

## مقاله پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

دوره ۱۷، آبان ۱۳۹۷، ۸۴۳-۸۵۴

# تأثیر ۴ هفته تمرین تناوبی با شدت بالا بر محتوای پروتئین‌های AKT1، mTOR، P70S6K1 و 4E-BP1 در عضله اسکلتی نعلی موش‌های صحرائی مبتلا به دیابت نوع ۲ یک مطالعه تجربی

محمد شرافتی مقدم<sup>۱</sup>، محسن ثالثی<sup>۲</sup>، فرهاد دریانوش<sup>۳</sup>، محمد همتی نفر<sup>۴</sup>، علی اصغر فلاحی<sup>۵</sup>

دریافت مقاله: ۹۷/۲/۲۲ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۷/۴/۲۳ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۷/۶/۲۴ پذیرش مقاله: ۹۷/۶/۲۷

### چکیده

**زمینه و هدف:** مهم‌ترین مکانسیم سنتز پروتئین در عضله اسکلتی، مسیر mTORC1 است که پروتئین‌های مهمی در آن نقش دارند. دیابت با ایجاد مقاومت به انسولین منجر به اختلال در این مسیر می‌شود. هنوز نقش تمرینات تناوبی با شدت بالا (High-intensity interval training; HIIT) بر سنتز پروتئین‌های دخیل در این مسیر در افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ بررسی نشده است، لذا هدف از مطالعه حاضر، تعیین تأثیر ۴ هفته تمرین HIIT بر محتوای پروتئین‌های AKT1، mTOR، P70S6K1 و 4E-BP1 در عضله اسکلتی نعلی موش صحرائی مبتلا به دیابت نوع ۲ می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این پژوهش تجربی، ۱۶ سر موش صحرائی نر نژاد اسپراگوداولی با سن ۸ هفته و میانگین وزن  $260 \pm 20$  گرم انتخاب و پس از دیابتی شدن از طریق القاء STZ، به صورت تصادفی به دو گروه، تمرین دیابتی (۸ سر) و کنترل دیابتی (۸ سر) تقسیم شدند. گروه تمرینی به مدت ۴ هفته (۴ روز در هفته) در فعالیت ورزشی شرکت داده شدند و گروه کنترل هیچ‌گونه برنامه تمرینی نداشتند. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون t زوجی و t مستقل استفاده شد.

**یافته‌ها:** افزایش معنی‌داری در محتوای پروتئین‌های mTOR ( $P=0/015$ ) و 4E-BP1 ( $P=0/002$ ) در گروه تمرین دیابتی نسبت به کنترل دیابتی مشاهده شد؛ اما در محتوای پروتئین‌های AKT1 ( $P=0/624$ ) و P70S6K1 ( $P=0/153$ ) تفاوت معنی‌داری بین این دو گروه، مشاهده نشد.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به افزایش محتوای پروتئین‌های mTOR و 4E-BP1 در بافت عضله اسکلتی نعلی موش‌های مبتلا به دیابت نوع ۲، می‌توان نتیجه گرفت، ۴ هفته تمرین HIIT از طریق مسیر mTOR/4E-BP1 می‌تواند منجر به سنتز پروتئین شود.

**واژه‌های کلیدی:** تمرین تناوبی با شدت بالا، mTOR، عضله اسکلتی نعلی، دیابت نوع ۲، 4E-BP1، موش صحرائی

۱- دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روانشناسی، گروه علوم ورزشی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

۲- دانشیار فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روانشناسی، گروه علوم ورزشی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

۳- (نویسنده مسئول) دانشیار فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روانشناسی، گروه علوم ورزشی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

تلفن: ۰۷۱-۳۶۱۳۵۲۵۰-۰۷۱ دورنگار: ۰۷۱-۳۶۲۷۲۷۴۸ ایمیل: daryanoosh@shirazu.ac.ir

۴- استادیار فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روانشناسی، گروه علوم ورزشی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

۵- استادیار فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روانشناسی، گروه علوم ورزشی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

## مقدمه

عضله اسکلتی بزرگ‌ترین عضو در بدن انسان است و بیش از ۳۰ تا ۴۰ درصد از کل وزن بدن در بزرگسالان سالم را تشکیل می‌دهد. کاهش توده عضله اسکلتی که ناشی از عدم اضافه‌بار، سوءتغذیه، پیری و انواع بیماری‌های متعدد مانند دیابت نوع ۲ است، منجر به کاهش اجرای عمل‌کرد انسان، سلامت بلندمدت و کیفیت پایین زندگی می‌شود. پیشرفت‌های جدیدی جهت درک مکانیسم‌های سلولی در مسیرهای سیگنالینگ آنابولیک و کاتابولیک بر تنظیم توده عضله اسکلتی و تغییر ظرفیت متابولیسم پروتئین عضله اسکلتی افراد در پاسخ به فعالیت ورزشی و انواع بیماری‌ها صورت گرفته است. درک این فرآیندها برای توسعه اقدامات مؤثرتر درمانی برای جلوگیری از کاهش عضله با بیماری‌ها ضروری می‌باشد [۱].

در حال حاضر، شناخته شده‌ترین مکانیسم تنظیم‌کننده فعالیت کمپلکس هدف راپامایسین در پستانداران-۱ ( mammalian target of rapamycin complex 1; ) در عضله اسکلتی مسیر وابسته به انسولین/فاکتور رشد شبه انسولین-۱ ( Insulin-like growth factor 1; IGF-1 ) است. فعال‌شدن این مسیر منجر به فسفوریلاسیون و فعال‌شدن AKT می‌شود [۲].

یک پروتئین سرین/ترونین کیناز خاص است که نقش کلیدی در فرآیندهای سلولی متعدد از جمله رشد و بقاء سلول، تکثیر و سوخت‌وساز بدن ایفا می‌کند [۳]. این پروتئین از طریق سرکوب کردن فعالیت کمپلکس ۲

توبروز اسکروزیس (Tuberous sclerosis 2; TSC2) منجر

به افزایش فعالیت mTORC1 می‌شود [۴].

mTOR مهم‌ترین فاکتور در سنتز پروتئین است که به صورت انتخابی توسط آنتی‌بیوتیک‌های ماکرولیدی راپامایسین مهار می‌شود [۵]. از دیگر اهداف مولکولی متفاوت پروتئین mTORC1 می‌توان به افزایش میتوکندری، سنتز لیپید، متابولیسم لیپید و اتوفازی اشاره کرد [۶-۷]. مهم‌ترین تأثیر مسیره‌های پیام‌رسانی AKT/mTORC1 اثر بر پروتئین‌های درگیر در کنترل ترجمه‌ای پروتئین ریپوزومی S6 کیناز-۱ (P70S6K1) (P70 ribosomal S6 kinase 1) و عامل شروع‌کننده ترجمه یوکاریوتی 4E متصل به پروتئین-۱ ( Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1; 4E-BP1 ) است. پروتئین ریپوزومی P70S6K1 کیناز به عنوان بخشی از مسیر سیگنالینگ mTORC1 است [۸]. این پروتئین یک پروتئین کیناز است که در انسان توسط ژن، پروتئین ریپوزومی S6 کیناز-۱ (RPS6KB1) B1 (Ribosomal Protein S6 Kinase B1) کدگذاری شده است [۹-۱۰]. 4E-BP1 بهترین عضو شناخته‌شده از خانواده 4E-BPs در پستانداران است که هفت سایت فسفوریلاسیون سرین/ترونین در انسان دارد و به‌طور مستقیم توسط mTORC1 فسفریله می‌شود [۱۱].

در دیابت نوع ۲، مقاومت به انسولین عامل شروع‌کننده‌ای است که به تدریج منجر به اختلال در عملکرد سلول ( ) و در نهایت مرگ سلول می‌شود [۱۲]. اختلال در سیگنالینگ انسولین می‌تواند منجر به انحراف سیگنالینگ mTOR شود [۱۳]. مسیر mTOR

بسته به شرایط رفتارهای مختلفی را نشان داده است. نشان داده شده است که mTOR می‌تواند سازگاری سلول‌های را به قند خون تنظیم کند و همچنین می‌تواند عوارض را بیشتر کند. از طرفی نشان داده شده است که مهار مزمن مسیر mTOR نیز می‌تواند دیابت را القاء کند [۱۴]. علاوه بر این، در سلول‌های عضلانی اسکلتی، مهار mTOR نیز منجر به مقاومت به انسولین توسط اختلال در سیگنالینگ AKT شده است که باعث کاهش انتقال گلوکز در سراسر غشای پلاسمایی می‌شود [۱۵].

تمرینات ورزشی منظم، عامل کاربردی مؤثری برای کنترل و درمان دیابت و کاهش مقاومت به انسولین است. نکته مهم، حجم، مدت و شدت تمرین‌ها است [۱۶]. امروزه تمرینات تناوبی با شدت بالا (High-intensity interval training; HIIT) به عنوان یکی از روش‌های تمرینی سودمند مورد توجه قرار گرفته است. همچنین هنوز تأثیرات فیزیولوژیکی تمرینات HIIT که به واسطه آنها عمل‌کرد بهبود می‌یابد، به خوبی درک نشده است [۱۷]. تمرین HIIT برخی اوقات معادل فعالیت ورزشی مقاومتی یا قدرتی قرار می‌گیرد و در چندین مطالعه مشخص شده است که منجر به تغییراتی در بیان پروتئین AKT یا اهداف پایین دست مرتبط با سنتز پروتئین مانند mTOR، P70S6K1 و 4E-BP1 می‌شود [۱۸]. با این حال، تأثیر فیزیولوژیکی تمرینات HIIT بر مسیر سیگنالینگ mTORC1 به درستی درک نشده است. محققان پژوهش حاضر تاکنون مطالعه‌ای که تأثیر تمرینات HIIT بر مسیر mTORC1 بررسی کرده باشد را مشاهده نکردند. با این

وجود، در تحقیقی Kwon و همکاران 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 AKT، mTOR، و p70S6K می‌شود. محققان در این مطالعه به این نتیجه رسیدند که تمرینات مقاومتی منجر به مهار پروتئین‌های اتوفاژی و افزایش بیان پروتئین‌های سنتز پروتئین می‌شود [۱۹]. از طرفی در تحقیقی دیگر Brook و همکاران به بررسی سازگاری هیپرتروفی عضله اسکلتی در ۳ و ۶ هفته تمرین مقاومتی برای سنتز پروتئین عضله از طریق مسیر سیگنالینگ mTORC1 پرداختند. سطوح پروتئین‌های mTOR، 4E-BP1، p70S6K1 و پروتئین AKT اندازه‌گیری شد. نتایج این مطالعه هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری را نشان نداد [۲۰].

مسیر سیگنالینگ mTORC1 و پروتئین‌های بسیار مهم این مسیر از جمله پروتئین‌های AKT1، mTOR، P70S6K1 و 4E-BP1 در سنتز پروتئین بسیار مهم هستند [۲]. همچنین بیماری دیابت نوع ۲ می‌تواند اختلال‌هایی (ترشح انسولین و کاهش سنتز پروتئین) را در مسیر mTORC1 ایجاد کند [۲۱]. از طرفی نشان داده شده است که فعالیت ورزشی می‌تواند تنظیم‌کننده این مسیر باشد که این فعال شدن توسط فعالیت‌های ورزشی مختلف نتایج متناقضی را به دنبال داشته است [۲۰-۱۹]. از طرفی از جنبه پیام‌رسانی سلولی فعالیت ورزشی اغلب به عنوان تمرینات قدرتی یا استقامتی طبقه‌بندی می‌شود و هنوز ماهیت تمرینات HIIT برای تأثیر بر مسیر

پیام‌رسانی انسولین و مسیر سیگنالینگ mTORC1 به خوبی در افراد سالم و بیمار (دیابتی) مشخص نشده است [۱۷،۱۸]؛ بنابراین هدف از تحقیق حاضر تعیین تأثیر ۴ هفته تمرین HIIT بر محتوای پروتئین‌های AKT1، mTOR، P70S6K1 و 4E-BP1 در عضله اسکلتی نعلی موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع ۲ بود.

## مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربی می‌باشد که به صورت گروه آزمایش و کنترل انجام گرفت؛ در این پژوهش، ۱۶ سر موش صحرایی صحرایی نر ۲ ماهه از نژاد اسپراگوداولی با میانگین وزن  $260 \pm 20$  گرم انتخاب شدند. موش‌های صحرایی در حیوان خانه دانشگاه علوم پزشکی شیراز با دمای  $22 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۴۰-۵۰ درصد و چرخه تاریکی-روشنایی ۱۲-۱۲ نگهداری می‌شدند. غذای حیوانات به صورت آزادانه و استاندارد مخصوص حیوانات آزمایشگاهی از دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه شد. هم-چنین آب مورد نیاز حیوانات به صورت آزاد در بطری ۵۰۰ میلی‌لیتری ویژه‌ی حیوانات آزمایشگاهی، در اختیار آن‌ها قرار داده شد. در طول مطالعه، اصول اخلاقی کار با حیوان، مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه علوم پزشکی شیراز رعایت شد (کد اخلاقی IR.SUMS.REC.1396.S1062).

برای ایجاد دیابت نوع ۲ در موش‌های صحرایی، محلول استرپتوزوتوسین (Streptozotocin; STZ) (حل شده در بافر سیترات ۰/۱ مولار با  $\text{pH}=4/5$ ) به صورت داخل صفاقی و فقط یک مرتبه با دوز ۶۰ میلی‌گرم به ازای هر

کیلوگرم از وزن بدن بعد از ۱۵ دقیقه تزریق نیکوتین‌آمید با دوز ۱۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن تزریق گردید [۲۲]. جهت اطمینان از دیابتی شدن موش‌های صحرایی، قند خون آن‌ها ۷۲ ساعت پس از تزریق با کمک گلوکومتر (مدل Active، شرکت Accu-Chek، ساخت آلمان) و نمونه خونی گرفته شده از سیاهرگ دمی موش‌ها، قند خون اندازه‌گیری شد و قند خون بیش از ۱۳۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر به عنوان شاخص دیابتی شدن نوع ۲ در نظر گرفته شد [۲۳]. یک هفته پس از القاء دیابت موش‌های صحرایی به روش تصادفی به دو گروه شامل گروه تمرین دیابتی (۸ سر) و گروه کنترل دیابتی (۸ سر) تقسیم شدند.

موش‌های گروه‌های تمرین برای آشنایی با نوارگردان (مدل A1400Y10، شرکت پیشرو اندیشه صنعت، ساخت ایران) به مدت یک هفته با سرعت ۵ تا ۱۰ متر بر دقیقه، روی نوارگردان دویدند. برنامه گروه تمرینی به مدت ۴ هفته و هر هفته ۴ جلسه بود. کل مدت‌زمان دویدن موش‌های صحرایی در هر جلسه بر روی نوارگردان ۴۴ دقیقه، شامل ۶ دقیقه گرم کردن (سرعت ۱۰ تا ۱۲ متر بر دقیقه)، ۵ دوره تمرین ۴ دقیقه‌ای با تناوب شدید (۷۰ تا ۹۵ درصد حداکثر سرعت)، ۴ دوره تمرین ۳ دقیقه تمرین با شدت کم (۵۰ تا ۶۰ درصد حداکثر سرعت) و ۶ دقیقه سرد کردن (سرعت ۱۰ تا ۱۲ متر بر دقیقه) بود. شیب نوارگردان صفر درجه و در ۴ هفته تغییری نداشت [۲۴]. در این مدت، گروه کنترل هیچ‌گونه برنامه تمرینی نداشتند. هم‌چنین موش‌های صحرایی هیچ‌گونه درمانی با انسولین را در طول دوره پژوهش نداشتند. برای از بین

سه بار شستشو با بافر فسفات نمکی توین‌دار با آنتی‌بادی ثانویه ضد خرگوشی کونژوگه با (sc-2004) HRP در دمای اتاق به مدت یک ساعت مجاور گردیدند. کمپلکس‌های ایمنی ایجاد شده با روش کمی لومینسانس و استفاده از فیلم رادیوگرافی به ظهور رسیدند. دانسیته باندها توسط نرم افزار Image J (نسخه ۱/۸/۰/۱۱۲) اندازه‌گیری شد و نتایج بعد از نرمالیزه شدن در مقابل Loading کنترل (بتا اکتین) به صورت چند برابر گروه کنترل ارائه شدند [۲۵].

در پژوهش حاضر، محتوای فسفوی (p) قبل از هر پروتئین به معنای میزان فسفو است) هر کدام از پروتئین‌ها بر محتوای تام آن‌ها بررسی شده است. ابتدا از آزمون کالموگروف اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov) برای تعیین نرمال بودن توزیع فراوانی داده‌های پژوهش استفاده شد. با توجه به نرمال بودن توزیع در متغیرها، از آزمون پارامتریک t زوجی برای مقایسه درون‌گروهی متغیر وزن و از آزمون t مستقل برای مقایسه بین گروهی متغیرهای mTOR، AKT1، P70S6K1 و 4E-BP1 استفاده شده است. تجزیه و تحلیل داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام گرفته است. سطح معنی‌داری تجزیه و تحلیل آماری در آزمون‌های تحقیق حاضر، ۰/۰۵ p در نظر گرفته شده است.

### نتایج

نتایج t زوجی نشان داد که وزن موش‌ها در هفته چهارم نسبت به هفته اول در گروه کنترل افزایش معنی‌داری یافته است (P=۰/۰۱۴)؛ اما ۴ هفته تمرین HIIT منجر به تفاوت غیر معنی‌داری (کاهش) در وزن موش‌های صحرایی

بردن آثار حاد تمرین و متغیرهای غیرقابل کنترل استرس آزمودنی‌ها در زمان اجرای برنامه تمرینی، بعد از ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، موش‌ها با رعایت اصول اخلاقی و با تزریق درون صفاقی ترکیبی از کتامین (۳۰ تا ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۳ تا ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، بی‌هوش شدند. سپس بافت عضله اسکلتی نعلی (کند انقباض) از بدن حیوان برداشته شد و در سرم فیزیولوژیک شستشو داده و سپس بلافاصله با استفاده از مایع ازت منجمد (از بخش فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه شد) و برای سنجش‌های بعدی با دمای ۸۰- در فریزر (مدل AFR-80، شرکت آرمینکو، ساخت ایران) گذاشته شد.

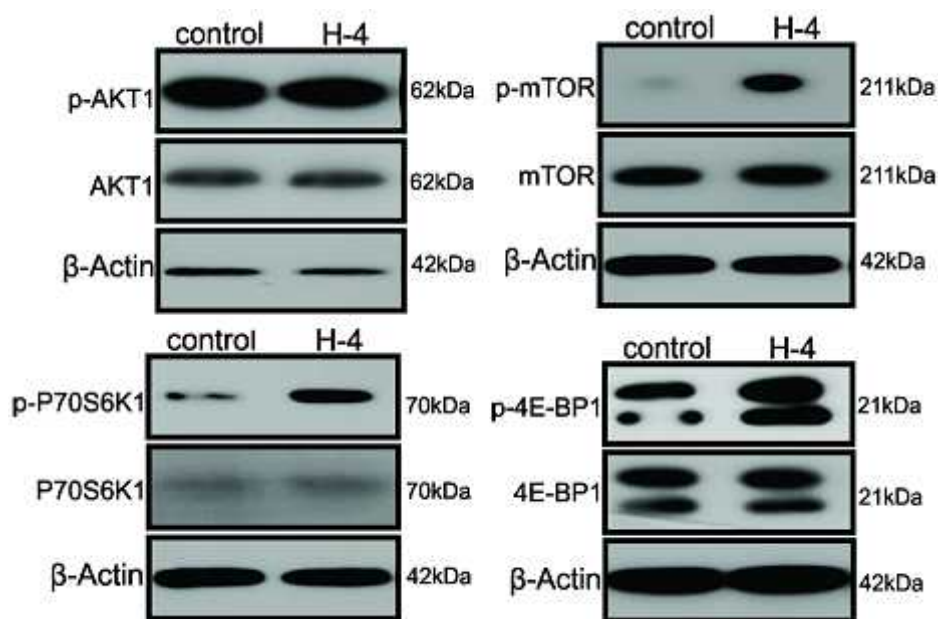
با استفاده از روش آزمایشگاهی وسترن-بلات متغیرهای پژوهش اندازه‌گیری شد. در این روش ابتدا هموژنه‌ی بافت عضله اسکلتی نعلی در لیز بافر RIPA حاوی آنتی پروتئاز کوکتیل (sigma) تهیه شد و پس از سانتریفیوژ در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و مخلوط کردن با سمپل Loading بافر، با الکتروفورز (مدل عمودی، شرکت BioRad، ساخت آمریکا) در ژل آکریلامید حاوی سدیم دودسیل سولفات (Sodium dodecyl sulfate; SDS) تفکیک شدند. بعد از تفکیک، باندهای پروتئینی بر روی غشاء انتقال داده شده و بعد از بلوکه‌کردن غشا با محلول سرم آلبومین گاوی ۳ درصد به مدت یک ساعت در دمای آزمایشگاه با آنتی‌بادی اولیه خرگوشی (anti-AKT1 (sc-52940)، anti-mTOR (Sc-293133)، anti-P70S6K1 (Sc-11759) و anti-4E-BP1 (#-2855) رقیق شده (۱/۵۰۰) در محلول بلاکینگ به مدت یک شب در دمای ۴ درجه پروب شدند. پس از

گروه تمرین در هفته چهارم نسبت به هفته اول شد (P=۰/۶۸۲).  
 از طرفی دیگر متغیرهای تحقیق از طریق آزمون آماری t مستقل مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که به دنبال ۴ هفته تمرین تناوبی با شدت بالا، تفاوت معنی داری میان محتوای پروتئین pAKT1<sup>ser473</sup>/AKT1 (P=۰/۶۲۴) و پروتئین pP70S6K1<sup>Thr384</sup>/P70S6K1 در بین گروه های تمرین و کنترل وجود ندارد؛ اما این تفاوت در محتوای پروتئین pmTOR<sup>ser2448</sup>/mTOR (P=۰/۱۵۳) و پروتئین p4E-BP1<sup>Thr37/46</sup>/4E-BP1 (P=۰/۰۰۲) بود (جدول ۱ و شکل ۱).

جدول ۱- میانگین و انحراف استاندارد وزن و متغیرهای پژوهش در گروه های تمرین (n=۸) و کنترل (n=۸) پس از ۴ هفته تمرین HIIT در سال ۱۳۹۷

متغیر	گروه	میانگین	انحراف استاندارد	مقدار t	سطح معنی داری
وزن (گرم)	کنترل (هفته اول)	۲۶۱/۸۳	۱۲/۴۶	۳/۴۰۶	۰/۰۱۴
	تمرین (هفته چهارم)	۳۱۵/۰۰	۲۷/۹۲		
محتوای پروتئین pAKT1 <sup>ser473</sup> /AKT1	کنترل (هفته اول)	۲۸۰/۳۳	۳۸/۶۸	۰/۴۳۱	۰/۶۸۲
	تمرین (هفته چهارم)	۲۷۳/۶۷	۱۰/۸۱		
محتوای پروتئین pmTOR <sup>ser2448</sup> /mTOR	کنترل	۱/۰۰	۰/۰۱	۰/۵۱۷	۰/۶۲۴
	تمرین	۱/۰۱	۰/۰۷		
محتوای پروتئین pP70S6K1 <sup>Thr384</sup> /P70S6K1	کنترل	۱/۰۰	۰/۰۲	۳/۳۵۷	۰/۰۱۵
	تمرین	۱/۲۱	۰/۱۲		
محتوای پروتئین p4E-BP1 <sup>Thr37/46</sup> /4E-BP1	کنترل	۱/۰۰	۰/۰۲	۱/۶۳۵	۰/۱۵۳
	تمرین	۱/۰۶	۰/۰۷		
محتوای پروتئین	کنترل	۱/۰۰	۰/۰۱	۵/۳۴۱	۰/۰۰۲
	تمرین	۱/۲۲	۰/۰۸		

آزمون زوجی و t مستقل، اختلاف معنی داری ۰/۰۵ p



شکل ۱- مقایسه محتوای پروتئین‌های *AKT1*، *mTOR*، *P70S6K1* و *4E-BP1* در گروه‌های تمرین ( $n=8$ ) و کنترل ( $n=8$ ) پس از ۴ هفته تمرین HIIT در سال ۱۳۹۷. (تصاویر ایمونوبلاتینگ پروتئین‌ها و *actin* - به عنوان *Loading* کنترل در بافت عضله اسکلتی نعلی)

## بحث

خواهد داد و تجزیه پروتئین را افزایش می‌دهد [۲۱]. محققان این مطالعه تاکنون پژوهشی که به طور مستقیم تأثیر تمرینات HIIT بر محتوای پروتئین‌های *AKT1*، *mTOR*، *P70S6K1* و *4E-BP1* در افراد دیابت نوع ۲ را بررسی کرده باشند، مشاهده نکرده‌اند. بیشترین پژوهش‌ها بر روی تمرینات مقاومتی و استقامتی متمرکز شده است و تاکنون به درستی ماهیت تمرینات HIIT مشخص نشده است.

با این حال، در مطالعه‌ای Chavanelle و همکاران به بررسی اثرات تمرینات HIIT بر روی میزان پروتئین *AKT* عضله اسکلتی موش‌های دیابتی پرداختند. این مطالعه افزایش معنی‌داری را در بیان پروتئین *AKT* در عضله دوقلو و نعلی توسط تمرین HIIT نشان داد [۲۶]. نتایج این تحقیق با نتایج تحقیق حاضر در یک راستا نمی‌باشد؛

نتایج این پژوهش، افزایش معنی‌داری را در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل در محتوای پروتئین‌های *mTOR* و *4E-BP1* نشان داد؛ اما این افزایش در محتوای پروتئین‌های *AKT1* و *P70S6K1* معنی‌دار نبود.

دیابت نوع ۲ این پتانسیل را دارد که همئوستاز پروتئین را تحت تأثیر قرار دهد. به طور خاص، در افراد دیابت نوع ۲ مقاومت به انسولین وجود دارد که این امر منجر به اختلال در سنتز پروتئین و سوخت و ساز از طریق مسیر *PI3K/AKT1* می‌شود؛ بنابراین، اختلال سیگنالینگ انسولین می‌تواند انتقال اسیدآمین به داخل سلول‌های عضلانی و سنتز پروتئین عضله را کاهش دهد. از طرفی کنترل نکردن دیابت نوع ۲ در افراد، به طور قابل توجهی میزان سنتز پروتئین عضلانی پایه را تحت تأثیر قرار

زیرا در تحقیق حاضر محتوای پروتئین AKT افزایش معنی‌داری نیافته است. به خوبی مشخص شده است که مسیر فعال شدن AKT مسیر اصلی برای فعال کردن کمپلکس mTOR و سنتز پروتئین است؛ اما در تحقیق حاضر به دنبال ۴ هفته فعالیت ورزشی محتوای پروتئین mTOR افزایش معنی‌داری داشته است و این در صورتی است که محتوای AKT تفاوت معنی‌داری نداشته است پس نمی‌توان گفت که پروتئین AKT منجر به فعال شدن mTOR شده است. mTOR از مسیرهای مختلفی می‌تواند فعال شود اما به طور کامل مشخص نشده است که تمرینات ورزشی از کدام مسیر باعث فسفوریله و فعال شدن mTOR می‌شود [۲۷]. یکی از مسیرهای پیشنهاد شده مسیر IGF-1/PI3K/AKT است که با توجه به نتایج تحقیق حاضر که منجر به فعال شدن AKT نشد مورد تردید است [۲۸]. نظریه‌ای که به تازگی ارائه شده است، نظریه گیرنده‌های مکانیکی در سطح سلول‌های مانند انتگرین، دسیتروفن و کانال‌های فعال شده از طریق کشش است. با توجه به نتیجه تحقیق حاضر می‌توان گفت که فعالیت ورزشی با تأثیر بر بعضی از پروتئین‌ها و مکانیسم‌ها می‌تواند به صورت مستقل منجر به فعال شدن mTOR شود [۲۹]. با این حال باید مطالعات بیشتری در این زمینه انجام گیرد.

در تحقیقی دیگر Luciano و همکاران به بررسی اثر تمرینات مقاومتی بر سطوح پروتئین‌های AKT، mTOR و 4E-BP1 پرداختند. نتایج این مطالعه تفاوت معنی‌داری را به دنبال فعالیت ورزشی مقاومتی در عضله چهار سر موش‌های صحرائی نشان دادند [۳۰]. نتایج تحقیق حاضر

و مطالعه گزارش شده نشان دادند که به دنبال فعالیت ورزشی HIIT و مقاومتی سطوح پروتئین‌های mTOR و 4E-BP1 افزایش پیدا می‌کند؛ بنابراین با توجه به این افزایش می‌توان گفت که فعالیت ورزشی HIIT منجر به فعال کردن مسیر mTORC1 می‌شود. مهم‌ترین تأثیر مسیرهای پیام‌رسانی mTORC1 اثر بر پروتئین‌های درگیر در کنترل ترجمه یعنی پروتئین‌های P70S6K1 و 4E-BP1 است [۸]. فسفوریلاسیون P70S6K باعث سنتز پروتئین در ریبوزوم می‌شود [۹]. در تحقیق حاضر سطوح پروتئین P70S6K1 در جایگاه ترئونین ۳۸۴ اندازه‌گیری شده است که افزایش معنی‌داری را نشان نداد؛ بنابراین تمرینات HIIT در عضله اسکلتی نعلی افراد دیابتی نوع ۲ نمی‌تواند از طریق فعال کردن جایگاه ترئونین ۳۸۴ در پروتئین P70S6K1 منجر به سنتز پروتئین از طریق فعال کردن مسیر mTORC1 شود. از طرفی، محتوای پروتئین 4E-BP1 در تحقیق حاضر افزایش معنی‌داری یافته است که مسیر mTOR/4E-BP1 یکی از مسیرهای اصلی در سنتز پروتئین است؛ بنابراین، mTOR آثار آنابولیک خود را با مسدود کردن پروتئین ۱ متصل به فاکتور مسدود کننده یوکاریوتی 4E (Inhibiting eukaryotic initiation) factor 4E-binding protein 1; eIF4EB1 اعمال می‌کند [۳۱-۳۲].

### نتیجه‌گیری

در نهایت، استفاده از تمرین HIIT به عنوان بخشی از برنامه مدیریت پزشکی برای بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ ثابت و امیدوار کننده است. نتایج این پژوهش نیز نشان



داد که فعالیت ورزشی HIIT با افزایش پروتئین mTOR و پروتئین 4E-BP1 می‌تواند منجر به سنتز پروتئین در عضله اسکلتی نعلی موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع ۲ شود؛ بنابراین، با توجه به افزایش غیرمعنی‌دار پروتئین بالا دست (AKT1) که منجر به فعال‌شدن مسیر mTORC1 می‌شود، می‌توان نتیجه گرفت که فعالیت ورزشی به طور مستقل می‌تواند مسیرهای پایین دست

منتهی به سنتز پروتئین را فعال کند و منجر به سنتز پروتئین شود.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری اساتید دانشکده علوم پزشکی دانشگاه شیراز و همه افرادی که در این امر مهم ما را یاری کردند، تقدیر می‌شود.

## References

- [1] Lee SW, Youm Y, Lee WJ, Choi W, Chu SH, Park YR, et al. Appendicular skeletal muscle mass and insulin resistance in an elderly Korean population: the Korean social life, health and aging project-health examination cohort. *Diabetes metab J* 2015; 39 (1): 37-45.
- [2] Hobert JA, Embacher R, Mester JL, Frazier II TW, Eng C. Biochemical screening and PTEN mutation analysis in individuals with autism spectrum disorders and macrocephaly. *Eur J Med Genet* 2014; 22 (2): 273-76.
- [3] Mackenzie RW, Elliott BT. Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes. *Diabet Metab Syndr Obes* 2014; 7:55-64.
- [4] Lipton JO, Sahin M. The neurology of mTOR. *Neuron* 2014; 84 (2): 275-91.
- [5] Bar-Peled L, Sabatini DM. Regulation of mTORC1 by amino acids. *Trends Cell Biol* 2014; 24 (7): 400-6.
- [6] Albert V, Hall MN. mTOR signaling in cellular and organismal energetics. *Curr Opin Cell Biol* 2015; 33: 55-66.
- [7] Goodman CA. The role of mTORC1 in regulating protein synthesis and skeletal muscle mass in response to various mechanical stimuli. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2013; 166: 43-95.
- [8] Ci Y, Shi K, An J, Yang Y, Hui K, Wu P, et al. ROS inhibit autophagy by downregulating ULK1 mediated by the phosphorylation of p53 in selenite-treated NB4 cells. *Cell Death Dis* 2014; 5 (11): 1-10.
- [9] Datan E, Shirazian A, Benjamin S, Matassov D, Tinari A, Malorni W, et al. mTOR/p70S6K

- signaling distinguishes routine, maintenance-level autophagy from autophagic cell death during influenza A infection. *Virology* 2014; 452: 175-90.
- [10] Sengupta S, Peterson TR, Sabatini DM. Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol Cell* 2010; 40 (2): 310-22.
- [11] Peter D, Igreja C, Weber R, Wohlbold L, Weiler C, Ebertsch L, et al. Molecular architecture of 4E-BP translational inhibitors bound to eIF4E. *Mol Cell* 2015; 57 (6): 1074-87.
- [12] Suhara T, Baba Y, Shimada BK, Higa JK, Matsui T. The mTOR signaling pathway in myocardial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Curr Diab Rep* 2017; 17 (6): 38.
- [13] Rozenfurt E. Mechanistic target of rapamycin (mTOR): a point of convergence in the action of insulin/IGF-1 and G protein-coupled receptor agonists in pancreatic cancer cells. *Front Physiol* 2014; 5: 1-8.
- [14] Xie J, Herbert TP. The role of mammalian target of rapamycin (mTOR) in the regulation of pancreatic -cell mass: implications in the development of type-2 diabetes. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69 (8): 1289-304.
- [15] Yang SB, Lee HY, Young DM, Tien AC, Rowson-Baldwin A, Shu YY, et al. Rapamycin induces glucose intolerance in mice by reducing islet mass, insulin content, and insulin sensitivity. *J Mol Med* 2012; 90 (5): 575-85.
- [16] Colberg SR, Sigal RJ, Fernhall B, Regensteiner JG, Blissmer BJ, Rubin RR, et al. Exercise and type 2 diabetes: the American College of Sports Medicine and the American Diabetes Association: joint position statement executive summary. *Diabetes Care* 2010; 33 (12): 2692-6.
- [17] Khoramshahi S. Effect of five weeks of high-intensity interval training on the expression of miR-23a and Atrogin-1 in gastrocnemius muscles of diabetic male rats. *Iran J Endo Metab* 2017; 18 (5): 361-7.[farsi]
- [18] Lane MT, Herda TJ, Fry AC, Cooper MA, Andre MJ, Gallagher PM. Endocrine responses and acute mTOR pathway phosphorylation to resistance exercise with leucine and whey. *Biol Sport* 2017; 34(2): 197-203.
- [19] Kwon I, Jang Y, Cho JY, Jang YC, Lee Y. Long-term resistance exercise-induced muscular hypertrophy is associated with autophagy modulation in rats. *J Physiol Sci* 2018; 68 (3): 269-80.
- [20] Brook MS, Wilkinson DJ, Mitchell WK, Lund JN, Szewczyk NJ, Greenhaff PL, et al. 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. *FASEB J* 2015; 29 (11): 4485-96.

- [21] Gougeon R, Morais JA, Chevalier S, Pereira S, Lamarche M, Marliss EB. Determinants of whole-body protein metabolism in subjects with and without type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2008; 31 (1): 128-33.
- [22] Pierre W, Gildas AJ, Ulrich MC, Modeste WN, azTélesphore Benoît N, Albert K. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Bersama engleriana* leaves in nicotinamide/streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *BMC Complement Altern Med* 2012; 12 (1): 1-6.
- [23] Shirwaikar A, Rajendran K, Barik R. Effect of aqueous bark extract of *Garuga pinnata* Roxb. in streptozotocin-nicotinamide induced type-II diabetes mellitus. *J Ethnopharmacol* 2006; 107 (2): 285-90.
- [24] Fallahi A, Gaeini A, Shekarfroush S, Khoshbaten A. Cardioprotective effect of high intensity interval training and nitric oxide metabolites (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). *Iran J Public Health* 2015; 44 (9): 1270-6.
- [25] Khani M, Motamedi P, Dehkhoda MR, Nikukheslat SD, Karimi P. Effect of thyme extract supplementation on lipid peroxidation, antioxidant capacity, PGC-1 content and endurance exercise performance in rats. *J Int Soc Sports Nutr* 2017; 14 (1): 1-8.
- [26] Chavanelle V, Boisseau N, Otero YF, Combaret L, Dardevet D, Montaurier C, et al. Effects of high-intensity interval training and moderate-intensity continuous training on glycaemic control and skeletal muscle mitochondrial function in db/db mice. *Sci Rep* 2017; 7(1): 1-10.
- [27] Spangenburg EE, Le Roith D, Ward CW, Bodine SC. A functional insulin like growth factor receptor is not necessary for load induced skeletal muscle hypertrophy. *J Physiol* 2008; 586 (1): 283-91.
- [28] Philp A, Hamilton DL, Baar K. Signals mediating skeletal muscle remodeling by resistance exercise: PI3-kinase independent activation of mTORC1. *J Appl Physiol* 2010; 110 (2): 561-8.
- [29] Pankov R, Cukierman E, Clark K, Matsumoto K, Hahn C, Poulin B, et al. Specific  $\alpha 1$  integrin site selectively regulates Akt/protein kinase B signaling via local activation of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* 2003; 278 (20): 18671-81.
- [30] Luciano TF, Marques SO, Pieri BL, De Souza DR, Araújo LV, Nesi RT, et al. Responses of skeletal muscle hypertrophy in Wistar rats to different resistance exercise models. *Physiol Res* 2017; 66 (2): 317-23.
- [31] Glass DJ. PI3 kinase regulation of skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Curr Top Microbiol Immunol* 2010; 267-78.
- [32] Showkat M, Beigh MA, Andrabi KI. mTOR signaling in protein translation regulation: implications in cancer genesis and therapeutic interventions. *Mol Bio Int* 2014; 1-14.

## The Effect of 4 Weeks of High Intensity Interval Training on the Content of AKT1, mTOR, P70S6K1 and 4E-BP1 in Soleus Skeletal Muscle of Rats with Type 2 Diabetes: An Experimental Study

M. Sherafati Moghadam<sup>1</sup>, M. Salesi<sup>2</sup>, F. Daryanoosh<sup>3</sup>, M. Hemati Nafar<sup>4</sup>, A. Fallahi<sup>5</sup>

Received: 12/05/2018 Sent for Revision: 14/07/2018 Received Revised Manuscript: 15/09/2018 Accepted: 18/09/2018

**Background and Objectives:** The most important mechanism of protein synthesis muscle is the mTORC1 pathway in skeletal muscle in which very important proteins play role. Diabetes disturbs this pathway through generating resistance to insulin. The effect of high intensity interval training (HIIT) has not been studied yet on this important pathway in type 2 diabetes. Therefore, the purpose of the present study was to determine the effect of 4 weeks of HIIT on the content of AKT1, mTOR, P70S6K1 and 4E-BP1 proteins in soleus skeletal muscle of rats with type 2 diabetes.

**Materials and Methods:** In this experimental study, 16 two-month old Sprague-Dawely male rats with an average weight of 260±20 were selected and randomly divided into two groups after being infected to diabetes through STZ induction: diabetic control (n=8) and diabetic training (n=8). The training group exercised 4 weeks (4 days a week) while the control group had no training program. Paired t-test and independent t-test were used to analyze the data.

**Results:** There was a significant increase in the content of mTOR (p=0.015) and 4E-BP1 (p=0.002) proteins in the training group compared to the control one. However, there was no significant difference in the content of proteins AKT1 (p=0.624) and P70S6K1 (p=0.153) in the two groups. .

**Conclusion:** Considering the increase in the content of mTOR and 4E-BP1 proteins in soleus skeletal muscle tissue in type 2 diabetic rats, it can be concluded that 4 weeks of HIIT exercise can synthesize protein through mTOR/4E-BP1 pathway.

**Key words:** High Intensity Interval Training, mTOR, Soleus Skeletal Muscle, Type 2 Diabetes, 4E-BP1, Rat

**Funding:** This study did not have any funds.

**Conflict of interest:** None declared.

**Ethical approval:** The Ethics Committee of Shiraz University of Medical Sciences approved the study (IR.SUMS.REC.1396.S1062).

**How to cite this article:** Sherafati Moghadam M, Salesi M, Daryanoosh F, Hemati Nafar M, Fallahi A. The Effect of 4 Weeks of High Intensity Interval Training on the Content of AKT1, mTOR, P70S6K1 and 4E-BP1 in Soleus Skeletal Muscle of Rats with Type 2 Diabetes: An Experimental Study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2018; 17 (9): 843-54. [Farsi]

1- PhD Student of Exercise Physiology, Dept. of Sport Sciences, Faculty of Education and Psychology, Shiraz University, Shiraz, Iran, ORCID: 0000-0002-8697-2278.

2- Associate Prof. of Exercise Physiology, Dept. of Sport Sciences, Faculty of Education and Psychology, Shiraz University, Shiraz, Iran, ORCID: 0000-0002-6829-8611.

3- Associate Prof., Dept. of Sport Sciences, Faculty of Education and Psychology, Shiraz University, Shiraz, Iran. ORCID: 0000-0001-6961-886X.

(Corresponding Author): Tel: (071)36135250, Fax: (071)36272748, Email: daryanoosh@shirazu.ac.ir.

4- Assistant Prof. of Exercise Physiology, Dept. of Sport Sciences, Faculty of Education and Psychology, Shiraz University, Shiraz, Iran, ORCID: 0000-0002-5802-4174.

5- Assistant Prof. of Exercise Physiology, Dept. of Sport Sciences, Faculty of Education and Psychology, Shiraz University, Shiraz, Iran, ORCID: 0000-0003-4601-577X.