

## تأثیر ۱۲ هفته تمرین هوازی با و بدون محدودیت غذایی بر SIRT3، PGC1- $\alpha$ و SOD2 عضله نعلی موش‌های صحرائی نر

رسول هاشم کندی اسدی<sup>۱</sup>، سجاد ارشدی<sup>۲</sup>، عبدالعلی بنایی فر<sup>۳</sup>، مسعود حاجی رسولی<sup>۴</sup>

۱- دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران جنوب، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- نویسنده مسئول: استادیار گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران جنوب، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. پست الکترونیکی: arshadi.sajad@yahoo.com

۳- دانشیار گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران جنوب، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۴- دانشیار گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد اسلامشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۷/۸/۲۰

تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۴

### چکیده

**سابقه و هدف:** به تازگی تأثیر هم‌افزایی محدودیت غذایی (DR) بر سازگاری‌های ناشی از تمرینات ورزشی توجه محققان را به خود جلب کرده است. از این رو، هدف مطالعه حاضر تعیین تأثیر ۱۲ هفته تمرین هوازی (AT) همراه با محدودیت غذایی بر میزان بیان ژن پروتئین‌های SIRT3، PGC1- $\alpha$  و SOD2 بافت عضله نعلی موش‌های صحرائی نر بود.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعه در قالب یک طرح تجربی چند گروهی با گروه‌های کنترل (مدل حیوانی) به مدت ۱۲ هفته روی ۴۰ سر موش صحرائی نر سه ماهه انجام شد. آزمودنی‌ها به شکل تصادفی در چهار گروه همگن کنترل (۹ سر=Con)، محدودیت غذایی (۱۰ سر=DR)، تمرین ورزشی (۸ سر=T) و تمرین ورزشی+محدودیت غذایی (۸ سر=T+DR) جایگزین شدند. تمامی موش‌های صحرائی، پس از آخرین جلسه تمرین سه ماهه، جراحی و بخشی از بافت عضله نعلی آنها برای بررسی mRNA پروتئین‌های SIRT3، PGC1- $\alpha$  و SOD استخراج شد و روش RT-PCR مورد استفاده قرار گرفت. داده‌های حاصله توسط آزمون آنالیز واریانس دوره‌ای و در سطح معنی داری ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** پس از اتمام پروتکل تحقیق در گروه T بیان پروتئین‌های SIRT3، PGC1- $\alpha$  و SOD به طور معنی داری بیشتر از گروه کنترل بود، در حالی که در گروه DR تنها بیان پروتئین SIRT3 به طور معنی داری افزایش یافته بود، همچنین میزان بیان پروتئین PGC1- $\alpha$  و SIRT3 در گروه DR+T به طور معنی داری بیشتر از گروه کنترل بود، تمرین باعث کاهش اثر افزایشی محدودیت غذایی بر بیان پروتئین‌های SIRT3 شد، درحالی که تمرین و محدودیت غذایی دارای اثر تعاملی در بیان پروتئین PGC1- $\alpha$  بودند، اما اثر تعاملی و یا تقابلی در بیان پروتئین SOD مشاهده نشد.

**نتیجه‌گیری:** استفاده از محدودیت غذایی شدید به همراه تمرینات هوازی احتمالاً باعث سرکوب فرآیندهای مرتبط با افزایش طول عمر سلولی می‌گردد.

**واژگان کلیدی:** تمرین هوازی، محدودیت غذایی، SIRT3، PGC1- $\alpha$ ، موش‌های صحرائی نر

### • مقدمه

پیام‌رسانی سلولی، خانواده سیرتوئین‌ها شامل پروتئین‌های هستند که در بخش‌های مختلف سلول قرار داشته و فعالیت اصلی آنها، استیل‌زدائی وابسته به NAD<sup>+</sup> می‌باشد (۱). تغییر ساختار پروتئین‌ها قبل و بعد از ترجمه بر اثر استیل‌اسیون روی می‌دهد (۲). ۸۵ درصد کل پروتئین‌های انسانی از N-Terminal استیل‌ه و دچار تغییر می‌شوند. استیل‌اسیون N-Terminal پروتئین‌ها با چرخه تنظیم و آپوپتوز سلولی در ارتباط می‌باشد

با توجه به افزایش تعداد سالمندان جامعه، افزایش طول عمر و بهبود سطح سلامتی طی این دوره از زندگی اخیراً موجب انجام تحقیقات زیادی در این حیطه شده است. به تازگی، پیشرفت‌های به دست آمده در ابزارهای مختلف اندازه‌گیری آزمایشگاهی موجب گردیده است تا شناسایی سازوکارهای سلولی و مولکولی مؤثر در این زمینه و نقش آنها در مسیرهای پیام‌رسانی تسهیل شود. در میان پروتئین‌های مختلف درگیر در مسیرهای

آن و افزایش طول عمر هستند. در سال‌های اخیر، تأثیر محدودیت غذایی یا کالریکی و تمرینات ورزشی مختلف بر این موضوع توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده است. برخی از مطالعات اشاره دارند که محدودیت غذایی یا کالریکی و تمرینات ورزشی می‌تواند موجب تحریک و افزایش بیان پروتئین‌های درگیر در بیوژنز میتوکندریایی شود. در این راستا، Qiu X و همکاران با اعمال ۳۰ درصد محدودیت دریافت کالری به مدت شش ماه بر موش‌ها مشاهده کردند SIRT3 و SOD2 افزایش یافت و ROS کاهش پیدا کرد (10). Cheng A و همکاران گزارش کردند که تمرین دویدن باعث افزایش پروتئین SIRT3 و SOD2 در سلول‌های عصبی می‌شود (9). همچنین، Huang C و همکاران گزارش کردند که ۱۲ هفته تمرین شنا باعث تنظیم افزایشی و مثبت مسیر SIRT3/PGC-1 $\alpha$  شده است (۱۱). با این حال، تناقضاتی نیز در این زمینه وجود دارند؛ به عنوان نمونه Patel BP و همکاران گزارش کردند که محدودیت دریافت کالری باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدی، عوامل التهابی و آسیب اکسایشی و کاهش ظرفیت بیوانرژی میتوکندریایی و اکسیداسیون پروتئین شده است (۱۲). همچنین، Venditti P و همکاران دریافتند که تمرینات ورزشی و امانده‌ساز موجب افزایش تولید ROS و آسیب بافتی در موش‌های صحرایی شده است (۱۳). با این حال، افزایش نسبت سوپراکساید دسموتاز به آنزیم کاتالاز (SOD/CAT) پس از ۱۲ هفته تمرین هوازی روی تردمیل نیز گزارش شده است (۴). این تناقضات ممکن است عمدتاً ناشی از شدت، مدت و نوع تمرینات بدنی و محدودیت‌های غذایی یا کالریکی استفاده شده در این مطالعات باشد. با توجه به عدم انجام یک پژوهش جامع به منظور ارزیابی آثار ترکیب دو روش غذایی و ورزشی (به ویژه در داخل کشور) و محدود بودن مطالعاتی که اثر تمرینات ورزشی هوازی و محدودیت غذایی را بر شاخص‌های بیوژنز میتوکندری و پروتئین‌های درگیر در استرس اکسایشی را مورد بررسی قرار داده‌اند و با توجه به آنکه آگاهی از اثر محدودیت غذایی با و بدون تمرینات ورزشی بر بیوژنز میتوکندری و به فهم بهتر چگونگی عملکرد میتوکندریایی و سازوکارهای مرتبط با فرآیندهای سوخت و سازی میتوکندری تحت شرایط تغذیه‌ای و تمرینی مختلف جهت کاهش بیماری‌ها و آسیب‌های ناشی از آن و افزایش احتمالی طول عمر در بین همه افراد جامعه و نیز ورزشکاران کمک می‌کند، و نیز با توجه به عدم امکان کنترل شرایط زیستی در مدل انسانی و روش مورد استفاده در تحقیق حاضر که نیازمند بافت برداری بوده این مطالعه با هدف بررسی تأثیر ۱۲ هفته محدودیت غذایی با و بدون تمرین هوازی بر بیان ژن شاخص‌های

(۳). همچنین به نظر می‌رسد استیل‌اسون برای فعال‌سازی برخی از پروتئین‌ها ضروری است، به طوری که مهار استیل‌اسون باعث سرکوب رشد و فعال‌سازی آنها می‌شود (۴). همچنین، سیرتوئین‌ها از طریق مسیرهای پیام‌رسانی مختلف باعث افزایش طول عمر موجودات زنده می‌شوند. در پستانداران هفت همولگ (SIRT1-SIRT7) سیرتوئین وجود دارد که سه سیرتوئین SIRT3، SIRT4 و SIRT5 در میتوکندری یافت می‌شوند، ولی اطلاعات زیادی از عملکرد آنها در درون بدن در دست نمی‌باشد (۵). SIRT3 میتوکندریایی، پروتئینی است که از طریق استیل‌زدائی در بسیاری از جنبه‌های مرتبط با عملکرد میتوکندری از جمله اکسیداسیون مواد مغذی، سنتز آدنوزین تری فسفات (ATP) و مقابله با تولید ROS مؤثر است. به علاوه، فقدان و کمبود SIRT3 احتمالاً با افزایش سرعت ابتلا به بیماری‌های مرتبط با افزایش سن مانند سرطان، نشانگان سوخت و سازی، بیماری‌های قلبی-عروقی و بیماری‌های مرتبط با دستگاه عصبی در ارتباط است (۶). در پژوهشی نشان داده شد که کمبود SIRT3 در میتوکندری موش‌ها باعث اختلال در عملکرد چرخه انتقال الکترون می‌شود و SIRT3 نقش کلیدی در تنظیم اکسایش میتوکندری بازی می‌کند (۵). همچنین، در میان سیرتوئین‌های میتوکندریایی، قوی‌ترین فعالیت استیل‌زدایی به SIRT3 تعلق دارد، با این حال اطلاعات اندکی در مورد نقش فیزیولوژیک SIRT3 در دست می‌باشد (۷). همچنین، SIRT3 در تنظیم محتوا و زیر رده‌های میتوکندری از طریق PGC-1 $\alpha$  شرکت دارد. PGC-1 $\alpha$  تنظیم کننده اصلی عملکرد میتوکندریایی، اکسیژن مصرفی و فسفریلاسیون اکسایشی و اکسایش بافت چربی قهوه‌ای می‌باشد. SIRT3 عامل اصلی استیل‌زدای میتوکندریایی است که تأثیر PGC-1 $\alpha$  بر روی آن اخیراً کشف شده است (۸). از طرفی، مهار SIRT3 در موش‌ها موجب کند شدن سیگنالینگ انسولین از طریق کاهش فسفریلاسیون AKT و ERK و در نتیجه افزایش تولید ROS و نیز کاهش آنزیم SOD2 در میتوکندری شود. SOD2 یکی از آنزیم‌های اصلی آنتی‌اکسیدانی است که در خط مقدم مقابله با رادیکال‌های آزاد سوپراکسید تولید شده توسط چرخه انتقال الکترون قرار دارد (۹). به علاوه، شواهد نشان می‌دهند که افزایش SIRT3 و PGC-1 $\alpha$  در گلبول‌های سفید باعث افزایش پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی و بیان پروتئین SOD2 می‌شود. لذا با توجه به مطالب مذکور و این مسئله که میتوکندری مرکز متابولیسم سلول بوده و اختلال در تنظیم عملکرد آن منجر به بسیاری از بیماری‌ها و تسریع سال‌خوردگی سلول می‌شود، بنابراین پژوهشگران همواره به دنبال اتخاذ راهکارهای مناسب برای حمایت از این اندامک حیاتی، آسیب‌های احتمالی مرتبط با

بیوژنز میتوکندریایی عضله اسکلتی موش‌های صحرایی نر انجام شد.

## • مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، با توجه به شرایط مناسب مدل حیوانی برای مطالعه حاضر، ۴۸ 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 ( $22 \pm 2$  سانتی‌گراد)، رطوبت محیط ( $50 \pm 5$  درصد) و چرخه روشنایی- تاریکی ۱۲:۱۲ ساعته کنترل شد و در تمام مراحل کار با حیوانات معاهده هلسینکی و ضوابط کمیته اخلاق حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه (شماره مجوز: ۱۴۱۲۱۴۰۷۹۵۲۰۰۸) رعایت شد. ۸ سر موش‌های صحرایی نر سه ماهه ویستار تمرین نکرده که حتی در برنامه آشنایی با نوارگردان هم شرکت نکردند، در گروه کنترل پایه جایگزین شدند که این موش‌ها در ابتدای دوره سه ماهه و قبل از شروع پژوهش، جراحی و جهت کنترل سن، پارامترهای پایه و لحاظ شدن به عنوان گروه مرجع در روش RT-PCR مورد استفاده قرار گرفتند. البته این موضوع باید ذکر گردد که از هر گروه کنترل و محدودیت غذایی تعداد یک سر موش صحرایی و از هر گروه تمرین ورزشی و تمرین ورزشی+محدودیت غذایی تعداد دو سر موش صحرایی به عنوان افت آزمودنی در انتهای دوره پژوهش وجود داشت. لذا تعداد ۳۴ سر موش صحرایی در انتهای دوره پژوهش مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۴ روز تحت برنامه آشنایی با نحوه 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 به چهار گروه کنترل، تمرین، محدودیت غذایی و تمرین+محدودیت غذایی جایگزین شدند. گروه تمرین+محدودیت غذایی 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 کردند. شدت نسبی کار در سرتاسر برنامه تمرین معادل ۸۰-۷۵ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه (۳۳-۲۴ متر/دقیقه با شیب ۱۵٪) حفظ شد. مدت زمان تمرین از ۱۰ دقیقه در روز در هفته اول شروع و به ۶۰ دقیقه در روز در هفته پنجم رسیده و تا انتهای دوره حفظ شد. آزمودنی‌های گروه کنترل و تمرین به صورت آزادانه از غذای استاندارد و آب در طول دوره پژوهش استفاده کردند. برای تعیین مقدار غذای مصرفی گروه‌های محدودیت غذایی و تمرین+محدودیت غذایی و اعمال

محدودیت غذایی برای آنها، مقدار غذای مصرفی سایر آزمودنی‌ها به طور روزانه اندازه‌گیری شده و گروه‌های دارای محدودیت، ۵۰ درصد مقدار غذای مصرفی سایر گروه‌ها را دریافت کردند. تمامی موش‌های صحرایی، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین به روش بدون درد توسط متخصصین کارآزموده کشته و جراحی شدند. سپس بخشی از بافت عضله نعلی آزمودنی‌ها با دقت برداشته شده و برای بررسی میزان بیان ژنی یا mRNA پروتئین‌های SIRT3، PGC1- $\alpha$  و SOD2 استفاده شد (14-15).

**استخراج RNA و ساخت cDNA:** استخراج RNA از بافت نمونه با استفاده از روش پیشنهادی کیت (ThermoK0731, USA) انجام شد. پس از استخراج RNA مقدار و خلوص آن توسط روش اسپکتروفتومتری (Bio-Rad, CA, USA) بررسی شد. ساخت cDNA نیز با استفاده از کیت (Fermentas, Canada) RevertAID TM First Standard cDNA synthesis طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. نمونه به دست آمده جهت ارزیابی‌های بعدی در فریزر -۷۰ درجه نگهداری شد.

**Real-time PCR:** برای اندازه‌گیری میزان بیان ژن پروتئین‌های SIRT3، PGC1- $\alpha$  و SOD2 از دستگاه مربوطه Corbett-Rotor gene-6000 (Corbett., ResearchAustralia) استفاده شد. جفت پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از نرم افزار 3 Primer طراحی شده و توسط بایونیر (Bioneer-Germany) سنتز شده و برای کار با غلظت نهایی ۱۰۰nm مورد استفاده قرار گرفتند.

## پرایمرها:

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در تحقیق

genes	Primer sequence	Product length (bp)
GAPDH	F: GGAAAGCCTGCCGGTACTA R: CACCCGAGGAGAAATCGGG	110
SIRT3	F: TGGCGGCAGGACGATTATT R: CAGGCTCTGGCCCCAATCA	145
PGC1	F: CTGGTTGCCTGCATGAGTGT R: TTGCACATGTCCCACGCCAT	101
SOD	F: AAAGTAGTCGCGGAGACGGG R: CGCCATAACTCGCTAGGCCA	113

داده‌های حاصله با استفاده از روش آماری تحلیل واریانس دوراهه در سطح معنی‌داری کمتر از ۵ درصد به کمک نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ تجزیه و تحلیل شد.

## • یافته‌ها

ویژگی‌های اولیه موش‌های صحرایی (تعداد = ۳۴) در جدول ۲ ارائه شده است. در این راستا نتایج حاکی از آن بود که تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها در رابطه با وزن بدنی وجود داشت ( $P=0/01$ ) به طوری که میزان وزن بدنی گروه‌های دارای محدودیت غذایی نسبت به گروه‌های بدون محدودیت غذایی به

(AT) افزایش معنی داری داشته‌اند، اما تمرین هوازی بیشترین تأثیر را بر بیان پروتئین SOD داشته است. همچنین در گروه محدودیت غذایی (DR) میزان بیان ژن PGC1- $\alpha$  به طور معنی داری بیشتر از گروه کنترل بود ( $P \leq 0/05$ ). میزان بیان ژن PGC1- $\alpha$  و SIRT3 در گروه تمرین با محدودیت غذایی (AT+DR) بیشتر از گروه کنترل بود ( $P \leq 0/05$ ) اما تمرین همراه با محدودیت غذایی بیشترین تأثیر را بر بیان ژن PGC1- $\alpha$  داشت.

طور قابل توجهی کمتر بود. با این حال تفاوت معنی داری بین وزن بدنی گروه محدودیت غذایی با گروه محدودیت غذایی+تمرین ورزشی مشاهده نشد ( $P > 0/05$ ). همچنین تفاوت معنی داری بین گروه‌های مورد مطالعه در رابطه با وزن عضله و وزن عضله نسبت به وزن بدن مشاهده نشد ( $P > 0/05$ ). علاوه بر این، مقادیر و میزان اثر گذاری تمرین و محدودیت غذایی بر شاخص‌های فیزیولوژیک اندازه‌گیری شده گروه‌ها در جدول ۳ ذکر شده است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد بیان هر سه پروتئین SIRT3 ، PGC1- $\alpha$  و SOD در گروه تمرین هوازی

جدول ۲. برخی ویژگی‌های جسمانی موش‌های صحرایی مطالعه حاضر

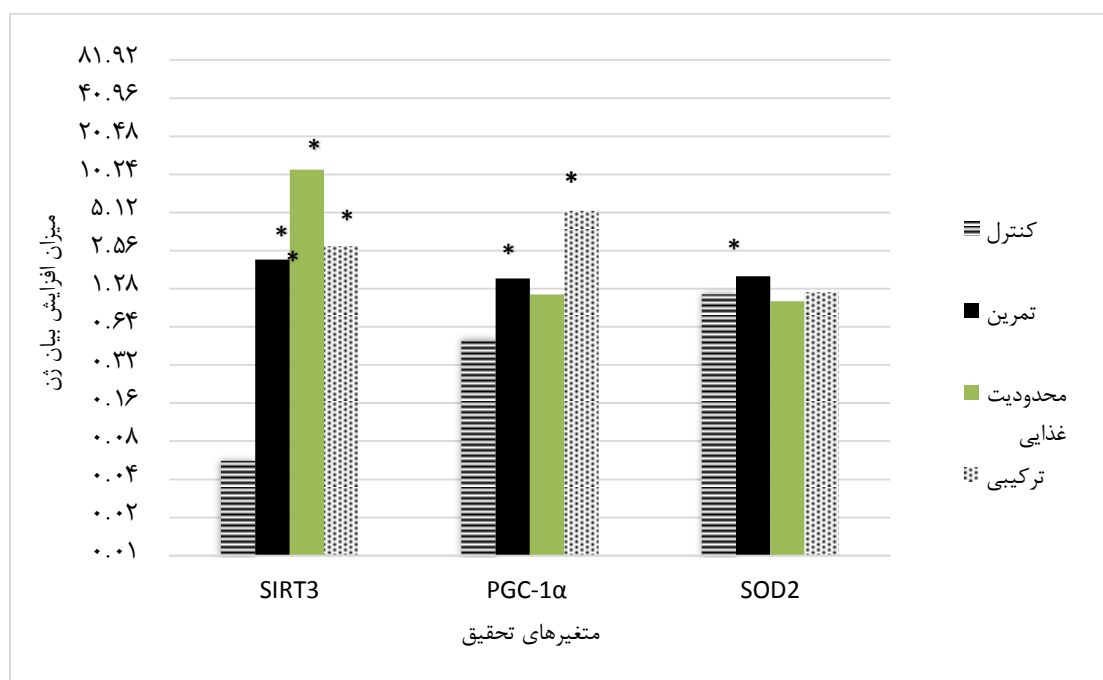
شاخص	گروه	تعداد	میانگین	انحراف استاندارد	F	P
وزن بدن (گرم)	T	۹	۳۴۶/۲۲	۲۲/۰۸	۲/۲۳	۰/۰۱
	DR	۹	۲۳۱	۳۱/۰۱		
	T+DR	۸	۲۳۳/۵	۳۷/۵		
	CON	۸	۳۸۵/۲۵	۳۹/۶۱		
وزن عضله (گرم)	T	۹	۰/۰۶۸۹	۰/۰۲۲	۰/۳۶	۰/۴۷
	DR	۹	۰/۰۵۷	۰/۰۱۱		
	T+DR	۸	۰/۰۶۱۶	۰/۰۱۲		
	CON	۸	۰/۰۷۲	۰/۰۱۲		
نسبت وزن عضله به وزن بدن (گرم/کیلوگرم)	T	۹	۰/۱۹۹	۰/۰۶۶	۰/۷۹	۰/۳۲
	DR	۹	۰/۲۵۰	۰/۰۵۶		
	T+DR	۸	۰/۲۶۵	۰/۰۴۴		
	CON	۸	۰/۱۹	۰/۰۴۳		

T = تمرین ورزشی ؛ DR: محدودیت غذایی؛ T+DR = تمرین ورزشی+محدودیت غذایی CON = کنترل

جدول ۳. نتایج آزمون تحلیل واریانس دوطرفه

شاخص	گروه	جمع مجذورات	درجه آزادی	میانگین مجذورات	F	P	مجذورات انا
SIRT3	T	۱/۵۶	۱	۱/۵۶	۰/۳۳۴	۰/۰۲۷	۰/۰۱۱
	DR	۲۹۸/۱۲۸	۱	۲۹۸/۱۲۸			
	T+DR	۱۷۰/۴۵۵	۱	۱۷۰/۴۵۵			
	خطا	۱۳۹/۸۸۶	۳۰	۴/۶۶۳			
کل		۱۳۸۶/۲۶۵	۳۴	۲/۷۰۸			
PGC1- $\alpha$	T	۸/۷۰۸	۱	۱/۷۳۸	۴/۷۲۰	۰/۰۳۲	۰/۳۲۲
	DR	۱/۷۳۸	۱	۳۵/۰۴۲			
	T+DR	۳۵/۰۴۲	۱	۲/۱۴۳			
	خطا	۶۴/۳۰۵	۳۰	۲/۷۰۸			
کل		۱۷۲/۳۲۸	۳۴				
SOD	T	۰/۷۲۲	۱	۰/۷۲۲	۲۹/۰۵۴	۰/۰۰	۰/۴۹۲
	DR	۰/۱۳۱	۱	۰/۱۳۱			
	T+DR	۰/۱۶۸	۱	۰/۱۶۸			
	خطا	۰/۷۴۶	۳۰	۰/۰۲۵			
کل		۵۵/۶۴۱	۳۴				

T = تمرین ورزشی ؛ DR: محدودیت غذایی؛ T+DR = تمرین ورزشی+محدودیت غذایی



نمودار ۱. میزان بیان پروتئین SIRT3، PGC-1α و SOD2 پس از پروتکل تحقیق

\* معنی‌داری نسبت به گروه کنترل ( $P < 0.05$ )

هفته تمرین شنا باعث تنظیم مسیر SIRT3/ PGC-1α شد (۱۱). تنظیم کاهشی و سرکوب بیان SIRT3 باعث مهار فسفوریلاسیون CREB و پروتئین کیناز فعال شده با AMP (AMPK) و به دنبال آن بیان و نسخه‌برداری از PGC1-α را کاهش می‌دهد. علاوه بر این، افزایش بیان PGC1-α به فعال‌سازی CREB و AMPK از طریق فسفوریلاسیون آنها نیاز دارد (19). پروتئین PGC1-α به شدت تحت تأثیر تغییرات SIRT3 قرار دارد و افزایش بیان پروتئین SIRT3 باعث افزایش بیوزن میتوکندریایی از طریق افزایش بیان پروتئین PGC1-α می‌شود. از آنجا که میتوکندری اندام اصلی تولید انرژی در بافت عضلانی است، 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 و محدودیت کالریایی از طریق اثرگذاری بر PGC1-α و SIRT3 به ترتیب باعث افزایش فرآیندهای مرتبط با بیوزن میتوکندریایی و کاهش تولید ROS، افزایش اکسیژن مصرفی بیشینه، بهبود اکسیداسیون لیپید و فسفوریلاسیون اکسایشی می‌شود (20). به علاوه، تمرینات ورزشی با اثرگذاری

همچنین بررسی تحلیل واریانس دوطرفه نشان داد تمرین و محدودیت غذایی باعث کاهش اثر افزایشی محدودیت غذایی بر بیان ژن SIRT3 شده بود، در حالی که تمرین و محدودیت غذایی دارای اثر هم‌افزایی بر بیان ژن PGC1-α بودند (شکل ۱) همچنین تمرین و محدودیت غذایی فاقد اثر تعاملی و تقابلی در بیان ژن SOD بودند (جدول ۳).

## • بحث

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 BA و همکاران (16)، Karvinen S و همکاران (17)، Huang C-C و همکاران (۱۱) و Vargas-Ortiz K و همکاران (18) قرار دارد. علاوه بر این، Placios و همکاران گزارش کردند که افزایش SIRT3 ناشی از تمرینات ورزشی همبستگی مثبتی با افزایش فعال‌سازی CREB cAMP response-binding (element) و متعاقب آن افزایش بیان پروتئین PGC1-α دارد. Qiu X و همکاران گزارش کردند که تمرین دویدن باعث افزایش پروتئین SIRT3 و SOD2 در سلول‌های عصبی می‌شود (10). همچنین، Huang C-C و همکاران اشاره کرد که ۱۲

و وامانده‌ساز باعث کاهش فعالیت SOD و افزایش مالون دی آلدیهید (MDA) عضله و سرمی و نیز افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و آپوپتوز عضله اسکلتی در موش‌های صحرایی شده است (۲۶). با این حال، Pinho RA و همکاران گزارش کردند که ۱۲ هفته تمرین هوازی روی تردمیل باعث افزایش SOD/CAT در موش‌های صحرایی شده است (۴). همچنین در تحقیقی که Koo J-H و همکاران دریافتند که ۱۲ هفته تمرین روی تردمیل (همراه با افزایش تدریجی شدت و مدت تمرین) باعث افزایش SIRT3 و PGC-1 $\alpha$  موش‌هایی صحرایی می‌شود (۲۷). این تناقضات ممکن است عمدتاً ناشی از شدت، مدت و نوع تمرینات بدنی و محدودیت‌های غذایی یا کالریکی باشد و یا ناشی از وضعیت سن، سلامت و آمادگی آزمودنی‌های مورد مطالعه باشد. اما در برخی از این مطالعات علاوه بر افزایش همزمان پروتئین و بیان SIRT3 و PGC-1 $\alpha$ ، همبستگی مثبتی بین سطوح این دو عامل مرتبط با بیوژنز میتوکندریایی گزارش شده است. همچنین، در این مطالعات گزارش شده است که حتی افزایش اندک در سطوح پروتئین SIRT3 به افزایش قابل توجه در بیان پروتئین PGC-1 $\alpha$  و متعاقب آن بیوژنز میتوکندریایی منجر می‌شود (۱۸-۱۶، ۱۱). این ارتباط و همبستگی مثبت، ناشی از این واقعیت است که فرآیندهایی که باعث افزایش بیان SIRT3 شده، متعاقباً موجب فعال‌سازی نسخه‌برداری از PGC-1 $\alpha$  می‌شوند (۲۸). بنابراین، می‌توان بیان کرد که نتایج مطالعه حاضر مبنی بر افزایش بیان ژن SIRT3، PGC-1 $\alpha$  و SOD در موش‌های صحرایی احتمالاً منعکس کننده بهبود عملکرد میتوکندریایی پس از ۱۲ هفته تمرین هوازی است (۳۰-۲۹).

همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد که محدودیت غذایی به تنهایی باعث افزایش معنی‌دار SIRT3 نسبت به گروه کنترل شده است. در این راستا، Qiu X و همکاران (۲۰۱۰) با اعمال ۳۰ درصد محدودیت دریافت کالری به مدت شش ماه بر روی موشها مشاهده کردند SIRT3 و SOD2 افزایش یافت و ROS کاهش پیدا کرد (۱۰). همچنین، برخی مطالعات نشان داده‌اند که DR باعث تنظیم مثبت SIRT3 در عضله اسکلتی می‌شود. از آنجا که SIRT3 در میتوکندری واقع شده است می‌تواند فعالیت چندین پروتئین میتوکندریایی از قبیل سوکسینات دهیدروژناز، سوپراکسید دیسموتاز وابسته به منگنز (Mn-SOD) و FOXO3 را تعدیل کند (۷). به علاوه، این نکته نیز باید خاطر نشان شود که SIRT3 باعث فعال‌سازی

بر SIRT3 باعث افزایش بیان PGC-1 $\alpha$  و زیر واحدهای II و IV سیتوکروم اکسیداز C و بیان ATP سنتاز باعث افزایش فسفوریلاسیون اکسایشی می‌شود (21). بنابراین، این احتمال وجود دارد که از طریق افزایش بیان SIRT3 باعث القاء بروز سازگاری‌های میتوکندریایی شوند که باعث افزایش فسفوریلاسیون میتوکندریایی می‌شود (18). خانواده پروتئین SIRT از طریق داستیلاسیون PGC-1 $\alpha$  در سلول‌های عضله اسکلتی تنظیم کننده اصلی بیوژنز میتوکندریایی است (۲۲). به علاوه، SIRT3 از طریق تعدیل نسبت NAD<sup>+</sup>/NADH سیتوزولی در طی انقباض عضلانی نقش مهمی در بروز سازگاری‌های عضلانی با تمرینات ورزشی استقامتی دارد (۲۳). به علاوه، AMPK که حسگر سلولی انرژی است پس از برهم خوردن تعادل انرژی حین فعالیت ورزشی به صورت غیرمستقیم با فعال‌سازی SIRT3 باعث تغییر بیان و غلظت پروتئین‌هایی مانند PGC-1 $\alpha$  و SOD می‌شود (۷). برخی مطالعات مانند Lanza IR و همکاران (۲۰۰۸) دریافتند که تمرینات ورزشی هوازی منظم باعث افزایش بیان SIRT3 گردیده است. در این مطالعه همانند مطالعه حاضر از ترکیب محدودیت کالری با تمرینات ورزشی استفاده شده است، با این حال تعداد جلسات تمرینی (۶ جلسه تمرین در هفته) و نوع آزمودنی (انسانی در مقایسه با حیوانی) متفاوت است (۲۴). علاوه بر این، Huang C-C و همکاران گزارش کردند 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 و افزایش نسبت توده عضلانی به وزن بدن می‌شود (۱۱). با این وجود برخی تناقضات نیز در این زمینه وجود دارند به طوری که Patel BP و همکاران عنوان داشتند که محدودیت دریافت کالری باعث افزایش پراکسیداسیون چربی، عوامل التهابی و آسیب اکسایشی و کاهش ظرفیت بیوانرژی میکرومیتوکندری و اکسیداسیون پروتئین می‌شود (۱۲). در این راستا Liu W و همکاران در تحقیقی که بر روی موش‌ها انجام دادند متوجه شدند که سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و قابلیت ضد آپوپتوزی سلول در اثر تمرین طاقت فرسا کاهش و ROS افزایش پیدا می‌کند (۲۵). Venditti P و همکاران افزایش ROS و شاخص‌های آسیب بافتی موش‌های صحرایی را پس از تمرینات طاقت فرسا گزارش کردند (۱۳). همچنین، Qiguan J و همکاران گزارش کردند که هشت هفته تمرین شای شدید

(دفاع های آنزیمی و غیر آنزیمی) را تحت تأثیر قرار دهد. علاوه بر این، محدودیت غذایی شدید از طریق کاهش سنتز اسیدهای چرب در کبد باعث کاهش فعالسازی و بیان SIRT3 می شود (۳۳) این در حالی است که میزان بیان ژن PGC1- $\alpha$ ، در گروه تمرین با محدودیت غذایی (AT+ DR) بیشتر از گروه محدودیت غذایی بود. این موضوع احتمالاً بخاطر آن است که پروتئین SIRT3 در زمان کاهش بیش از حد شارژ انرژی سلول تأثیری بر بیوژنز میتوکندریایی ندارد و یا این فرآیند از طریق مسیر سیگنالینگ دیگری و توسط ایزوفرم های دیگر خانواده SIRT کنترل می شود. با این حال، در مطالعه حاضر نیز به دلیل محدودیت های موجود امکان بررسی برخی از ظرفیت های فیزیولوژیک پایه (ضربان قلب، میزان اسید لاکتیک...) و فعالیت های آنزیمی آنتی اکسیدانی و همچنین کنترل میزان فعالیت موش های صحرایی در قفس وجود نداشت. لذا، اظهار نظر صحیح در این زمینه و شناسایی دقیق مکانیسم های مولکولی این فرآیند، نیازمند بررسی بیشتر و گسترده تر است.

به طور کلی، به نظر می رسد با وجود اینکه استفاده از تمرینات ورزشی هوازی با شدت متوسط با تغییر بیان پروتئین های مرتبط با بیوژنز میتوکندریایی مرتبط است و احتمالاً کاهش وزن ناشی از کاهش چربی بدنی دارای آثار مثبتی بر فرآیندهای مرتبط با آپوپتوز سلولی و استیلایسیون پروتئین های مرتبط با افزایش طول عمر سلولی به ویژه SIRT3، PGC1- $\alpha$  و SOD است اما ترکیب محدودیت غذایی شدید با تمرینات ورزشی و هوازی می تواند آثار سرکوب کننده بر فرآیندهای مرتبط با سلامتی و آنتی اکسیدانی داشته باشد. بنابراین، ترکیب محدودیت غذایی با تمرین ورزشی هوازی به منظور افزایش کارایی و بهبود سازگاری های ناشی فعالیت ورزشی با احتیاط باید انجام پذیرد.

سوخت و ساز استات می شود که افزایش آن طی ناشتایی و سالمندی مشاهده می شود. به طور خاص موجب فعال سازی پروتئین های نوع یک و دو استیل-CoA سنتاز می گردد که فعال شدن این دو نوع پروتئین با افزایش طول زندگی مخمر همراه بوده است (۳۱). در طی محدودیت دریافت مواد غذایی یا ناشتایی، افزایش بیان SIRT3 روی می دهد که به متعاقب آن داستیلایسیون وابسته به SIRT1 باعث افزایش بیان پروتئین PGC1- $\alpha$  در عضله اسکلتی می شود (۲۲، ۳۲) البته این موضوع با نتایج مطالعه حاضر مغایر می باشد که احتمالاً ناشی تفاوت در میزان محدودیت اعمال شده و سن آزمودنی ها بوده است. اما اثر افزایشی محدودیت غذایی در ترکیب با تمرین هوازی کاهش پیدا کرده است که نشان دهنده اثر تقابلی تمرین هوازی و محدودیت غذایی می باشد و این امر باعث شده بیان پروتئین SIRT3 در گروه محدودیت غذایی (DR) از گروه تمرین با محدودیت غذایی به طور معنی داری بیشتر باشد، و این امر احتمالاً ناشی از کاهش بیش از حد شارژ انرژی سلول در اثر محدودیت غذایی و تمرین هوازی است که باعث بروز اثر تقابلی در بیان ژن SIRT3 شده است. در این راستا، Newman, John C و همکاران گزارش کردند که محدودیت غذایی شدید باعث کاهش بیان و فعالسازی SIRT3 می شود (۳۳) و در برخی از مطالعات گزارش شده است که در محدودیت غذایی شدید تولید اجسام کتونی و بتا-هیدروکسی بوتیرات افزایش پیدا می کند و از طریق افزایش مهار کننده هیستون داستیلایز و تغییر NAD میتوکندریایی که برای فعالسازی SIRT3 مورد نیاز است، باعث کاهش بیان و فعالسازی SIRT3 می شود. به علاوه، رژیم های غذایی کم کالری که باعث تولید اجسام کتونی می شوند از طریق تأثیر بر سطوح انسولین و عامل رشد شبه انسولینی و پروتئین کیناز فعال شده با AMP باعث کاهش فعالسازی SIRT3 می گردد. این مسئله به نوبه خود می تواند دفاع آنتی اکسیدانی بدن

## • References

- Zhao S, Xu W, Jiang W, Yu W, Lin Y, Zhang T, et al. Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Sci*. 2010;327(5968):1000-4.
- Wang Q, Zhang Y, Yang C, Xiong H, Lin Y, Yao J, et al. Acetylation of metabolic enzymes coordinates carbon source utilization and metabolic flux. *Sci*. 2010;327(5968):1004-7.
- Starheim KK, Gevaert K, Arnesen T. Protein N-terminal acetyltransferases: when the start matters. *Trends biochem Sci*. 2012;37(4):152-61.
- Pinho RA, Andrades ME, Oliveira MR, Pirola AC, Zago MS, Silveira PC, et al. Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill

- training exercise. *Cell Biol Intern*. 2006;30(10):848-53.
5. Hokari F, Kawasaki E, Sakai A, Koshinaka K, Sakuma K, Kawanaka K. Muscle contractile activity regulates Sirt3 protein expression in rat skeletal muscles. *J app physiol*. 2010;109(2):332-40.
  6. McDonnell E, Peterson BS, Bomze HM, Hirschey MD. SIRT3 regulates progression and development of diseases of aging. *Trends Endocrinol Metab*. 2015;26(9):486-92.
  7. Palacios OM, Carmona JJ, Michan S, Chen KY, Manabe Y, Ward Iii JL, et al. Diet and exercise signals regulate SIRT3 and activate AMPK and PGC-1 $\alpha$  in skeletal muscle. *Aging (Albany NY)*. 2009;1(9):771.
  8. Singh SP, Schragenheim J, Cao J, Falck JR, Abraham NG, 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.
  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):128-42.
  10. Qiu X, Brown K, Hirschey MD, Verdin E, Chen D. Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation. *Cell metab*. 2010;12(6):662-7.
  11. Huang C-C, Wang T, Tung Y-T, Lin W-T. Effect of exercise training on skeletal muscle SIRT1 and PGC-1 $\alpha$  expression levels in rats of different age. *Int j med sci*. 2016;13(4):260.
  12. Patel BP, Safdar A, Raha S, Tarnopolsky MA, Hamadeh MJ. Caloric restriction shortens lifespan through an increase in lipid peroxidation, inflammation and apoptosis in the G93A mouse, an animal model of ALS. *PLoS One*. 2010;5(2):e9386.
  13. Venditti P, Meo SD. Effect of Training on Antioxidant Capacity, Tissue Damage. *Int J Sports Med*. 1997;18:497-502.
  14. Marina Politi, Okoshi, Katashi Okoshi, Vitalino Dal Pai, Maeli Dal Pai-Silva, Luiz Shiguero Matsubara, and Antonio Carlos Cicogna. Mechanical, biochemical, and morphological changes in the heart from chronic food-restricted rats. *Trends in Can. J. Physiol. Pharmacol*. (2001). 79: (9):754-60
  15. Natio H, Powers SK, Demirel HA and Aoki J. Exercise training increases heat shock protein in skeletal muscles of old rats. *Med Sci Sports Exerc*. 2001. 33(5): 729 –734.
  16. Edgett BA, Bonafiglia JT, Baechler BL, Quadriatero J, Gurd BJ. The effect of acute and chronic sprint-interval training on LRP130, SIRT3, and PGC-1 $\alpha$  expression in human skeletal muscle. *Physiol reports*. 2016;4(17): e12879.
  17. Karvinen S, Silvennoinen M, Vainio P, Sistonen L, Koch LG, Britton SL, 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.
  18. Vargas-Ortiz K, Perez-Vazquez V, Diaz-Cisneros FJ, Figueroa A, Jiménez-Flores LM, Rodriguez-DelaRosa G, et al. Aerobic training increases expression levels of SIRT3 and PGC-1 $\alpha$  in skeletal muscle of overweight adolescents without change in caloric intake. *Pediatr exerc sci*. 2015;27(2):177-84.
  19. López-Lluch G, Irueta PM, Navas P, de Cabo R. Mitochondrial biogenesis and healthy aging. *Exp gerontol*. 2008;43(9):813-9
  20. 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):14447-52.
  21. Kong X, Wang R, Xue Y, Liu X, Zhang H, Chen Y, et al. Sirtuin 3, a new target of PGC-1 $\alpha$ , plays an important role in the suppression of ROS and mitochondrial biogenesis. *PloS one*. 2010;5(7):e11707.
  22. 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-1 $\alpha$ . *EMBO j*. 2007;26(7):1913-23.
  23. Suwa M, Nakano H, Radak Z, Kumagai S. Endurance exercise increases the SIRT1 and peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  protein expressions in rat skeletal muscle. *Metab-Clin Exp*. 2008;57(7):986-98.
  24. Lanza IR, Short DK, Short KR, Raghavakaimal S, Basu R, Joyner MJ, et al. Endurance exercise as a countermeasure for aging. *Diabetes*. 2008;57(11):2933-42.
  25. 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.
  26. Qiguan J. The Effects of Chronic Exhaustive Training on Apoptosis of Muscles Rats [J]. *SPORTS SCI*. 1999;5:006.
  27. Koo J-H, Kang E-B, Oh Y-S, Yang D-S, Cho J-Y. Treadmill exercise decreases amyloid- $\beta$  burden possibly via activation of SIRT-1 signaling in a mouse model of Alzheimer's disease. *Exp neurol*. 2017;288:142-52.
  28. 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):13560-7.
  29. Jørgensen SB, Wojtaszewski JF, Viollet B, Andreelli F, Birk JB, Hellsten Y, et al. Effects of  $\alpha$ -AMPK knockout on exercise-induced gene activation in mouse skeletal muscle. *The FASEB journal*. 2005;19(9):1146-8.

30. Houtkooper RH, Pirinen E, Auwerx J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2012;13(4):22-۵
31. Hallows WC, Lee S, Denu JM. Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103(27):10230-5
32. Dittenhafer-Reed KE, Richards AL, Fan J, Smallegan MJ, Siahpirani AF, Kemmerer ZA, et al. SIRT3 mediates multi-tissue coupling for metabolic fuel switching. *Cell metab*. 2015;21(4):637-46.
33. Newman, John C., and Eric Verdin. "Ketone bodies as signaling metabolites." *Trends in Endocrinology & Metabolism* 25.1 (2014): 42-52.

## The Effect of 12 Weeks of Aerobic Training with or without Dietary Restriction on the Expression Levels of SIRT3, PGC1- $\alpha$ and SOD2 of Soleusmuscle in Male Rats

Hashem Kandi Asadi R<sup>1</sup>, Arshadi S<sup>2\*</sup>, Banaei Far A<sup>3</sup>, Haji Rasouli M<sup>4</sup>

1- Ph.D. student, Department of Exercise Physiology, South Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- \*Corresponding author: Assistant Prof, Department of Exercise Physiology, South Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Email: arshadi.sajad@yahoo.com

3- Associate Prof, Department of Exercise Physiology, South Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

4- Associate Prof, Department of Exercise Physiology, Eslamshahr Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received 11 Nov, 2018

Accepted 24 Jan, 2019

**Background and Objectives:** Background and Objectives: Recently, synergistic effect of dietary restriction (DR) on the exercise induced adaptations has attracted the attention of researchers. The aim of this research was to evaluate the effect of 12 weeks of dietary restriction with or without aerobic training on the gene expression or mRNA of SIRT3, PGC1- $\alpha$  and SOD2 proteins of soleusmuscle tissue in male rats.

**Materials & Methods:** This study was conducted as experimental design (animal model) with control groups. Forty 3-month old male rats were randomly divided into four homogenous groups including: 1) Six-month old control (Con; n=9), 2) Dietary restriction (DR; n=9), 3) Exercise training (ET; n=8) and 4- Exercise training + dietary restriction (ET+DR; n=8). After the last exercise session, all animals were sacrificed and their soleusmuscle tissue was removed. Soleusmuscle tissue was analyzed for mRNA expression of SIRT3, PGC1- $\alpha$  and SOD2 using RT-PCR method. Data were analyzed using Two-way ANOVA test and the significant level was set at P<0.05.

**Results:** The results showed the increasing effect of aerobic training on SIRT3, PGC1- $\alpha$  and SOD2 gene expression (P<0.05) while the effect of dietary restriction was significant only on PGC1- $\alpha$  expression (P<0.05). However, additive effect of aerobic training and dietary restriction on SIRT3 and PGC1- $\alpha$  genes expression was significant (P<0.05). The aerobic training reduced the effect of increasing dietary restriction on the SIRT3 expression (P<0.05). Meanwhile, aerobic training and dietary restriction had an interactive effect on expression of PGC1- $\alpha$  protein (P<0.05) but the effect of aerobic training and dietary restriction in interaction with each other on SOD2 gene expression was not significant (P<0.05).

**Conclusion:** Overall, it seems that the use of extreme dietary restriction along with aerobic training is likely to suppress the processes related to cell longevity.

**Keywords:** Aerobic Training, Dietary restriction, SIRT3, PGC1- $\alpha$ , Male rats