی بالایی با میزانHR ، میزان تنفس و تجمع اسیدلاکتیک دارد و یکی از راه‌های تعیین شدت فعالیت بدنی می‌باشد. از آزمودنی‌ها خواسته شد که پس از اتمام هر ست عدد مربوط به مقیاس بورگ را اعلام کنند. زمانیکه آزمودنی عدد ۲۰ را اعلام می‌کرد با تشویق کلامی ۲ ست دیگر تمرین ادامه پیدا می‌کرد و هنگامی‌که توانایی اجرای کامل پروتکل توسط آزمودنی وجود نداشت، تمرین متوقف می‌شد. پروتکل‌های انقباض آیزوکینتیک شامل اکسنتریک و کانسنتریک اکستنشن زانو با حداکثر قدرت و سرعت زاویه‌ای ٦۰ درجه بر ثانیه بود. گشتاورهای تعیین‌شده برای هر آزمودنی به‌منظور همسان‌سازی بارکاری در هر دو پروتکل یکسان در نظر گرفته شد و سرعت رفت‌وبرگشت ٦۰ درجه بر ثانیه بود. انقباض‌ها شامل حداکثر ۱۲ ست ۱۰ تکراری برای پای راست، زمان استراحت بین هر ست ۳۰ ثانیه در نظر گرفته شد. بدیهی است که زمان اجرای تمرینات اکسنتریک بیشتر از تمرینات کانسنتریک بود.
نمونه‌برداری بافت عضله: در ابتدا و انتهای مطالعه از بافت عضله پهن جانبی بایوپسی انجام شد. بایوپسی در دو جهت دیستال و پروگزیمال عضله پهن جانبی انجام شد. نمونه بایوپسی در شرایط پایه برای بار اول و ۳ تا ٤ ساعت پس از انجام تمرین در شرایط کاملا استریلیزه و در بیمارستان فوق تخصصی بقیه‌الله و توسط فوق تخصص جراحی ارتوپد انجام شد (۵). بایوپسی های عضلانی پوستی (۱۵ تا ۲۰ میلی‌گرم) از قسمت میانی عضله پهن جانبی در نقطه میانی بین کشکک و تروکانتر بزرگتر ران در یک عمق بین ۱ تا ۲ سانتی‌متر بر اساس روش‌های قبلاً تأییدشده به دست آمد. برای تمامی آزمودنی‌ها از پای راست استفاده شد. ناحیه بایوپسی تمیز شده و موهای پا در آن ناحیه کاملاً برداشته شد و با صابون ضدعفونی شسته و با الکل ضدعفونی شد. علاوه بر این، مکان

بایوپسی با سم‌زدایی نیز با بتادین (آنتی‌سپتیک مایع) ضدعفونی شد. یک ناحیه کوچک از پوست تمیز شده، تقریباً ۲ سانتی‌متر قطر، با یک تزریق زیر جلدی ۰/۱ میلی‌لیتر موضعی لیدوکائین بی‌حس شد. پس از بی‌حسی، یک نمونه بیوپسی آسپیراسیون سوزنی با اندازه ۱٦ اینچی (Tru-Core I Biopsy Instrument، Techniques Device Technologies، Gainesville، FL) در عمق تقریبی ۱ سانتی‌متر برای استخراج نمونه عضلانی قرار گرفت. پس از بایوپسی اولیه، بایوپسی بعدی، با استفاده از نشانه های پیش بایوپسی و نشانه‌های عمق روی سوزن، بافت عضلانی را از تقریباً همان مکان اولیه استخراج شد. پس از استخراج عضله، بافت چربی از نمونه‌های عضلانی برداشته شد. نمونه‌ها بلافاصله در دمای -۸۰ درجه سانتی گراد ذخیره شدند. در هر یک از دو جلسه آزمون، دو نمونه عضلانی به دست آمد که مجموعاً ۱۰ نمونه عضلانی طی دوره مطالعه برای هر گروه و در کل ۲۰ نمونه به دست آمد. نمونه‌های عضلانی در زمان پایه و ۳ تا ٤ ساعت پس از تمرین به دست آمد.

مکان‌یابی پروتئین یا آنتی‌ژن خاص: سوسپانسیون سلولی بر روی لامل های ژلاتیه استریل کشت داده شد. پس از ۲٤ ساعت با PBS شست‌وشو داده شد. به مدت ۲۰ دقیقه با پارافرمالدئید ٤ درصد در دمای یخچال فیکس شدند. لامل ها پس از شست و شو با PBS در HCL ۲ نرمالیته به مدت بیست دقیقه در دمای محیط انکوبه شدند. لامل ها پس از شست‌وشو با PBS در معرض تریتون ۰.۳ X-1002درصد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند. تریتون غشای سلولی را به آنتی‌بادی‌ها نفوذپذیر می‌کند. در مرحله بعد سرم بز ۱۰ درصد به مدت نیم ساعت به سلول‌ها اضافه شد. پروتئین‌های سرم بزی باعث می‌شود که محل‌های غیراختصاصی آنتی‌ژنی پوشیده شده و از واکنش غیراختصاصی جلوگیری شود. سلول‌ها به مدت ۱ ساعت با آنتی‌بادی اولیه رقیق‌شده به نسبت ۱ به ۱۰۰ در PBS به مدت یک‌شب در دمای یخچال و در اتاقک مرطوب انکوبه شدند. استفاده از پارافیلم و مرطوب نگه‌داشتن شرایط از خشک شدن آنتی‌بادی جلوگیری می‌کند. سپس دو بار با PBS شست‌وشو داده شدند و به مدت ٦۰ دقیقه در معرض آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با رقت ۱ به ۲۰۰ در تاریکی و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. پس از ۳ بار شست‌وشو با PBS به‌منظور رنگ‌آمیزی هسته‌ها از PI یا DAPI استفاده شد و سپس با میکروسکوپ فلورسنت بررسی شدند.

پس از جمع‌آوری داده‌ها برای تجزیه‌وتحلیل داده‌های این پژوهش از روش‌های آماری توصیفی و استنباطی استفاده شد. از آمار توصیفی برای محاسبه میانگین و انحراف استاندارد داده‌ها استفاده شد و از آمار استنباطی برای مقایسه گروه‌ها باهم استفاده شد. همچنین برای بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون کولموگروف اسمیرنف استفاده شد. برای مقایسه میانگین‌های درون‌گروهی از روش آماری تی وابسته در سطح معناداری ($P<0.05$) استفاده شد. برای مقایسه دو گروه از آزمون کوواریانس استفاده شد. برای تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS21 و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Exell 2013 استفاده شد.

جدول ۱- پروتکل تمرین در گروه‌های اکسنتریک و کانسنتریک

گروه	تعداد ست	تعداد حرکت	استراحت بین ست
اکسنتریک	حداکثر ۱۲ ست	۱۰ تکرار	۳۰ ثانیه استراحت بین ست‌ها با سرعت‌پایین
کانسنتریک	حداکثر ۱۲ ست	۱۰ تکرار	۳۰ ثانیه استراحت بین ست‌ها با سرعت‌بالا

نتایج

در این بخش ابتدا داده‌های توصیفی مرتبط با شاخص‌های دموگرافیک آزمودنی‌ها (جدول ۲) ارائه شده است. طبق جدول ۳ بین مقادیر پیش آزمون و پس آزمون متغیرهای mTOR ، AKT و Atg-1 در گروه‌های اکسنتریک تفاوت معنادار وجود دارد($P\leq0.05$). اما بین مقادیر پیش آزمون و پس آزمون متغیرهای mTOR و Atg-1 در گروهای کانسنتریک تفاوت معناداری وجود ندارد($P\geq۰/۰۵$). همچنین بین مقادیر پیش آزمون و پس آزمون AKT در گروه کانسنتریک اختلاف معناداری مشاهده شد($P\leq0.05$). از آزمون کوواریانس جهت بررسی اثرات بین گروهی استفاده شد. نتایج نشان داد. مطابق با جدول مقدار F تعامل پیش‌آزمون mTOR۲/۱۷۸، پیش‌آزمون AKT ۰/۳۰۲ و پیش‌آزمون Atg-1 ۰/٤٥۲ می‌باشد ($P\geq۰/۰۵$) که معنادار نمی باشد و می توان نتیجه گرفت که پیش فرض همگنی شیب رگرسیون رعایت شده است. همچنین نتایج حاصل از جدول تحلیل کوواریانس نشان می‌دهد که بین گروه‌های مختلف در مقادیر پس‌آزمون mTOR اختلاف معناداری وجود ندارد (F= ۲/۰۷۰ و p= ۰/۲٤٦). همچنین نتایج حاصل از جدول تحلیل کوواریانس نشان می‌دهد که بین گروه‌های مختلف در مقادیر پس‌آزمون AKT اختلاف معناداری وجود ندارد (F= ۰/۹٥۰ و p= ۰/٤۰۲). همچنین نتایج حاصل از جدول تحلیل کوواریانس نشان می‌دهد که بین گروه-های مختلف در مقادیر پس‌آزمون Atg-1 اختلاف معناداری وجود دارد (F= ۰/٤۸٥ و p= ۰/۰٤۳).

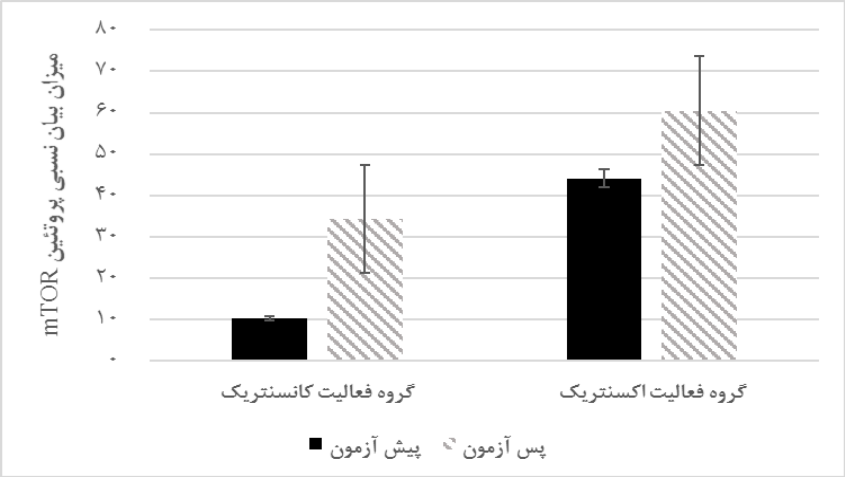
جدول ۲- شاخص‌های دموگرافیک آزمودنی‌ها در دو گروه

متغیر	گروه‌ها	میانگین ± انحراف استاندارد
وزن (کیلوگرم)	گروه فعالیت کانسنتریک	۷۱/٥۰±۸/۱٦
	گروه فعالیت اکسنتریک	۷۲/۱۰±۹/٦۱
BMI (kg/m^2)	گروه فعالیت کانسنتریک	۲۳/٤٥±۲/۲٦
	گروه فعالیت اکسنتریک	۲٤/۲٦±۱/۹۷
قد (سانتیمتر)	گروه فعالیت کانسنتریک	۱۷۸/۸۰±٤/۲٦
	گروه فعالیت اکسنتریک	۱۷٦/۲٦±٤/٦۷
سن (سال)	گروه فعالیت کانسنتریک	۲٦/۷٦±۳/٤٥
	گروه فعالیت اکسنتریک	۲٥/۱٥±۲/٦۸

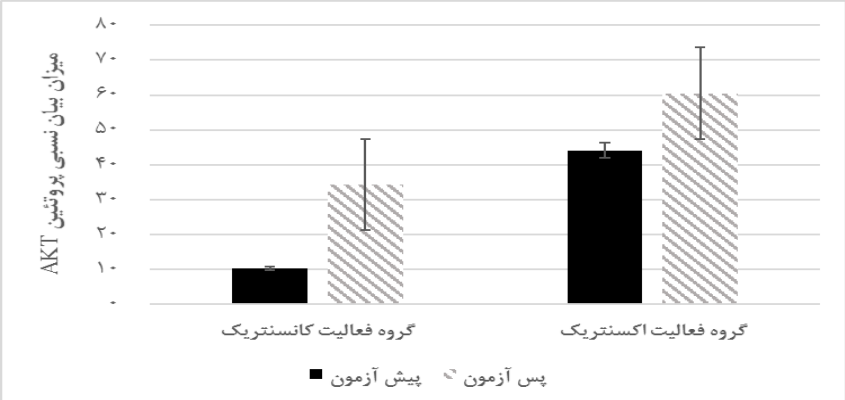
جدول ۳- نتایج آزمون T وابسته جهت مقایسه میانگین‌های پیش آزمون و پس آزمون mTOR، AKT، Atg-1 در دو گروه

متغیر	گروه	اختلاف میانگین	T	درجات آزادی	*p*
mTOR	گروه فعالیت کانسنتریک	-٤/۰٦	-۹/٤٥۲	٤	۰/٥۹٥
	گروه فعالیت اکسنتریک	-٤/٥۱	-۳/٤۱٥	٤	۰/۰۰۱
AKT	گروه فعالیت کانسنتریک	-۳۳/۹۲۳	-۱۱/٦۷٦	٤	۰/۰۰۷

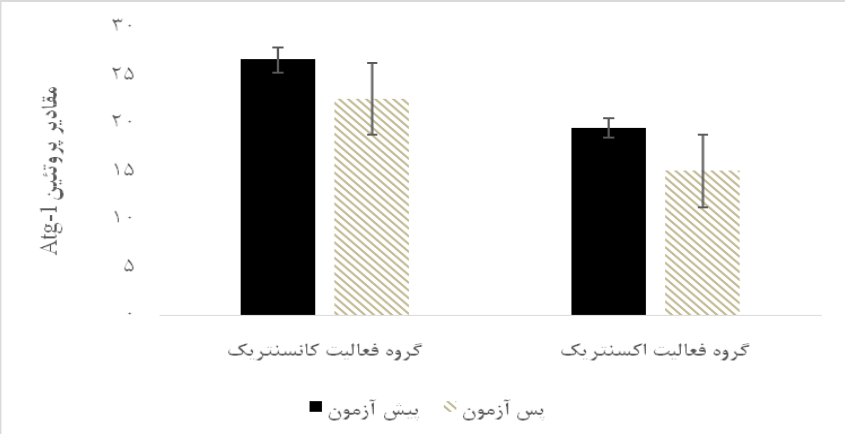
	گروه فعالیت اکسنتریک	-۲۶/۲۴۳	-۴/۸۶۹	٤	۰/۰٤۰
Atg-1	گروه فعالیت کانسنتریک	-٤/۰٦	-۹/٤٥۲	٤	۰/٥۹٥
	گروه فعالیت اکسنتریک	-٤/٥۱	-۳/٤۱٥	٤	۰/۰۰۱



شکل ۱- مقادیر نسبی mTOR در پیش‌آزمون و پس‌آزمون دو گروه



شکل ۲- مقادیر AKT در پیش‌آزمون و پس‌آزمون دو گروه



شکل ۳- مقادیر Atg-1 در پیش‌آزمون و پس‌آزمون دو گروه

بحث

مسیر سیگنالینگ mTOR تسهیل‌کنندهٔ اصلی رشد طبیعی عضله و مهم‌ترین مسیر سیگنالینگ درگیر در هایپرتروفی عضلات اسکلتی است. تمرین قدرتی به‌صورت حاد و مزمن – هر دو –مسیر AKT/mTOR را فعال می‌کند. به‌طور مثال در تحقیقی آزمودنی‌ها به سه گروه تمرین استقامتی، تمرین قدرتی و گروه کنترل تقسیم شدند و به مدت ۱۰ هفته فعالیت استقامتی و قدرتی را انجام دادند. نتایج نشان داد که در گروه تمرین قدرتی فعالیت، AKT/mTOR به نسبت قبل از فعالیت افزایش داشت، در حالیکه هیچ تغییری در مقدار AMPK آن‌ها رخ نداد. از طرفی در گروه تمرین استقامتی فقط مقدار AMPK افزایش داشت که با بایوژنز میتوکندریایی همراه بود. درواقع AMPK از طریق فسفوریله کردن راپتور که بخشی از کمپلکس mTOR است، باعث مهار فعالیت AKT/mTOR می‌شود (۱۵). در پژوهش حاضر نشان داده شد تغییرات درون‌گروهی mTOR بعد از یک جلسه فعالیت، در گروه اکسنتریک (p=۰/۰۰٦) و گروه کانسنتریک (p=۰/۰۱۹) معنادار بود. همچنین تغییرات بین گروهی نشان‌دهنده عدم تفاوت بین دو گروه بود (p=۰/۲٤٦). همچنین تغییرات درون‌گروهی AKT بعد از یک جلسه فعالیت، در گروه اکسنتریک (p=۰/۰۰۷) و گروه کانسنتریک (p=۰/۰٤۰) معنادار بود. همچنین تغییرات بین گروهی نشان‌دهنده عدم تفاوت بین دو گروه بود (p=۰/٤۰۲).

در همین راستا بلوک و همکاران (۲۰۱۵) به بررسی سازگاری هیپرتروفی عضله اسکلتی در ۳ و ٦ هفته تمرین مقاومتی برای سنتز پروتئین عضله از طریق مسیر سیگنالینگ mTORC1 پرداختند. سطوح پروتئین‌های mTOR و پروتئین AKT اندازه‌گیری شد. نتایج این مطالعه هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (۳). همچنین نعمتی و همکاران (۱۳۹٤) به بررسی تعیین تأثیر اجرای یک دوره تمرین مقاومتی بر بیان پروتئین‌های تام و فسفریله mTOR و p70s6k به‌عنوان تنظیم‌گر اصلی هایپرتروفی در عضله خم کننده طویل انگشتان پا (FHL) رت‌های نر سالم پرداختند. نتایج نشان داد، اجرای تمرین مقاومتی موجب افزایش معنادار شکل فسفریله پروتئین‌های mTOR و p70s6k می‌شود؛ اما موجب افزایش معنادار محتوی پروتئینی تام mTOR و p70s6k نشد (۱٤).

. ما و همکاران (۲۰۱۳) مسیر PI3K/AKT/mTOR را در هیپرتروفی بطن چپ موش‌های صحرایی بررسی کردند. در این تحقیق موش‌ها به دو گروه تمرین و کنترل تقسیم شدند و گروه تمرین به مدت ۸ هفته و ۵ جلسه در هفته و یک ساعت در روز شنا می‌کردند و بیان سطوح پروتئین قلبی PI3K/AKT/mTOR براثر تمرین ۳٦ درصد افزایش داشت که نشان‌دهنده فعال شدن مسیر پیام‌رسانی PI3K/AKT/mTOR بود (۱۳). mTOR از مسیرهای مختلفی می‌تواند فعال شود اما به‌طور کامل مشخص نشده است که تمرینات ورزشی از کدام مسیر باعث فسفوریله و فعال شدن mTOR می‌شود (۱۸). یکی از مسیرهای پیشنهادشده مسیر IGF-1/PI3K/AKT است که با توجه به نتایج تحقیق حاضر که منجر به فعال شدن mTOR شده است مورد تائید است. نظریه‌ای که به‌تازگی ارائه‌شده است، نظریه گیرنده‌های مکانیکی در سطح سلول‌های مانند انتگرین، دسیتروفن و کانال‌های فعال‌شده از طریق کشش است. با توجه به نتیجه تحقیق حاضر می‌توان گفت که فعالیت ورزشی با تأثیر بر بعضی از پروتئین‌ها و مکانیسم‌ها می‌تواند به‌صورت مستقل منجر به فعال شدن mTOR شود. بااین‌حال باید مطالعات بیشتری در این زمینه انجام گیرد. در تحقیقی دیگر لوسیانو و

همکاران (۲۰۱۷) به بررسی اثر تمرینات مقاومتی بر سطوح پروتئین‌های AKT،mTOR پرداختند. نتایج این مطالعه تفاوت معنی‌داری را به دنبال فعالیت ورزشی مقاومتی در عضله چهار سر موش‌های صحرایی نشان دادند (۱۰). نتایج تحقیق حاضر افزایش را در فاکتور موردنظر نشان داد. مهم‌ترین تأثیر مسیرهای پیام‌رسانی mTORC1 اثر بر پروتئین‌های درگیر در کنترل ترجمه یعنی پروتئین‌های P70S6K1 است (٤). علاوه بر نوع تمرین، نوع و سرعت انقباض (درونگرا-برونگرا) نیز در تحریک مسیر رشد عضله تأثیر دارد. بطوریکه انقباض برونگرا به نسبت درون‌گرا باعث افزایش بیشتری در سنتز پروتئین‌های عضلانی می‌شود. چون در این نوع انقباض به نسبت انقباض درون‌گرا، تارهای عضلانی بیشتری درگیر می‌شود درنتیجه نیروی بیشتری نیز تولیدشده و مسیر AKT/Mtor بیشتر درگیر می‌شود و اینکه در انقباض برونگرا آسیب بیشتری به عضله وارد می‌شود که این آسیب خود محرک ترشح IGF-1 و IL6 است که بر روی سلول‌های ماهواره‌ای گیرنده دارند و با فعال‌سازی‌ای سلول‌ها باعث هایپرتروفی عضلانی می‌شوند. از طرفی هرچه انقباض با سرعت بیشتری همراه باشد رشد عضله بیشتر تحریک می‌شود؛ مثلاً در دو گروه که یک جلسه تمرین قدرتی (یک گروه انقباض آهسته برونگرا و گروه دیگر انقباض سریع برونگرا) را با ۵ ست، ۸ تکراری انجام دادند، طی بایوپسی که ۲ ساعت بعد از اتمام فعالیت از قسمت ران دو گروه آزمودنی گرفته شد، مشخص شد که مقدار فسفوریله شدن AKT و P70s6k در گروه انقباض سریع خیلی بیشتر از گروه انقباض آهسته بوده است. در تحقیقی کوون و همکاران (۲۰۱۸) به بررسی ۷ هفته فعالیت ورزشی مقاومتی مرتبط با هیپرتروفی عضلانی با مدولاسیون اتوفاژی در موش‌ها پرداختند... نتایج این تحقیق نشان داد که انجام تمرینات مقاومتی منجر به افزایش فاکتورهای p70S6K وAKT، mTOR می‌شود (۹).

از طرفی اتوفاژی به‌عنوان یک فرایند کاتابولیکی با تجزیه پروتئین‌ها و ارگان‌های مختلف همواره با فرآیند آپوپتوز منجر به کنترل رشد عضله و کیفیت عملکرد در بافت‌های مختلف می‌شوند (۱٦, ۱۷). ژن‌های درگیر در اتوفاژی تحت تأثیر استرس‌های فیزیولوژیک و پاتولوژیکی قرار می‌گیرند.

مطالعات پیشین نشان داده‌اند تمرینات هوازی منجر به بهبود اتوفاژی در راستای حفظ هموستاز سلولی می‌شود (٦ , ۸). درحالی‌که نقش تمرینات مقاومتی مشخص نیست. درهمین راستا، در مطالعه حاضر به بررسی نقش انقباض اکسنتریک و کانسنتریک بر تغییرات Atg-1 پرداخته شد. نتایج نشان داد تغییرات Atg-1 پس از انقباض اکسنتریک به‌طور معناداری کاهش داشت. همچنین بین پس‌آزمون دو گروه تفاوت معناداری مشاهده شد. اگرچه در مطالعه‌ای نشان داده‌شده است که تمرینات مقاومتی پیش‌رونده که هایپرتروفی عضلانی را تحریک می‌کنند، با کاهش اتوفاژی و ژن Atg-1 همراه بوده است (۲۱). در پژوهشی نشان داده شد، تمرینات مقاومتی منجر به افزایش هم‌زمان اتوفاژی همراه با بهبود گلوکز خون و افزایش فسفوریلاسیون AKT شده است (۱۱). به نظر می‌رسد مطالعه حاضر اولین مطالعه‌ای باشد که نقش نوع انقباض عضلانی را بر Atg-1 بررسی می‌کند. از طرفی فعال‌سازی mTOR تحت شرایط تغذیه‌ای مناسب منجر به افزایش سنتز پروتئین و کاهش فرایندهای کاتابولیکی و آتوفاژی می‌شود (۱۲). در مطالعه حاضر نیز نشان داده شد، فعالیت اکسنتریک منجر به بهبود Atg-1 و mTOR در راستای افزایش فسفوریلاسیون AKT شده است. این نتایج نشان می‌دهد که دو نوع انقباض اکسنتریک و کانسنتریک

ممکن است از مکانیسم‌های مختلف فیزیولوژیکی بر تغییرات اتوفاژی و سنتز پروتئین نقش داشته باشند.

نتیجه‌گیری

درمجموع مطالعه حاضر نشان داد یک جلسه فعالیت اکسنتریک و کانسنتریک منجر به تغییر فاکتورهای درگیر در قدرت، هایپرتروفی و اتوفاژی عضلات اسکلتی می‌شود. علاوه براین، این تغییرات درمجموع در انقباض اکسنتریک بیش از کانسنتریک است.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر مستخرج از رساله دکتری فیزیولوژی ورزشی آقای علیرضا همتی سراپرده می‌باشد. لذا از مساعدت و همکاری صمیمانه مسئولین دانشگاه تهران و بیمارستان بقیه‌الله و تمام افرادی که موجب تسهیل اجرای رساله شدند، تقدیر و تشکر می‌گردد. ضمناً تمامی هزینه‌های رساله به‌صورت شخصی بوده و هیچ سازمانی حمایت مالی نکرده است.

منابع

1. Abeyrathna P., Su Y., 2015. The critical role of Akt in cardiovascular function. *Vascular Pharmacology*, 74: 38-48

2. Bodine S.C., 2006 .mTOR signaling and the molecular adaptation to resistance exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 38(11): 1950-1957.

3. Brook M.S., Wilkinson D.J., Mitchell W.K., Lund J.N., Szewczyk N.J., Greenhaff PL., 2015, Skeletal muscle hypertrophy adaptations predominate in the early stages of resistance exercise training, matching deuterium oxide-derived measures of muscle protein synthesis and mechanistic target of rapamycin complex 1 signaling. *The FASEB Journal*, 29(11): 4485-4496.

4. Ci Y., Shi K., An J., Yang Y., Hui K., Wu P., 2014. ROS inhibit autophagy by downregulating ULK1 mediated by the phosphorylation of p53 in selenite-treated NB4 cells. *Cell Death and Disease*, 5(11): e1542.

5. Dieli-Conwright C.M., Kiwata J.L., Tuzon C.T., Spektor T.M., Sattler F.R., Rice J.C., 2016. Acute Response of PGC-1alpha and IGF-1 Isoforms to Maximal Eccentric Exercise in Skeletal Muscle of Postmenopausal Women. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 30(4): 1161-1170.

6. Gunadi JW., Tarawan VM., Setiawan I., Goenawan H., Ratnawati H., Limyati Y., 2020. Adaptation of aerobic training essentially involved autophagy, mitochondrial marker and muscle fibre genetic modulation in rat cardiac muscles, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 104(6): 1938-1947.

7. Hoffman N.J., Parker B.L., Chaudhuri R., Fisher-Wellman K.H., Kleinert M., Humphrey S.J., 2015. Global Phosphoproteomic Analysis of Human Skeletal Muscle Reveals a Network of Exercise-Regulated Kinases and AMPK Substrates. *Cell Metabolism*, 22(5): 922-935.

8. Huang C.J., Rodriguez A.L., Visavadiya N.P., Fico B.G., Slusher A.L., Ferrandi P.J., 2019. An exploratory investigation of apoptotic and autophagic responses in peripheral blood mononuclear cells following maximal aerobic exercise in obese individuals, *Archives of Physiology and Biochemistry*, 28: 1-8.

9. Kwon I., Jang Y., Cho J.Y., Jang Y.C., Lee Y., 2018. Long-term resistance exercise-induced muscular hypertrophy is associated with autophagy modulation in rats. *The Journal of Physiological Sciences*, 68(3): 269-280.

10. Luciano T.F., Marques S.O., Pieri B.L., de Souza D.R., Araujo L.V., Nesi R.T. 2017. Responses of skeletal muscle hypertrophy in Wistar rats to different resistance exercise models. *Physiological Research*, 66(2):317-323

11. Luo L., Lu A-M., Wang Y., Hong A., Chen Y., Hu J., 2013. Chronic resistance training activates autophagy and reduces apoptosis of muscle cells by modulating IGF-1 and its receptors, Akt/mTOR and Akt/FOXO3a signaling in aged rats. *Experimental Gerontology*, 48(4): 427-436

12. Mammucari C., Schiaffino S., Sandri M., 2008. Downstream of Akt: FoxO3 and mTOR in the regulation of autophagy in skeletal muscle. *Autophagy*, 4(4): 524-526.

13. Ma Z, Qi J., Meng S., Wen B, Zhang J., 2013. Swimming exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves microRNAs and synergistic regulation of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *European Journal of Applied Physiology*, 113(10): 2473-2486.

14. Nemati J., 2015. Effect of resistance training on mTOR and P70S6K Signaling pathway in skeletal muscle of rats. *Journal of Sport Physiology and Physical Activity*, 8(1): 1149-1156.

15. Ogasawara R., Kobayashi K., Tsutaki A, Lee K., Abe T., Fujita S., 2013. mTOR signaling response to resistance exercise is altered by chronic resistance training and detraining in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 114(7): 934-940.

16. O'Hara MH., Karasic TB., Vasilevskaya I., Redlinger M., Loaiza-Bonilla A., Teitelbaum UR., 2017. Phase II trial of the autophagy inhibitor hydroxychloroquine with FOLFOX and bevacizumab in front line treatment of metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 35(15): 3545-3545.

17. Rademaker G., Hennequière V., Peixoto P., Bellahcene A., Castronovo V., Peulen O., 2017. Myoferlin, a new autophagy player in pancreatic cancer cells. Scientific Congresses and Symposiums, http://hdl.handle.net/2268/211492.

18. Spangenburg E.E., Le Roith D., Ward C.W., Bodine S.C., 2008. A functional insulin-like growth factor receptor is not necessary for load-induced skeletal muscle hypertrophy. *The Journal of physiology*, 586(1): 283-291.

19. Thoreen CC., Kang SA., Chang JW., Liu Q., Zhang J., Gao Y., 2009. An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *Journal of Biological Chemistry*, 284(12): 8023-8032.

20. Watson K., Baar K., 2014 .mTOR and the health benefits of exercise. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 36:130-139.

21. Weng T.P., Huang S.C., Chuang Y.F., Wang J.S., 2013. Effects of interval and continuous exercise training on CD4 lymphocyte apoptotic and autophagic responses to hypoxic stress in sedentary men. *PLoS One*, 8(11): e80248.

22. Yoeli-Lerner M., Toker A., 2006. Akt/PKB signaling in cance,a function in cell motility and invasion. *Cell Cycle*, 5(6): 603-605.