

The effect of high intensity interval training on skeletal muscle autophagy biomarkers in male elderly rats

Saghar Delshad, Ali Yaghoubi*, Najme Rezaeian

Department of Physical Education and Sport Science, Bojnourd Branch, Islamic Azad University, Bojnourd, Iran

* Corresponding author e-mail: Yaghoubiali65@gmail.com

Citation: Delshad S, Yaghoubi A, Rezaeian. The effect of high intensity interval training on skeletal muscle autophagy biomarkers in male elderly rats. *Daneshvar Medicine* 2021; 28(6):37-48.
doi: [10.22070/DANESHMED.2021.12940.0](https://doi.org/10.22070/DANESHMED.2021.12940.0)

Abstract

Background and Objective: Autophagy plays an important role in the aging process. Exercise is known to be one of the most important modulators of aging; however, the effects of high-intensity interval training (HIIT) on autophagy are not well known. Therefore, this study aimed to investigate the effect of HIIT on protein levels of sestrin 2, AMPK, beclin1 and ULK1 in skeletal muscle of elderly rats.

Materials and Methods: Twenty-old male Wistar rats (18 months) were randomly divided into experimental and control groups. After estimating the maximum speed, rats in the experimental group participated in 8 weeks of high-intensity interval training of running on the treadmill (5-8 sets of running for 2 minutes at an intensity of 80-100 VO₂Max with rest intervals of running for 2 minutes at an intensity of 50 VO₂Max) five sessions per week. Skeletal muscle tissue samples were extracted 48 hours after the last training session to measure protein levels of factors assessed. An independent t-test was used to analyze the data and P<0.05 was considered significant.

Results: HIIT resulted in a significant increase in protein levels of sestrin 2 (P=0.01), p-AMPK (P=0.005), beclin1 (P=0.001), and ULK1 (P=0.03) in the experimental group compared to control one.

Conclusion: It seems that HIIT can play a regulatory role in autophagy through the sestrin 2 / AMPK pathway and modulate subsequent progression of changes associated with aging in the skeletal muscle of elderly rats.

Keywords: High Intensity, Interval training, Autophagy, Sestrin 2, Elderly rat

Received: 05 Dec 2020
Last revised: 13 Feb 2021
Accepted: 28 Feb 2021

تأثیر تمرین تناوبی شدید بر بیومارکرهای اتوفاژی عضله اسکلتی در موش های نر سالمند

نویسندگان: ساغر دلشاد، علی یعقوبی*، نجمه رضائیان

گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد بجنورد، دانشگاه آزاد اسلامی، بجنورد، ایران

Email: yaghoubiali65@gmail.com

*نویسنده مسئول: علی یعقوبی

چکیده

مقدمه و هدف: اتوفاژی نقش مهمی در فرایند سالمندی ایفا می کند. تمرینات ورزشی به عنوان یکی از مهم ترین تعدیل کننده های سالمندی شناخته شده اند، با این حال آثار تمرینات تناوبی شدید (HIIT) بر شاخص های اتوفاژی کمتر شناخته شده است. از این رو، هدف پژوهش حاضر بررسی اثر HIIT بر مقادیر پروتئینی سیسترین ۲، AMPK، beclin1 و ULK1 در عضله اسکلتی موش های نر سالمند بود.

مواد و روش ها: ۲۰ سر موش نر سالمند نژاد ویستار (۱۸ ماهه) به طور تصادفی به دو گروه تجربی و کنترل تقسیم شدند. پس از برآورد حداکثر سرعت، موش ها در گروه تجربی در هشت هفته تمرینات تناوبی شدید دویدن روی تردمیل (۸-۵ مرحله فعالیت ۲ دقیقه ای با شدت معادل ۸۰ تا ۱۰۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه و با دوره های استراحتی فعال ۲ دقیقه ای با شدت معادل ۵۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه)، ۵ جلسه در هفته شرکت کردند. نمونه های بافت عضله دوقلو جهت اندازه گیری سطوح پروتئینی شاخص های مورد بررسی ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین استخراج شد. جهت تجزیه و تحلیل داده ها از آزمون تی مستقل در سطح معنی دار $P < 0.05$ استفاده شد.

نتایج: نتایج حاصل از آزمون تی مستقل نشان داد که اجرای هشت هفته HIIT با افزایش معنی دار مقادیر پروتئینی سیسترین ۲ ($P=0.01$)، AMPK فسفریله ($P=0.005$)، beclin1 ($P=0.001$) و ULK1 ($P=0.03$) در گروه HIIT در مقایسه با گروه کنترل همراه بود.

نتیجه گیری: به نظر می رسد HIIT می تواند به واسطه تأثیر بر مسیر سیسترین-۲/AMPK، نقش تنظیمی در اتوفاژی داشته باشد و پیشرفت تغییرات همراه با سالمندی در عضله اسکلتی موش های سالمند را تعدیل کند.

واژه های کلیدی: تمرینات تناوبی شدید، اتوفاژی، سیسترین ۲، موش سالمند

مقاله پژوهشی

دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۱۵
آخرین اصلاح ها: ۱۳۹۹/۱۱/۲۵
پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۱۰

مقدمه

سالمندی با کاهش پیشرونده توده عضله اسکلتی^۱ (سارکوپنی) و افزایش توده چربی بدن همراه بوده (۱، ۲) و نقص در سیگنالی اتوفاژی^۲ به عنوان یکی از مهم‌ترین نشان‌گرهای سارکوپنی معرفی شده است (۳). در دوران جوانی و قبل از سالمندی، مسیرهای سیگنالی اتوفاژی فعال هستند و با فعال کردن دیگر مسیرهای سیگنالی از قبیل فسفاتیدیل اینوزیتول ۳ کیناز^۳ (PI3K)، میوستاتین، پروتازوم و مسیرهای اتوفاژی- لیزوزوم اجازه نمی‌دهند آتروفی عضلانی رخ دهد (۴)؛ اما طی سالمندی، عملکرد تخریبی اتوفاژی کاهش یافته و با افزایش انباشت پروتئین‌ها و میتوکندری‌های فاسد شده و افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن^۴ (ROS) (۵) منجر به توسعه سارکوپنی و اختلالات مرتبط با سالمندی می‌شود (۶) (۱۴). اتوفاژی تحت تأثیر مسیرهای سیگنالی مختلف تنظیم می‌شود. آبتشار سیگنالی وابسته به سیستمی یکی از مهم‌ترین این مسیرهاست که می‌تواند اتوفاژی و متعاقباً سارکوپنی را تحت تأثیر قرار دهد (۷).

سیسترین، از خانواده پروتئین‌های پاسخگو به استرس^۵ بوده و سه ایزوفرم دارد؛ سیسترین ۱، ۲ و ۳ (۷). سیسترین‌ها، به‌واسطه کاهش استرس اکسایشی، تحریک اتوفاژی و تنظیم پروتئین کیناز وابسته به AMP^۶ (AMPK) و محور کمپلکس هدف راپامایسین در پستانداران^۷ (MTOR-1) نقشی مهم در کنترل فرایند سالمندی ایفا می‌کنند (۷، ۸). به‌طوری‌که کاهش ژنتیکی سیسترین بروز و پیشرفت اختلالات پاتولوژیک مرتبط با افزایش سن از قبیل اختلالات قلبی، مقاومت به انسولین، تومورزایی، آسیب به میتوکندری و تحلیل عضلانی را تسریع می‌کند (۹، ۱۰). در مقابل، سیسترین می‌تواند از طریق مهار تسهیل‌کننده‌های

پیری، عملکرد ضد پیری ایفا کند (۸). از جمله، سیستمی-۲ قادر است به واسطه ارتباط فیزیکی که با پروتئین‌های اتوفاژی شامل beclin1 و کیناز فعال‌کننده اتوفاژی-۱ شبه 52^۸ Unc^۸ (ULK1) دارد (۱۱-۱۴) در گسترش عملکرد اتوفاژی نقش داشته می‌باشد (۱۳، ۱۴). یک رویداد اصلی مهم در اتوفاژی، تشکیل اتوفاگوزوم است. این مرحله توسط ULK1 و به واسطه تشکیل کمپلکس با سه پروتئین دیگر شامل پروتئین تعامل‌کننده با خانواده کینازهای چسبان مرکزی با وزن ۲۰۰ کیلودالتون^۹ (FIP200)، پروتئین وابسته به اتوفاژی^{۱۰} (AGT13) و ۱۰۱ (ATG101)، انجام می‌شود (۱۵). علاوه بر ULK1، پروتئین beclin1 دیگر تنظیم‌کننده اصلی اتوفاژی است که با تشکیل ساختار دو غشایی اتوفاگوزوم در شروع اتوفاژی نقش دارد (۱۶).

بنابراین، شاید به کمک مداخله‌های درمانی مؤثر بر سارکوپنی همچون فعالیت بدنی و ورزش بتوان بر مسیر پیام‌دهی سیستمی ۲-AMPK-beclin1-ULK1 اثر گذاشت و با بهبود اختلال در عملکرد اتوفاژی، بروز سارکوپنی را به تعویق انداخت. اگرچه هنوز رابطه فعالیت ورزشی و سیستمی به وضوح درک نشده است؛ این احتمال وجود دارد تمرینات ورزشی با تأثیر بر مسیر سیگنالی سیستمی ۲، AMPK و ULK1 بر اتوفاژی اثر تنظیمی داشته باشد. چراکه، سازگاری‌های متابولیکی به دنبال تمرینات ورزشی می‌توانند به‌واسطه فعال‌سازی AMPK به عنوان کیناز بالادست برای ULK1 (۱۷، ۱۸) مسیر سیگنالی AMPK-α/ULK1 را نیز به راه انداخته و سبب فعال شدن اتوفاژی در عضلات اسکلتی شوند (۱۷). افزایش در مارکرهای اتوفاژی از جمله beclin2 و ULK1 پس از تمرینات ورزشی گزارش شده است (۱۹-۲۱)، اگرچه مطالعات دیگر نیز عدم اثرگذاری یا کاهش این

^۸ Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1 (ULK1)

^۹ Focal Adhesion Kinase Family Interacting Protein of 200 kDa (FIP200)

^{۱۰} Autophagy-Related Protein (ATG)

^۱ Sarcopenia

^۲ Autophagy

^۳ Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K)

^۴ Reactive Oxygen Species (ROS)

^۵ Stress-Inducible Protein

^۶ AMP-Activated Protein Kinase (AMPK)

^۷ Mammalian Target of Rapamycin (MTOR)

حیوانی مطابق با دستورالعمل‌های اخلاقی مؤسسات ملی برای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد بجنورد (با کد IR.IAU.BOJNOURD.REC.1398.010) انجام شد.

پروتکل تمرین تناوبی شدید (HIIT)

پروتکل HIIT به مدت هشت هفته و ۵ جلسه در هفته بر روی نوارگردان (شیب صفر درجه) اجرا شد. این پروتکل، شامل اجرای ۸-۵ مرحله فعالیت ۲ دقیقه‌ای با شدت معادل ۸۰ تا ۱۰۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه و با دوره‌های استراحتی فعال ۲ دقیقه‌ای با شدت معادل ۵۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه بود. بر این اساس، سرعت دویدن در هفته اول از ۲۲ متر بر دقیقه به ۳۱ متر بر دقیقه در دو هفته پایانی رسید. همچنین، تعداد تکرار تناوب در هفته اول از ۵ تکرار به ۸ تکرار در هفته چهارم رسید و در ادامه نیز با ۸ تکرار اجرا شد. همچنین، ۱۰ دقیقه گرم کردن و ۵ دقیقه سرد کردن با شدت پایین در قبل و بعد از هر جلسه تمرینی در نظر گرفته شد (۲۹-۳۱).

وسترن بلات

برای اندازه‌گیری مقادیر پروتئینی ULK1، beclin1، AMPK فسفریله و سیسترین ۲ از روش وسترن بلات استفاده شد. برای استخراج پروتئین‌های عضله دوقلو از بافر سنجش رسوب رادیو ایمنی^۲ (RIPA) حاوی ۰/۰۵ میلی مولار بافر تریس (pH برابر ۸)، ۱۵۰ میلی کلرید سدیم، ۰/۱ درصد اتیلن گلیکول تترا اسید استیک^۳ (EGTA)، یک درصد SDS به اضافه ۰/۱ درصد آنتی پروتئاز کوکتیل^۴ (ROCHE) استفاده شد. به این ترتیب که ۱۰۰ میلی‌گرم بافت در ۵۰۰ میکرو لیتر بافر حاوی آنتی پروتئاز توسط یک هموژنایزر دستی هموژن شد و نیم ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد گذاشته شدند و سپس دریک سانتی‌فویژ یخچال دار (bo, sw14rfroil) در دور ۱۲۰۰۰ و ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ دقیقه

مارکرها را پس از تمرینات ورزشی را نشان داده اند (۲۲). با این حال، از آنجا که آثار تمرینات ورزشی به مؤلفه‌های تمرین و به ویژه شدت فعالیت ورزشی مرتبط است؛ در سال‌های اخیر تمرینات تناوبی شدید^۱ (HIIT) بیشتر مورد توجه محققان علوم ورزشی قرار گرفته است. HIIT علاوه بر آثار متابولیکی، بر مسیرهای درگیر در سیستم اتوفازی نیز اثر دارد (۲۳-۲۷). از این‌رو، پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر هشت هفته تمرینات تناوبی شدید بر سطح پروتئین‌های سیسترین ۲، AMPK، beclin2 و ULK1 در عضله اسکلتی موش‌های نر سالمند انجام شد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربی با طرح پس‌آزمون به همراه گروه کنترل بود. بدین منظور، ۲۰ سر موش سالمند نر نژاد ویستار [۱۸ ماهه (۲۸)] از آزمایشگاه حیوانی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت خریداری شد و مطابق با خط‌مشی انجمن ایرانیان حمایت از حیوانات آزمایشگاهی در قفس‌های ۴ تایی و تحت شرایط استاندارد (چرخه ۱۲ ساعته روشنایی - تاریکی، دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد) با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. پس از یک هفته آشنایی و سازگاری با محیط جدید، موش‌های نر سالمند به‌طور تصادفی به دو گروه تمرین تناوبی شدید (HIIT) و کنترل با تعداد برابر در هر گروه (۱۰ سر) تقسیم شدند. در ادامه، موش‌های نر سالمند در گروه HIIT با راه رفتن و دویدن بر روی نوار گردان آشنا شدند. پس از یک هفته آشنا سازی، حداکثر سرعت دویدن با استفاده از آزمون عملکرد ورزشی مدرج برآورد شد. آنگاه، موش‌های گروه تجربی در هشت هفته تمرینات تناوبی شدید دویدن روی نوار گردان شرکت کردند. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و پس از ناشتایی شبانه، تمامی موش‌های بی‌هوش شده و بافت‌برداری از عضله دوقلو صورت گرفت. لازم به ذکر است تمامی موش‌های در طول مداخله رژیم غذایی استاندارد را مصرف کردند. تمامی مداخلات

2 Radioimmunoprecipitation Assay Buffer (RIPA Buffer)

3 Ethylene Glycol Tetra Acetic Acid (EGTA)

4 Protease Inhibitor Cocktail

1 High Intensity Interval Training (HIIT)

SESN2 (41-K): sc-، (Thr 172): sc-33524
 m-IgGκBP-، β-Actin (C4): sc-47778، 101249
 mouse anti-rabbit IgG- و HRP: sc-516102
 Santa Cruz از شرکت HRP: sc-2357
 Biotechnology, Inc مورد استفاده قرار گرفتند.

روش آمارگیری

از آزمون شاپیروولیک جهت بررسی توزیع طبیعی داده ها استفاده شد. جهت تعیین معنی دار بودن تفاوت میانگین پس آزمون متغیرها بین گروه های تحقیق، از آزمون تی مستقل استفاده گردید. اطلاعات مورد نیاز پس از جمع آوری، توسط نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ در سطح معنی داری $P \leq 0/05$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

در این بخش اطلاعات توصیفی مربوط به وزن موش ها در ابتدا و انتهای دوره پژوهش ارائه شده است. جهت اطمینان از همگن بودن گروه ها از نظر وزن در پیش آزمون از آزمون تی مستقل استفاده شد که نتایج آن در یک ستون در جدول ۱ قرار داده شده است.

سانتریفوژ شد. مایع رویی جمع آوری شده و غلظت پروتئین آن با کیت تعیین کننده پروتئین (Bio-Rad) در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه گیری و در نهایت در دمای ۲۰ درجه زیر صفر در فریزر نگهداری شد. سپس، هموژن به دست آمده به نسبت ۱:۱ با نمونه لودینگ بافر (۵۰mM) تریس-کلرید هیدروژن، ۲ درصد سدیم دو سیل سولفات، ۱۰ درصد گلیسرول، ۵ درصد بتا- مرکاپتواتانول و ۰/۰۰۵ درصد برموفنول آبی) مخلوط گردید. آنگاه، نمونه ها به مدت ۵ دقیقه جوشانده شد تا تمام پروتئین ها کاملاً دناتوره شوند. پروتئین ها با استفاده از الکتروفورز ژل SDS- polyacrylamide جدا شده و به غشای نیترو سلولز منتقل شدند. غشا به مدت ۱ ساعت در ۵ درصد BSA Tween 20 و Tris-Buffered Saline و ۰/۱ درصد (TBST) مسدود شد و در آنتی بادی اولیه (۱:۵۰۰) انکوبه شد. انکوباسیون در آنتی بادی ثانویه روز بعد به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق در ۴ درصد TBST انجام شد. پروتئین ها با یک واکنش شیمیایی لومینسانس (ECL) و با تجزیه و تحلیل densitometry با نرم افزار Image J اندازه گیری شدند. آنتی بادی های اولیه و ثانویه ULK1 (F- BECN1 (E-8): sc-48341، 4): sc-390904، AMPKα1/2 (D-6): sc-74461، p-AMPKα1/2

جدول ۱. مقایسه وزن آزمودنی ها در پیش آزمون و پس آزمون گروه های تحقیق

| گروه ها | | پیش آزمون | پس آزمون |
|-----------|--|--------------|--------------|
| | | | |
| HIIT | | ۳۶۹/۷۳±۳۸/۹۴ | ۳۵۹/۶۶±۶۸/۸۸ |
| کنترل | | ۳۷۳/۵۸±۴۱/۸۳ | ۳۸۱/۹۰±۵۹/۹۱ |
| معنی داری | | ۰/۸۲۴ | ۰/۰۷۶ |

مربوط به سطوح پروتئینی AMPK فسفریله، سیسترین ۲، beclin2 و ULK1 در گروه های HIIT و کنترل در جدول ۲ ارائه شده است.

تعداد نمونه ها در تمام گروه ها ۱۰ سر بود که در طی دوره پژوهش با ریزش در گروه تمرین و کنترل همراه بود که در نهایت در هر گروه ۹ سر باقی ماندند. با عنایت به جدول فوق و سطح معنی داری گزارش شده می توان دریافت گروه ها در گروه بندی اولیه و انتهای دوره تحقیق تفاوت معناداری با یکدیگر نداشتند. اطلاعات توصیفی

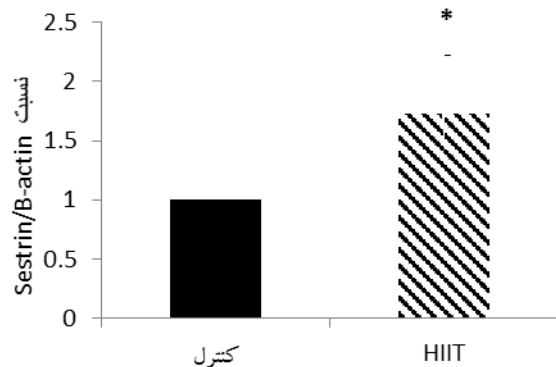
جدول ۲. اطلاعات توصیفی مربوط به متغیرهای مورد بررسی در گروه های تحقیق

| متغیر | گروه | HIIT (n=۱۰) | کنترل (n=۱۰) |
|--------------|------|-------------|--------------|
| سیستترین ۲ | | ۱/۷۳±۰/۴۹ | ۱ |
| AMPK فسفریله | | ۱/۳۶±۰/۱۸ | ۱ |
| beclin2 | | ۲/۰۶±۰/۲۷ | ۱ |
| ULK1 | | ۱/۴۹±۰/۴۱ | ۱ |

به منظور مقایسه سطح شاخص های تحقیق در گروه های HIIT و کنترل از آزمون تی مستقل استفاده شد و نتایج زیر را به همراه داشت:

سطوح پروتئینی سیستترین ۲ عضله دوقلو گروه های تحقیق

بر اساس نتایج حاصل از آزمون تی مستقل، سطوح پروتئینی سیستترین ۲ عضله دوقلو در گروه HIIT به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل بالاتر بود ($t=۳/۶۲$) و $(P=۰/۰۱)$ ؛ به عبارت دیگر، هشت هفته HIIT بر سطوح پروتئینی سیستترین ۲ عضله دوقلوی موش های سالمند، تأثیر معنی دار داشته است. سطوح پروتئینی سیستترین ۲ گروه های تحقیق، در نمودار ۱ ارائه شده است.

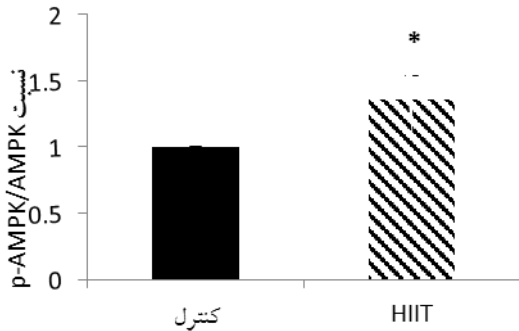


نمودار ۱. مقایسه سطوح پروتئینی سیستترین ۲ عضله دوقلو. اجرای پروتکل HIIT به مدت هشت هفته، افزایش سطوح پروتئینی سیستترین ۲ در عضله دوقلو موش های سالمند را به همراه داشت. *نشانه تفاوت معنی دار نسبت به گروه کنترل در سطح $P<۰/۰۵$

سطوح پروتئینی AMPK عضله دوقلو گروه های تحقیق

بر اساس نتایج حاصل از آزمون تی مستقل، سطوح پروتئینی AMPK عضله دوقلو در گروه HIIT به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل بالاتر بود ($t=۴/۷۹$) و

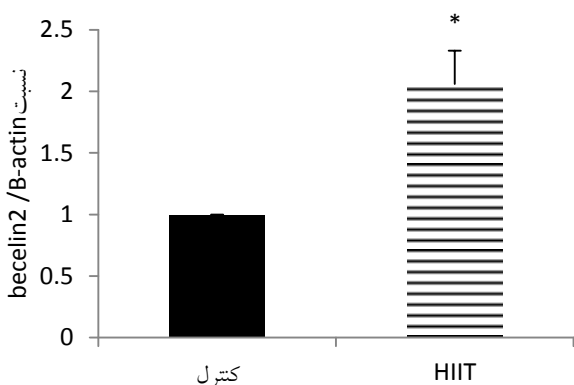
$(P=۰/۰۰۵)$ ؛ به عبارت دیگر، هشت هفته HIIT بر سطوح پروتئینی AMPK عضله دوقلو موش های سالمند تأثیر معنی دار داشته است. سطوح پروتئینی AMPK گروه های تحقیق، در نمودار ۲ ارائه شده است.



نمودار ۲. مقایسه سطوح پروتئینی AMPK عضله دوقلو. اجرای پروتکل HIIT به مدت هشت هفته، افزایش سطوح پروتئینی AMPK در عضله دوقلو موش های سالمند را به همراه داشت. *نشانه تفاوت معنی دار نسبت به گروه کنترل در سطح $P<۰/۰۵$

سطوح پروتئینی Becelin2 عضله دوقلو گروه های تحقیق

بر اساس نتایج حاصل از آزمون تی مستقل، سطوح پروتئینی beclin2 عضله دوقلو در گروه HIIT به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل بالاتر بود ($t=۹/۶۵$) و $(P=۰/۰۰۱)$ ؛ به عبارت دیگر، هشت هفته HIIT بر سطوح پروتئینی beclin2 عضله دوقلوی موش های سالمند تأثیر معنی دار داشته است. سطوح پروتئینی beclin2 گروه های تحقیق، در نمودار ۳ ارائه شده است.



نمودار ۳. مقایسه سطوح پروتئینی beclin2 عضله دوقلو در گروه های تحقیق. اجرای پروتکل HIIT به مدت هشت هفته، افزایش سطوح پروتئینی beclin2 در عضله دوقلو موش های سالمند را به همراه داشت. *نشانه تفاوت معنی دار نسبت به گروه کنترل در سطح $P<۰/۰۵$

سیسترن ۲ پس از تمرینات ورزشی به وضوح شناسایی نشده است؛ تمرین ورزشی در الگوی وابسته به شدت تمرین منجر به افزایش استرس درون سلولی می‌شود؛ بنابراین، در مطالعه حاضر، این احتمال وجود دارد تمرینات ورزشی، به عنوان شرایط استرس زا، با فعال کردن عوامل تنظیم کنندهٔ بالا دست سیسترن از قبیل جانوز کیناز^۱ (JNK) و فاکتور رونویسی جعبه سرچنگالی FOXO^۲ (۳۴) موجبات افزایش سیسترن-۲ را فراهم آورده باشد (۳۵). علاوه بر این، تمرینات ورزشی از طریق افزایش نسبت AMP به ATP منجر به فعال سازی AMPK می‌شود. افزایش فسفوریلاسیون AMPK در بسیاری از مطالعات ورزشی در بافت های مختلف از جمله عضله اسکلتی و بافت چربی گزارش شده است (۳۶-۳۹). افزایش AMPK خود دیگر عامل مؤثر در تنظیم افزایشی سیسترن ۲ است. در همین راستا، وانگ و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند اجرای تمرینات ورزشی به واسطه افزایش AMPK سبب افزایش بیان ژنی سیسترن ۲ گردید (۴۰)؛ بنابراین، با توجه به یافته های مطالعه حاضر مبنی بر افزایش معنی دار سطح پروتئینی AMPK، چنین به نظر می‌رسد افزایش سیسترن ۲ به دنبال تمرینات تناوبی شدید احتمالاً ناشی تنظیم افزایشی عوامل بالا دستی آن در شدت های بالا تمرین ورزشی باشد. البته، نه تنها AMPK بر سیسترن ۲ اثر تنظیمی دارد؛ بلکه، سیسترن ۲ نیز بر AMPK اثر دارد. از یک سو، سیسترن ۲ با تأثیر بر کمپلکس دو هدف راپامایسین^۳ (TORC2) منجر به فعال سازی Akt و متعاقباً AMPK- $\alpha 1$ و AMPK- $\alpha 2$ می‌شود (۱۰، ۴۱)؛ و از سوی دیگر، فعال سازی سیسترن ۲ می‌تواند از طریق هر دو مکانیسم رونویسی و پس رونویسی منجر به تنظیم افزایشی PGC- α شود (۴۲-۴۵). علاوه بر این، معمولاً رونویسی سیسترن ۲ به دنبال کسر انرژی ناشی از هیپوکسی طولانی مدت نیز افزایش می‌یابد

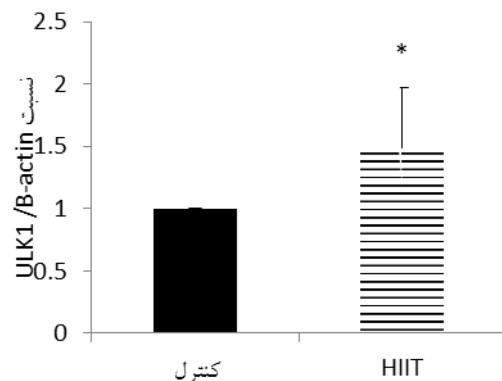
¹ C-Jun N-Terminal Kinase (JNK)

² Fork Head Box O (FOXO)

³ Target of Rapamycin Complex 2 (TORC2)

سطوح پروتئینی ULK1 عضله دوقلو گروه های تحقیق

بر اساس نتایج حاصل از آزمون تی مستقل، سطوح پروتئینی ULK1 عضله دوقلو در گروه HIIT به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل بالاتر بود ($t=2/87$ و $P=0/03$)؛ به عبارت دیگر، هشت هفته HIIT بر سطوح پروتئینی ULK1 عضله دوقلوی موش های سالمند تأثیر معنی دار داشته است. سطوح پروتئینی ULK1 گروه های تحقیق، در نمودار ۴ ارائه شده است.



نمودار ۴. مقایسه سطوح پروتئینی ULK1 عضله دوقلو در گروه های تحقیق. اجرای پروتکل HIIT به مدت هشت هفته، افزایش سطوح پروتئینی ULK1 در عضله دوقلو موش های سالمند را به همراه داشت. *نشانه تفاوت معنی دار نسبت به گروه کنترل در سطح $P<0/05$

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد اجرای هشت هفته تمرینات تناوبی شدید سبب افزایش معنی دار پروتئین های سیسترن ۲، AMPK، ULK1 و beclin1 در عضله دوقلو موش های نر سالمند گردید. نتایج مطالعه لنهاره و همکاران (۲۰۱۷) مبنی بر افزایش مقادیر پروتئینی سیسترن ۲ پس از ۱۲ هفته تمرینات مقاومتی در عضله اسکلتی موش های سالمند (۳۲) با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد. هم-چنین، استولز و همکاران (۲۰۱۴) نیز بر افزایش بیان سیسترن ۲ به دنبال تمرینات ورزشی منظم در موش های چاق و سالم اذعان داشتند. سیسترن ها پروتئین هایی هستند که در شرایط استرس بیان شده و ضمن پیشگیری از بروز آسیب سلولی (۳۳)، هموستاز متابولیکی را نیز حفظ می کنند (۱۰). اگرچه سازوکار میانجی در افزایش

تا اتوفاژی سالمندی را با کمک تمرینات ورزشی همچون تمرینات ورزشی تناوبی شدید بهبود بخشند. البته، به دلیل برخی محدودیت‌ها از قبیل عدم اندازه‌گیری شاخص‌های تنظیم‌گر اجزای مختلف این مسیر پیام‌دهی توجیه قطعی تغییرات کمی سخت است و لزوم تحقیقات بیشتر ضروری به نظر می‌رسد.

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد اجرای هشت هفته تمرینات تناوبی شدید با افزایش معنی‌دار پروتئین‌های سیسترین ۲، AMPK، beclin1 و ULK1 در بهبود عوامل درگیر در پیشبرد سارکوپنی همراه با سالمندی نقش داشته باشد.

ملاحظات اخلاقی

مطالعه حاضر مورد تأیید کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بجنورد با کد IR.IAU.BOJNOURD.REC.1398.010 قرار گرفت.

حامی مالی:

مقاله حاضر مستخرج از رساله دکتری تخصصی دانشگاه آزاد اسلامی - واحد بجنورد می‌باشد.

مشارکت نویسندگان

تمامی نویسندگان در طراحی، اجرا و نگارش مقاله حاضر مشارکت داشتند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله محققین مراتب تشکر و قدردانی را از کلیه عزیزانی که در مراحل مختلف اجرای پژوهش همکاری و مساعدت داشتند، اعلام می‌دارند.

تضاد منافع

هیچ نوع تضاد منافی وجود ندارد.

(۷) که خود دیگر عامل مؤثر در افزایش AMPK در شرایط کسر انرژی است؛ بنابراین، فعال سازی مسیر سینگنالینگ سیسترین ۲ / AMPK می‌تواند یکی از عوامل مؤثر در تحریک اتوفاژی پس از تمرینات تناوبی شدید در مطالعه حاضر باشد. به طوری که اجرای هشت هفته HIIT با افزایش معنی‌دار پروتئین‌های beclin1 و ULK1 نیز همراه بود. AMPK نه تنها به واسطه فسفریله کردن beclin1 در تیروزین ۳۸۸ اتوفاژی را تنظیم می‌کند (۴۶)؛ بلکه، با فسفریله کردن ULK^{Ser317} و ULK^{Ser555} بر فعالیت ULK1 نیز اثر تنظیمی دارد (۲۰). لازم به ذکر است beclin1 نیز می‌تواند فعالیت AMPK عضلانی به دنبال فعالیت ورزشی را به کمک مولکول‌های سنجش ایمنی ذاتی بدن تنظیم کند. در عضله اسکلتی، beclin1 به طور مستقیم با گیرنده ناقوسی شکل ۹ (TLR9) بر هم کنش می‌دهد. TLR9 یکی از اعضای خانواده گیرنده‌های ناقوسی شکل (TLR) و یکی از گیرنده‌های مهم در دستگاه ایمنی است که در سلول‌های غیر ایمنی عملکرد فیزیولوژیک دارد. برهم‌کنش TLR9/beclin1 در شرایط استرس ناشی از کسر انرژی مانند کسر گلوکز بیش تنظیمی می‌شود؛ بنابراین، تمرینات ورزشی با ایجاد شرایط کسر انرژی و گلوکز برهم‌کنش TLR9/beclin1 را افزایش داده و AMPK را فعال می‌کند (۴۷). البته، تمرینات ورزشی با فعال کردن پیام‌دهی AMPK/beclin1 پروتئین کیناز وابسته به کالمودولین^۲ (CAMK) نیز در تنظیم اتوفاژی نقش دارد. به طوری که تمرینات ورزشی منظم بیان ژنی CAMKII α و AMPK α 1 را افزایش می‌دهد و سطح فعالیت CAMKII α و AMPK α 1 فسفریله شده سبب افزایش بیان ژنی شاخص‌های اتوفاژی همچون beclin1 می‌گردد (۴۸).

در مجموع چنین به نظر می‌رسد بر هم‌کنش بین اجزای مختلف تشکیل دهنده مسیر پیام‌دهی سیسترین ۲ - AMPK - beclin1 - ULK1 دست به دست هم می‌دهند

¹ Toll-Like-Receptor 9 (Tlr9)

² Calmodulin-Dependent Protein Kinases (CAMK)

منابع

1. Candow DG, Chilibeck PD. Differences in size, strength, and power of upper and lower body muscle groups in young and older men. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 2005;60(2):148-56. doi: 10.1093/gerona/60.2.148.
2. Lauretani F, Russo CR, Bandinelli S, Bartali B, Cavazzini C, Di Iorio A, et al. Age-associated changes in skeletal muscles and their effect on mobility: an operational diagnosis of sarcopenia. *Journal of Applied Physiology* 2003;95(5):1851-60. doi: 10.1152/jappphysiol.00246.2003.
3. Zhou J, Freeman TA, Ahmad F, Shang X, Mangano E, Gao E, et al. GSK-3 α is a central regulator of age-related pathologies in mice. *The Journal of Clinical Investigation* 2013;123(4):1821-32. doi: 10.1172/JCI64398.
4. Bonaldo P, Sandri M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Disease Models & Mechanisms* 2013;6(1):25-39. doi: 10.1242/dmm.010389.
5. Terman A, Brunk UT. Oxidative stress, accumulation of biological 'garbage', and aging. *Antioxidants & Redox Signaling* 2006;8(1-2):197-204. doi: 10.1089/ars.2006.8.197.
6. Jiao J, Demontis F. Skeletal muscle autophagy and its role in sarcopenia and organismal aging. *Current Opinion in Pharmacology* 2017;34:1-6. doi: 10.1016/j.coph.2017.03.009
7. Lee JH, Budanov AV, Karin M. Sestrins orchestrate cellular metabolism to attenuate aging. *Cell Metabolism* 2013;18(6):792-801. doi: 10.1016/j.cmet.2013.08.018.
8. Segalés J, Perdiguero E, Serrano AL, Sousa-Victor P, Ortet L, Jardí M, et al. Sestrin prevents atrophy of disused and aging muscles by integrating anabolic and catabolic signals. *Nature Communications* 2020;11(1):189. doi: 10.1038/s41467-019-13832-9.
9. Bae SH, Sung SH, Oh SY, Lim JM, Lee SK, Park YN, et al. Sestrins activate Nrf2 by promoting p62-dependent autophagic degradation of Keap1 and prevent oxidative liver damage. *Cell Metabolism* 2013;17(1):73-84. doi: 10.1038/s41467-019-13832-9..
10. Lee JH, Budanov AV, Talukdar S, Park EJ, Park HL, Park H-W, et al. Maintenance of metabolic homeostasis by Sestrin2 and Sestrin3. *Cell Metabolism*. 2012;16(3):311-21. doi: 10.1016/j.cmet.2012.08.004.
11. Pilli M, Arko-Mensah J, Ponpuak M, Roberts E, Master S, Mandell MA, et al. TBK-1 promotes autophagy-mediated antimicrobial defense by controlling autophagosome maturation. *Immunity*. 2012;37(2):223-34. doi: 10.1016/j.immuni.2012.04.015.
12. Ichimura Y, Waguri S, Sou Y-s, Kageyama S, Hasegawa J, Ishimura R, et al. Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy. *Molecular Cell* 2013;51(5):618-31. doi: 10.1016/j.molcel.2013.08.003.
13. Ro SH, Semple IA, Park H, Park H, Park HW, Kim M, et al. Sestrin2 promotes Unc-51-like kinase 1 mediated phosphorylation of

- p62/sequestosome-1. The FEBS Journal 2014;281(17):3816-27. doi: 10.1111/febs.12905.
14. Kumar A, Shaha C. SESN2 facilitates mitophagy by helping Parkin translocation through ULK1 mediated Beclin1 phosphorylation. Scientific Reports 2018; 12;8(1):615. doi: 10.1038/s41598-017-19102-2.
 15. Lane JD, Korolchuk VI, Murray JT, Zachari M, Ganley IG. The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. Essays in Biochemistry 2017;61(6):585-96. doi: 10.1042/EBC20170021.
 16. Xie Y, Kang R, Tang D. Role of the Beclin 1 Network in the Cross-Regulation Between Autophagy and Apoptosis 2016 In book: Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging (pp.75-88). Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-802937-4.00002-8
 17. Møller AB, Vendelbo MH, Christensen B, Clasen BF, Bak AM, Jørgensen JO, et al. Physical exercise increases autophagic signaling through ULK1 in human skeletal muscle. Journal of Applied Physiology. 2015;118(8):971-9. doi: 10.1152/jappphysiol.01116.2014.
 18. Jamart C, Francaux M, Millet GY, Deldicque L, Frère D, Féasson L. Modulation of autophagy and ubiquitin-proteasome pathways during ultra-endurance running. Journal of Applied Physiology. 2012;112(9):1529-37. doi: 10.1152/jappphysiol.00952.2011.
 19. Lira VA, Okutsu M, Zhang M, Greene NP, Laker RC, Breen DS, et al. Autophagy is required for exercise training-induced skeletal muscle adaptation and improvement of physical performance . The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal 2013;27(10):4184-93. doi: 10.1096/fj.13-228486.
 20. Brandt N, Gunnarsson TP, Bangsbo J, Pilegaard H. Exercise and exercise training-induced increase in autophagy markers in human skeletal muscle. Physiological reports. 2018;6(7):e13651. doi: 10.14814/phy2.13651.
 21. Ju J-s, Jeon S-i, Park J-y, Lee J-y, Lee S-c, Cho K-j, et al. Autophagy plays a role in skeletal muscle mitochondrial biogenesis in an endurance exercise-trained condition. The Journal of Physiological Sciences. 2016;66(5):417-30 doi: 10.1007/s12576-016-0440-9..
 22. Kim YA, Kim YS, Oh SL, Kim HJ, Song W. Autophagic response to exercise training in skeletal muscle with age. Journal of Physiology and Biochemistry 2013;69(4):697-705. doi: 10.1007/s13105-013-0246-7.
 23. Gibala MJ, McGee SL. Metabolic adaptations to short-term high-intensity interval training: a little pain for a lot of gain?. Exercise and Sport Sciences Reviews 2008;36(2):58-63. doi: 10.1097/JES.0b013e318168ec1f.
 24. Gibala MJ, Little JP, MacDonald MJ, Hawley JA. Physiological adaptations to low-volume, high-intensity interval training in health and disease. The Journal of Physiology 2012;590(5):1077-84. doi: 10.1113/jphysiol.2011.224725.
 25. Little JP ,Safdar A, Wilkin GP, Tarnopolsky MA, Gibala MJ. A practical model of low-volume high-intensity interval training induces mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle: potential mechanisms.

- The Journal of Physiology 2010;588(6):1011-22. doi: 10.1113/jphysiol.2009.181743.
26. Little JP, Gillen JB, Percival ME, Safdar A, Tarnopolsky MA, Punthakee Z, et al. Low-volume high-intensity interval training reduces hyperglycemia and increases muscle mitochondrial capacity in patients with type 2 diabetes. *Journal of applied physiology*. 2011;111(6):1554-60. doi: 10.1152/jappphysiol.00921.2011.
 27. Weng T-P, Huang S-C, Chuang Y-F, Wang J-S. Effects of interval and continuous exercise training on CD4 lymphocyte apoptotic and autophagic responses to hypoxic stress in sedentary men. *PloS One* 2013;8(11):e80248. doi: 10.1371/journal.pone.0080248.
 28. Ziaaldini MM, Koltai E, Csende Z, Goto S, Boldogh I, Taylor AW, et al. Exercise training increases anabolic and attenuates catabolic and apoptotic processes in aged skeletal muscle of male rats. *Experimental Gerontology*. 2015;67:9-14. doi: 10.1016/j.exger.2015.04.008.
 29. Hafstad AD, Lund J, Hadler-Olsen E, Höper AC, Larsen TS, Aasum E. High-and moderate-intensity training normalizes ventricular function and mechanoenergetics in mice with diet-induced obesity. *Diabetes* 2013;62(7):2287-94. doi: 10.2337/db12-1580.
 30. Hafstad AD, Boardman NT, Lund J, Hagve M, Khalid AM, Wisløff U, et al. High intensity interval training alters substrate utilization and reduces oxygen consumption in the heart. *Journal of Applied Physiology*. 2011;111(5):1235-41. doi: 10.1152/jappphysiol.00594.2011.
 31. Azali Alamdari K, Khalafi M. The effects of high intensity interval training on serum levels of fgf21 and insulin resistance in obese men. *Iranian Journal of Diabetes and Metabolism* 2019;18(1):41-8.
 32. Lenhare L, Crisol BM, Silva VR, Katashima CK, Cordeiro AV, Pereira KD, et al. Physical exercise increases Sestrin 2 protein levels and induces autophagy in the skeletal muscle of old mice. *Experimental Gerontology* 2017;97:17-21. doi: 10.1016/j.exger.2017.07.009.
 33. Budanov AV. Stress-responsive sestrins link p53 with redox regulation and mammalian target of rapamycin signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2011; 15(6):1679-90. doi: 10.1089/ars.2010.3530.
 34. Lee JH, Budanov AV, Park EJ, Birse R, Kim TE, Perkins GA, et al. Sestrin as a feedback inhibitor of TOR that prevents age-related pathologies. *Science* 2010;327(5970):1223-8. doi: 10.1126/science.1182228.
 35. Aronson D, Boppart MD, Dufresne SD, Fielding RA, Goodyear LJ. Exercise stimulates c-Jun NH2Kinase activity and c-Jun transcriptional activity in human skeletal muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998;251(1):106-10. doi: 10.1006/bbrc.1998.9435.
 36. Lin J-Y, Kuo W-W, Baskaran R, Kuo C-H, Chen Y-A, Chen WS-T, et al. Swimming exercise stimulates IGF1/PI3K/Akt and AMPK/SIRT1/PGC1 α survival signaling to suppress apoptosis and inflammation in aging hippocampus. *Aging (Albany NY)* 2020;12(8):6852 - 6864. doi: 10.18632/aging.103046.
 37. Liu H-W, Chang S-J. Moderate exercise suppresses NF- κ B signaling

- and activates the SIRT1-AMPK-PGC1 α Axis to attenuate muscle loss in diabetic db/db mice. *Frontiers in Physiology* 2018;9:636. doi: 10.3389/fphys.2018.00636
38. Gibala MJ, McGee SL, Garnham AP, Howlett KF, Snow RJ, Hargreaves M. Brief intense interval exercise activates AMPK and p38 MAPK signaling and increases the expression of PGC-1 α in human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* 2009;106(3):929-34. doi: 10.1152/jappphysiol.90880.2008.
39. Khalafi M, Mohebbi H, Symonds ME, Karimi P, Akbari A, Tabari E, et al. The impact of moderate-intensity continuous or high-intensity interval training on adipogenesis and browning of subcutaneous adipose tissue in obese male rats. *Nutrients* 2020;12(4):925. doi: 10.3390/nu12040925.
40. Wang T, Niu Y, Liu S, Yuan H, Liu X, Fu L. Exercise improves glucose uptake in murine myotubes through the AMPK α 2-mediated induction of Sestrins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 2018;1864(10):3368-77. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.07.023.
41. Tao R, Xiong X, Liangpunsakul S, Dong XC. Sestrin 3 protein enhances hepatic insulin sensitivity by direct activation of the mTORC2-Akt signaling. *Diabetes*. 2015;64(4):1211-23. doi: 10.2337/db14-0539.
42. Jäger S, Handschin C, Pierre JS, Spiegelman BM. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007; 104(29):12017-22. doi: 10.1073/pnas.0705070104.
43. Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metabolism* 2005;1(6):361-70. doi: 10.1016/j.cmet.2005.05.004.
44. Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 2009;458(7241):1056-60. doi: 10.1038/nature07813.
45. Kim M, Sujkowski A, Namkoong S, Gu B, Cobb T, Kim B, et al. Sestrins are evolutionarily conserved mediators of exercise benefits. *Nature Communications* 2020; 11(1):190. doi: 10.1038/s41467-019-13442-5.
46. Zhang D, Wang W, Sun X, Xu D, Wang C, Zhang Q, et al. AMPK regulates autophagy by phosphorylating BECN1 at threonine 388. *Autophagy* 2016;12(9):1447-59. doi: 10.1080/15548627.2016.1185576.
47. Liu Y, Nguyen PT, Wang X, Zhao Y, Meacham CE, Zou Z, et al. TLR9 and beclin 1 crosstalk regulates muscle AMPK activation in exercise. *Nature* 2020;578(7796):605-9. doi: 10.1038/s41586-020-1992-7.
48. Liu W, Xia Y, Kuang H, Wang Z, Liu S, Tang C, et al. Proteomic profile of carbonylated proteins screen the regulation of calmodulin-dependent protein kinases-AMPK-Beclin1 in aerobic exercise-induced autophagy in middle-aged rat hippocampus. *Gerontology* 2019;65(6):620-33 doi: 10.1159/000500742.