The effect of high-intensity interval training on the content of autophagy proteins (BECLIN1 and AMBRA1) in the skeletal muscle of aged rats

Hamid Khodaverdi[1], Neda Aghaei Bahmanbeglou[*], Saeedeh Shadmehri[2]

1. Department of Physical Education and Sport Sciences, Aliabad Katoul Branch, Islamic Azad University, Aliabad Katoul, Iran.
2. Department of Physical Education and Sport Science, Yadegar-e-Imam Khomeini (RAH) Shahre-rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Received: 05 April 2024; Accepted: 22 May 2024, Published: 18 June 2024

Abstract

Introduction: One of the complications associated with aging is the reduction of muscle volume, which is caused by defects in cellular pathways such as autophagy. Exercises can be a key factor in reversing or increasing this complication; Therefore, the aim of this research is the effect of high-intensity interval training (HIIT) on the content of autophagy proteins (BECLIN1 and AMBRA1) in the skeletal muscle of aged rats.

Materials and Methods: The current research is of experimental-fundamental type, in which 12, 20-month-old male Sprague-Dawley rats with an average weight of 400±30 grams were randomly divided into 2 groups: 1) control (6 rats) and 2) HIIT (6 rats). The HIIT training program consisted of 8 weeks and 3 sessions per week with an intensity of 85-90% of VO2max. The number of frequencies in the first to fourth weeks included 4 frequencies of 1 minute with an intensity of 85-90% of VO2max and 4 repetitions of 2 minutes with an intensity of 45-50% of VO2max. In the seventh and eighth week, he reached 6 frequencies of 1 minute with an intensity of 85-90% of VO2max and 6 frequencies of 2 minutes with an intensity of 45-50% of VO2max. The slope was constant at 10 degrees in all weeks. After 48 hours after the last training session, the EDL muscle tissue of the rats was removed. Data analysis Data were analysed through independent t-test in SPSS version 27 and GraphPad Prism version 2.2.10 software. The significance level was less than $p \geq 0.05$.

Results: Eight weeks of HIIT training increased BECLIN1 protein intracellular content (P=0.001) and decreased AMBRA1 protein intracellular content (P=0.001) in EDL muscle of aged rats. Cohen's test was strong for measuring the effect size of BECLIN1 protein content (ES=6.21) and for AMBRA1 protein content (ES=4.27).

Conclusion: Considering the conflicting results in the content of BECLIN1 and AMBRA1 proteins, it suggests that the adaptive responses of HIIT differ in the regulation of the autophagy pathway. This difference may be due to training conditions such as intensity, number of frequencies and duration of exercise training as well as the physiological conditions of the subjects, although more research is needed in this area.

Keywords: HIIT, Autophagy, Aging, BECLIN1 Protein, AMBRA1 Protein

[1] **. Corresponding author**

Neda Aghaei Bahmanbeglou

Address: University Blvd, Islamic Azad University, Aliabad Katoul Branch, Aliabad Katoul, Golestan, Postal Code: 4941793451

Tel: 09191992996

Email: nedaaghaei@aliabadiau.ac.ir

تاثیر تمرین تناوبی پرشدت بر محتوای پروتئین‌های اتوفاژی (BECLIN1 و AMBRA1) در عضله اسکلتی موش‌های صحرایی سالمند

حمید خداوردی[۱]، ندا آقایی بهمن‌بگلو*[۱]، سعیده شادمهری[۲]

۱. گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد علی‌آباد کتول، دانشگاه آزاد اسلامی، علی‌آباد کتول، ایران.

۲. گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهر ری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۶/ ۱/ ۱۴۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۲۲ ، تاریخ چاپ: ۲۹/ ۳/ ۱۴۰۳

چکیده

زمینه و هدف: یکی از عوارض مرتبط با سالمندی کاهش حجم عضلانی است که نقص در مسیرهای سلولی مانند اتوفاژی در تنظیم آن نقش دارد؛ فعالیت‌های ورزشی می‌تواند یک عامل کلیدی در معکوس یا افزایش این عارضه باشد؛ بنابراین هدف از انجام تحقیق حاضر تاثیر تمرین تناوبی پرشدت (HIIT) بر محتوای پروتئین‌های اتوفاژی (BECLIN1 و AMBRA1) در عضله اسکلتی موش‌های صحرایی سالمند می‌باشد.

مواد و روش‌ها: پژوهش حاضر از نوع تجربی-بنیادی می‌باشد که ۱۲ سر موش صحرایی نر ۲۰ ماهه از نژاد اسپراگ‌داولی با میانگین وزنی ۳۰±۴۰۰ گرم به‌صورت تصادفی به ۲ گروه ۱) کنترل (۶ سر) و ۲) HIIT (۶ سر) تقسیم شدند. برنامه تمرین HIIT شامل ۸ هفته و هفته‌ای ۳ جلسه با شدت ۸۵-۹۰ درصد VO_2max بود. تعداد تکرارها هفته‌های اول تا چهارم شامل ۴ تکرار ۱ دقیقه‌ای با شدت ۸۵-۹۰ درصد VO_2max و ۴ تکرار ۲ دقیقه‌ای با شدت ۴۵-۵۰ درصد VO_2max بود که در هفته هفتم و هشتم به ۶ تکرار ۱ دقیقه‌ای با شدت ۸۵-۹۰ درصد VO_2max و ۶ تکرار ۲ دقیقه‌ای با شدت ۴۵-۵۰ درصد VO_2maxرسید. شیب در تمام هفته ها ۱۰ درجه ثابت بود. بعد از ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین بافت عضله EDL بدن موش‌های صحرایی برداشته شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها از طریق آزمون t-مستقل در نرم‌افزارهای SPSS نسخه ۲۷ و گراف‌پد پریسم نسخه ۱۰/۲/۲ انجام شد. سطح معناداری کمتر از $p\leq ۰/۰۵$ بود.

یافته‌ها: هشت هفته تمرین HIIT منجر به افزایش محتوای درون سلولی پروتئین BECLIN1 (P=۰/۰۰۱) و کاهش محتوای درون سلولی پروتیئن AMBRA1 (P=۰/۰۰۱) در عضله EDL موش‌های صحرایی سالمند شد. آزمون کوهن برای اندازه‌گیری اندازه اثر محتوای پروتئین BECLIN1، (ES=۶/۲۱) و برای محتوای پروتئین AMBRA1، (ES=۴/۲۷) اثری قوی بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج متناقض در محتوای پروتئین‌های BECLIN1 و AMBRA1 نشان می‌دهد که در تنظیم مسیر اتوفاژی پاسخ‌های تطبیقی HIIT متفاوت است. این تفاوت ممکن است به دلیل شرایط تمرینی مانند شدت، تعداد تکراها و مدت زمان تمرین ورزشی و همچنین شرایط فیزیولوژیکی آزمودنی‌ها باشد، اگرچه تحقیقات بیشتری در این زمینه مورد نیاز است.

واژگان کلیدی: تمرین تناوبی پرشدت، اتوفاژی، سالمندی، پروتئین BECLIN1، پروتئین AMBRA1

[۱]. **نویسنده مسوول**

ندا آقایی بهمن بگلو

نشانی: گلستان، شهرستان علی‌آباد کتول، بلوار دانشگاه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علی‌آباد کتول، کد پستی: ۴۹۴۱۷۹۳۴۵۱

تلفن: ۰۹۱۹۱۹۹۲۹۹۶،

ایمیل: nedaaghaei@aliabadiau.ac.ir

مقدمه

سالمندی یک فرآیند بیولوژیکی است که با کاهش عملکردی وابسته به زمان مشخص می‌شود و منجر به کاهش کیفیت زندگی برای انسان یا هر موجود زنده‌ای می‌شود. در این راستا، سالمندی عامل خطری برای ابتلا به بیماری‌های از جمله بیماری‌هایی مانند سارکوپنیا، قلبی-عروقی، سرطان و بیماری‌های نوروژنیک می‌شود. به طور خلاصه، بیماری‌های مرتبط با سن، نشان دهنده یک بار اجتماعی اقتصادی جهانی و چالش‌های مهم مراقبت‌های بهداشتی است (۱, ۲).

کاهش حجم عضلانی ناشی از سالمندی یا سارکوپنیا منجر به کاهش تدریجی توده و قدرت/عملکرد عضلات اسکلتی در طول فرآیند سالمندی می‌شود. این عارضه به طور فزاینده‌ای به عنوان یک عامل مرتبط در بروز پیامدهای نامطلوب سلامتی از جمله افتادن، عوارض ناتوانی و از دست دادن استقلال در مراحل پایانی جمعیت سالمند در نظر گرفته می‌شود (۳). مهمتر از همه، بیشتر تحقیقات قبلی تغییرات قابل توجه یا نقص در سیگنالینگ وابسته به اتوفاژی در سارکوپنیا را تایید کرده‌اند (۴).

اتوفاژی، یک فرآیند سلولی حیاتی است که به لیزوزوم برای تخریب انتقال می‌یابد و مسئول پاکسازی اندامک‌های آسیب‌دیده و حفظ هموستاز سلولی است (۵). اتوفاژی که توسط استرس درون‌زا و برون‌زا، مانند گرسنگی، استرس اکسیداتیو، تابش بیش از نور خورشید، اشعه‌های فرابنفش و عفونت ویروسی ایجاد می‌شود؛ به طور کلی بر اساس روش‌های مختلف انتقال سوبسترا آن به سه نوع طبقه‌بندی (میکرواتوفاژی، ماکرواتوفاژی و اتوفاژی وابسته به چاپرون‌ها) می‌شود (۶-۴). فرآیند خاص اتوفاژی نسبتاً پیچیده است و تحت تنظیم دقیق و ظریف ژن‌های مرتبط با اتوفاژی و مسیر وابسته قرار دارد (۷, ۸). اتوفاژی پروتئین‌های تانشده را هضم، استرس اکسیداتیو را سرکوب و سایتوکین‌های التهابی را کاهش می‌دهد تا از عملکرد مناسب اندامک‌ها و سلول‌ها اطمینان حاصل شود (۱۱-۹).

BECLIN1، پروتئین کدگذاری‌شده توسط ژن BECN1، برای اتوفاژی ضروری است (۱۲). BECLIN1 در فرآیندهای اتوفاژی که به بازسازی بافت عضلانی کمک می‌کند، درگیر است (۱۳, ۱۴). در طول فعالیت‌های ورزشی یا آسیب، سلول‌های عضلانی ممکن است آسیب ببینند و اتوفاژی که تا حدی توسط BECLIN1 انجام می‌شود، برای حذف اجزای سلولی آسیب‌دیده و جایگزینی آنها با اجزای جدید ضروری است (۱۵). از طرفی مولکول فعال در اتوفاژی تنظیم‌شده با BECLIN1 (AMBRA1)[1] یک پروتئین ذاتا اختلال‌زا است که به عنوان یک داربست عمل می‌کند و در فرآیندهای سلولی متعدد از جمله چرخه سلولی، تکثیر و اتوفاژی نقش دارد (۱۶). پروتئین AMBRA1 از میتوکندری به شبکه سارکوپلاسمیک منتقل می‌شود و اتوفاژی وابسته به BECLIN1 و آپوپتوز را تنظیم می‌کند. نشان داده شده است که تنظیم AMBRA1 در بهبود بازسازی سلول‌های عضلانی مؤثر است (۱۷).

تمرین اینتروال که اغلب به عنوان تمرین تناوبی پرشدت یا تناوبی با شدت بالا (HIIT)[2] شناخته می‌شود، یک روش تمرینی است که وهله‌های ورزشی با شدت بالا با دوره‌های ریکاوری فعال یا غیرفعال آمیخته می‌شود و می‌تواند از چند ثانیه تا چند دقیقه طول بکشد (۱۸). بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که HIIT می‌تواند یک روش کارآمد و موثر برای بهبود سلامت، آمادگی جسمانی و عملکرد ورزشی برای جمعیت‌های بالینی، افراد سالم و ورزشکاران باشد (۱۹). اگرچه HIIT به طور گسترده در بسیاری از ورزش‌ها استفاده می‌شود، اما تجویز جلسات HIIT شامل پارامترهای متعددی مانند تعداد ست‌ها و تکرارها در هر ست، مدت و شدت فواصل با شدت بالا و ریکاوری و غیره است (۲۰). به طور سنتی، فعالیت‌های ورزشی منظم به عنوان یک راهکار معتبر برای تنظیم حجم عضلانی در نظر گرفته می‌شود. با این حال، امروزه، HIIT به عنوان روشی موثرتر و با زمان

[1] Autophagy and Beclin 1 Regulator 1
[2] High-Intensity Interval Training

کارآمدتر برای جایگزینی حالت‌های تمرین سنتی ظاهر شده است. HIIT اثرات جامعی بر ظرفیت تمرین و متابولیسم عضلات اسکلتی نشان می‌دهد و بدون ایجاد عوارض جانبی مزمن، زمان بازیابی عملکردهای قلبی ریوی و عضلانی را فراهم می‌کند (۱۹). مطالعات نشان داد که در مقایسه با تمرین‌های هوازی سنتی، HIIT اثرات مشابه یا حتی بالاتری در بهبود قدرت عضلانی، افزایش عملکرد فیزیکی و افزایش توده عضلانی افراد مسن دارد. بنابراین، HIIT ممکن است به روشی امیدوارکننده برای مقابله با از دست دادن توده عضلانی و عملکرد عضلانی مرتبط با سن تبدیل شود (۲۱). در ارتباط با تاثیر تمرین‌های ورزشی بر مسیرهای سلولی و ملکولی در تنظیم محتوای پروتئین‌های درگیر در کاهش یا افزایش بافت عضلانی، در تحقیقی نشان دادند که تمرین مقاومتی بر محتوای پروتئین Beclin1 در افراد مسن افزایش معناداری می‌یابد. تمرین مقاومتی در این تحقیق شامل ۱۶ جلسه تمرین به‌مدت ۸ هفته بود (۲۲). در تحقیقی دیگر به بررسی تاثیر پاسخ اتوفاژی به تمرین ورزش هوازی در عضله اسکلتی موش‌های صحرایی جوان و مسن پرداختند. تمرین ورزشی شامل ۸ هفته دویدن بر روی تردمیل مخصوص جوندگان بود. پروتکل تمرینی با شیب ۵ درجه، سرعت حدود ۱۶ متر بر دقیقه، مدت زمان ۴۰ دقیقه در روز و ۵ روز در هفته انجام شد. در موش‌های جوان محتوای پروتئین Beclin1 کاهش را نشان داد. در مقابل در در گروه‌های مسن محتوای پروتئین Beclin1 افزایش یافته بود (۲۳).

شناخت مسیرهایی سلولی که در تشدید کاهش حجم عضلانی در دوران سالمندی رخ می‌دهد حائز اهمیت است و همچنین شناخت عوامل موثر مانند تمرین‌های ورزشی جدید که می‌تواند در افزایش حجم و قدرت عضلانی و در نهایت کنترل سلامت بدن در دوران سالمندی شود، مهم است (۲۴, ۲۵). پروتئین‌های مورد مطالعه در این تحقیق از عوامل کلیدی در تنظیم مسیر اتوفاژی (پروتئین‌های BECLIN1 و AMBRA1) است که می‌تواند منجر به تشدید بیش از حد کاهش حجم عضلانی و در نهایت قدرت شود. HIIT می‌تواند سبب افزایش حجم عضلانی و در نهایت قدرت بدنی شود. بنابراین هدف از انجام تحقیق حاضر تاثیر هشت هفته تمرین HIIT بر محتوای پروتئین‌های اتوفاژی BECLIN1 و AMBRA1 در عضله EDL موش‌های صحرایی سالمند می‌باشد.

روش‌شناسی تحقیق

نمونه و نوع تحقیق

پژوهش حاضر از نوع تجربی-بنیادی بود که به‌صورت گروه تجربی و کنترل انجام گرفت؛ در این پژوهش، ۱۲ سر موش صحرایی نر ۲۰ ماهه از نژاد اسپراگ‌داولی با میانگین وزنی ۳۰±۴۰۰ گرم خریداری شدند. معیار ورود آزمودنی‌ها سن موش‌های صحرایی بود که سن ۲۰ ماه و بالاتر در نظر گرفته شد. موش‌های صحرایی در آزمایشگاه مخصوص حیوانات با دمای ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۰-۴۰ درصد و چرخه تاریکی-روشنایی ۱۲-۱۲ نگهداری شدند. غذای موش‌های صحرایی به صورت پَلت ساخته شده به‌صورت آزادانه و استاندارد مخصوص حیوانات آزمایشگاهی تهیه شد. هم‌چنین آب مورد نیاز حیوانات به‌صورت آزاد در بطری ۵۰۰ میلی‌لیتری ویژه حیوانات آزمایشگاهی، در اختیار آن‌ها قرار داده شد. اصول اخلاقی مطالعه مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی با شناسه ثبت شده در سامانه ملی کد اخلاق (IR.US.PSYEDU.REC.1402.066) مورد توجه قرار گرفت. موش‌های صحرایی سالمند به‌صورت تصادفی به ۲ گروه ۱) کنترل (۶ سر) و ۲) HIIT (۶ سر) تقسیم می‌شوند. گروه کنترل در طول انجام تحقیق هیچ‌گونه فعالیتی نداشت.

برنامه تمرین تناوبی پرشدت (HIIT)

بعد از آشناسازی (۵ روز و با سرعت ۵ تا ۱۰ متر بر دقیقه) و تقسیم‌بندی موش‌ها، برنامه اصلی HIIT انجام شد. پروتکل HIIT شامل سه قسمت گرم کردن، بدنه اصلی تمرین HIIT و سرد کردن بود. موش‌های صحرایی سالمند ابتدا با شدت ۴۵ تا ۵۰ درصد VO_2max به مدت ۵ دقیقه روی نوارگردان گرم کردند. برنامه تمرین HIIT درهفته‌های اول تا چهارم شامل ۴ تکرار ۱ دقیقه‌ای با شدت ۸۵-۹۰ درصد VO_2max و ۴ تکرار ۲ دقیقه‌ای با شدت ۴۵-۵۰ درصد VO_2max بود. هفته پنجم و ششم شامل ۵ تکرار ۱ دقیقه‌ای با شدت ۸۵-۹۰ درصد VO_2max و ۵ تکرار ۲ دقیقه‌ای با شدت ۴۵-۵۰ درصد VO_2maxبود. برنامه تمرینی در هفته هفتم و هشتم شامل ۶ تکرار ۱ دقیقه‌ای با شدت ۸۵-۹۰ درصد VO_2max و ۶ تکرار ۲ دقیقه‌ای با شدت ۴۵-۵۰ درصد VO_2max بود. در هر جلسه پس از اتمام تمرین ۳ دقیقه روی نوار گردان سرد کردند. پروتکل تمرینی ۳ روز در هفته و به مدت ۸ هفته اجرا شد. شیب در تمام هفته ها ۱۰ درجه ثابت بود (۲۶).

تعیین سرعت حداکثر اکسیژن مصرفی (VO_2max)

جهت تعیین سرعت حداکثر اکسیژن مصرفی از آزمون فزاینده استاندارد بیدفورد و همکاران (۱۹۷۹) (۲۷) استفاده شد که به وسیله لیندرو و همکاران (۲۰۰۷) (۲۸) جهت رت‌های نژاد ویستار استانداردسازی گردید. آزمون شامل ۱۰ مرحله سه دقیقه‌ای است. سرعت در مرحله اول ۰/۳ کیلومتر بر ساعت و در مراحل بعدی ۰/۳ کیلومتر بر ساعت به سرعت نوارگردان اضافه شد. در این تحقیق از شیب ۱۰ درجه برای تعیین سرعت حداکثر اکسیژن مصرفی استفاده شد و سرعت بدست آمده در آخرین مرحله که حیوان قادر به دویدن نبود به عنوان حداکثر سرعت دویدن حیوان مورد استفاده قرار گرفت.

روش بافت برداری

برای از بین بردن آثار حاد تمرین و متغیرهای غیرقابل کنترل استرس آزمودنی‌ها در زمان اجرای برنامه تمرینی، بعد از ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، موش‌های صحرایی سالمند 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 بازکننده طویل انگشتان پا (EDL) بدن حیوان برداشته و بعد از شستشو در سرم فیزیولوژیک، بلافاصله در تانک ازت منجمد شد. سپس نمونه‌های بافتی عضله EDL برای سنجش‌های بعدی با دمای ۸۰- در فریزر گذاشته می‌شود.

روش آزمایشگاهی وسترن‌بلات

با استفاده از روش آزمایشگاهی وسترن-بلات متغیرهای پژوهش اندازه‌گیری شد. برای استخراج پروتئین‌های بافت عضله EDL از بافر RIPA حاوی ۰/۰۵ میلی مولار بافر تریس (pH برابر ۸)، ۱۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، ۰/۰۱ درصد EGTA، یک درصد سدیم دودسیل سولفات (SDS) به اضافه ۰/۱ درصد آنتی‌پروتئاز کوکتیل (sigma) استفاده شد. به این ترتیب که ۱۰۰ میلی‌گرم بافت در ۵۰۰ میکرولیتر بافر حاوی آنتی پروتئاز توسط یک هموژنایزر دستی هموژن شد و نیم ساعت در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد گذاشته شد و سپس در یک سانتریفوژ یخچال‌دار (bo, sw14rfroil) در دور ۱۲۰۰۰ و ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد؛ سپس مایع رویی جمع‌آوری شده و غلظت پروتئین آن با کیت تعیین کننده‌ی پروتئین (Bio-Rad) اندازه‌گیری گردید (در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد). در نهایت در ۲۰ درجه زیر صفر نگه‌داری شد، سپس هموژن به‌دست آمده به نسبت ۱:۱ با نمونه‌ی لودینگ بافر (mM50 تریس‌کلرید هیدروژن، ۲ درصد سدیم دو دسیل سولفات، ۱۰ درصد گلیسرول، ۵ درصد بتامرکاپتواتانول و ۰/۰۰۵ درصد برموفنول آبی) مخلوط گردید. در

ادامه، نمونه‌ها به‌مدت ۵ دقیقه جوشانده شد تا تمام پروتئین‌ها کاملاً دناتوره شوند. پروتئین‌ها با استفاده از الکتروفورز ژل SDS-Polyacrylamide جدا شده و به غشای نیترو سلولز منتقل شدند. غشاء به‌مدت ۱ ساعت در ۵ درصد BSA در Tris-Buffered Saline و ۰/۱ درصد (Tween 20 TBST) مسدود شد و در آنتی‌بادی اولیه (۵۰۰:۱) انکوبه شد. انکوباسیون در آنتی‌بادی ثانویه روز بعد به‌مدت ۱ ساعت در دمای اتاق در ۴ درصد TBST انجام شد. پروتئین‌ها با یک واکنش شیمیایی لومینسانس (ECL) و با تجزیه و تحلیل densitometry با نرم‌افزار Image J (نسخه ۱/۸/۰/۱۱۲) اندازه‌گیری شد. آنتی‌بادی‌های اولیه anti-Beclin1 (E-8) (sc-48341) و anti-AMBRA1 (G-6) (Sc-398204) و آنتی‌بادی‌های ثانویه m-IgGκ BP-HRP: sc-516102 و anti-rabbit IgG-HRP: sc-2357 شرکت سانتاکروز ساخت کشور آمریکا مورد استفاده قرار گرفتند.

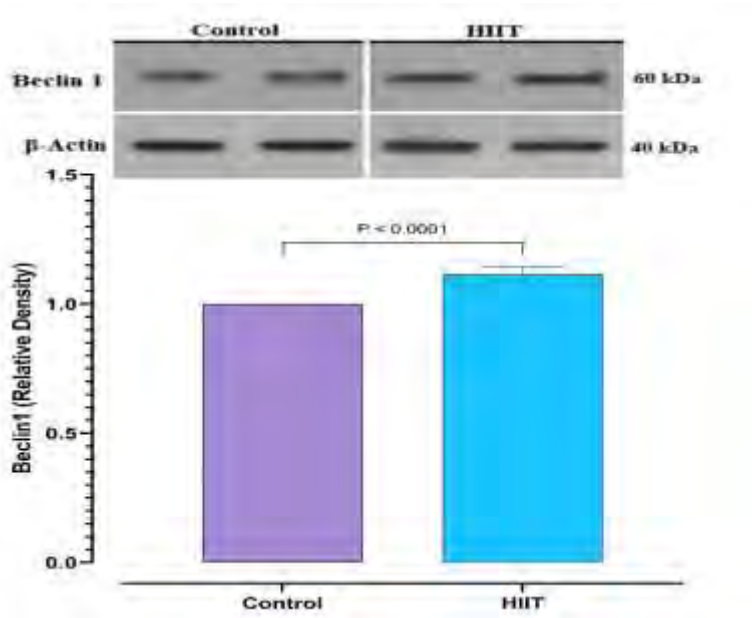
روش‌های آماری

نرمال بودن داده‌ها از طریق آزمون شاپیروویلک بررسی شد. با توجه به نرمال بودن داده‌ها از آزمون t-مستقل برای بررسی میانگین بین گروه‌ها استفاده شد. اندازه اثر از طریق آزمون کوهن بررسی شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها ار نرم‌افزارهای SPSS نسخه ۲۷ و گراف‌پد پریسم نسخه ۱۰/۲/۲ استفاده شد. نمودارها در نرم افزار گراف‌پد پریسم طراحی شد. سطح معناداری در سطح $P\leq ۰/۰۵$ بررسی شد.

یافته‌ها

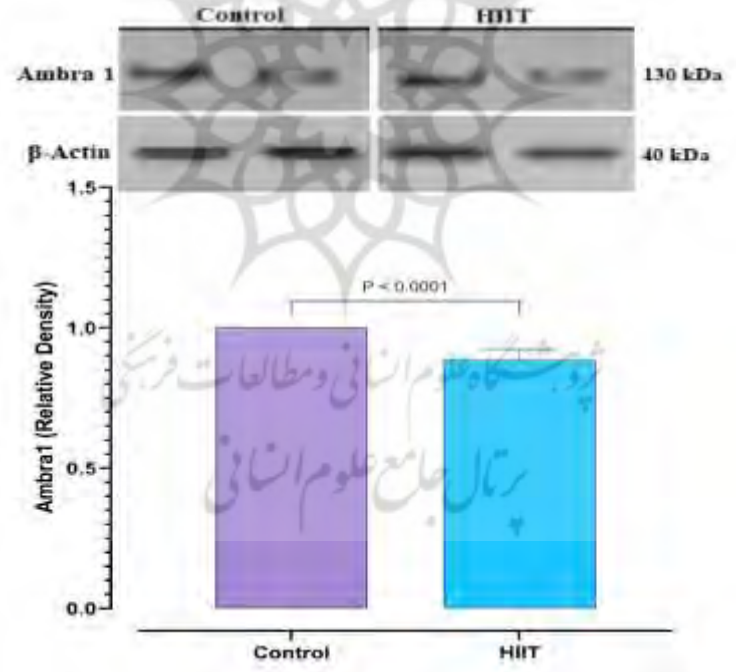
تجزیه و تحلیل داده‌ها بر اساس آزمون آزمون t-مستقل نشان داد، مقدار t برای محتوای درون سلولی پروتئین BECLIN1، ۱۰/۷۷ است؛ بنابراین بر اساس نتایج به دست آمده تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های پژوهش وجود دارد (P=۰/۰۰۱) (شکل ۱). این نشان می‌دهد هشت هفته تمرین HIIT بر میزان پروتئین BECLIN1 در عضله EDL موش‌های صحرایی سالمند تاثیر معنی‌داری دارد و این تاثیر به صورت افزایش در محتوای گروه HIIT نسبت به کنترل است. آزمون کوهن برای اندازه‌گیری اندازه اثر محتوای پروتئین BECLIN1، اثر قدرتمندی را نشان داد (Effect Sizes=۶/۲۱). با توجه به اینکه اندازه اثر به دست آمده از مقادیر مرجع آزمون کوهن (بالاتر از ۰/۸، اندازه اثر بزرگ) بیشتر است، می‌توان ذکر کرد که اندازه اثر ۶/۲۱، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری قابل‌توجهی بین گروه تمرین HIIT نسبت به گروه کنترل است و می‌توان نتیجه گرفت که انجام هشت هفته تمرین HIIT می‌تواند تاثیر قابل‌توجهی بر محتوای پروتئین BECLIN1 داشته باشد.

همچنین تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد، مقدار t برای محتوای درون سلولی پروتئین AMBRA1، ۷/۴۰ است؛ بنابراین بر اساس نتایج به دست آمده تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های پژوهش وجود دارد (P=۰/۰۰۱) (شکل ۲). این نشان می‌دهد هشت هفته تمرین HIIT بر میزان پروتئین AMBRA1 در عضله EDL موش‌های صحرایی سالمند تاثیر معنی‌داری دارد و این تاثیر به صورت کاهش در محتوای گروه HIIT نسبت به کنترل است. آزمون کوهن برای اندازه‌گیری اندازه اثر محتوای پروتئین AMBRA1، اثر قدرتمندی را نشان داد (Effect Sizes=۴/۲۷). با توجه به اینکه اندازه اثر به دست آمده از مقادیر مرجع آزمون کوهن (بالاتر از ۰/۸، اندازه اثر بزرگ) بیشتر است، می‌توان ذکر کرد که اندازه اثر ۴/۲۷، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری قابل‌توجهی بین گروه تمرین HIIT نسبت به گروه کنترل است و می‌توان نتیجه گرفت که انجام هشت هفته تمرین HIIT می‌تواند تاثیر قابل‌توجهی بر محتوای پروتئین AMBRA1 داشته باشد.



شکل ۱. تصاویر وسترن‌بلات، میانگین و انحراف استاندارد میزان پروتئین BECLIN1 در گروه‌های مختلف

(در شکل معنی‌داری بین گروه‌ها مشخص شده است)



شکل ۲. تصاویر وسترن‌بلات، میانگین و انحراف استاندارد میزان پروتئین AMBRA1 در گروه‌های محتلف

(در شکل معنی‌داری بین گروه‌ها مشخص شده است)

بحث

هدف از انجام تحقیق حاضر، تاثیر تمرین HIIT بر محتوای پروتئین‌های اتوفاژی (BECLIN1 و AMBRA1) در عضله اسکلتی موش‌های صحرایی سالمند بود. نتایج تحقیق حاضر نشان داد هشت هفته HIIT منجر به افزایش میزان پروتئین BECLIN1 و کاهش میزان پروتئین AMBRA1 در عضله EDL موش‌های صحرایی سالمند می‌شود.

در عضله اسکلتی، اتوفاژی یک فرآیند کاتابولیک حیاتی برای گردش مواد، تولید و مصرف انرژی است. اختلال اتوفاژیک در عضله باعث تغییرات سلولی مانند آسیب میتوکندری، کاهش گردش پروتئین سارکومریک و مرگ سلولی می‌شود که منجر به ایجاد بیماری‌های عضلانی اسکلتی متعدد می‌گردد. بسته به شدت و مدت آن، اتوفاژی در عضله اسکلتی در پاسخ به فعالیت‌های ورزشی القا می‌شود (۲۹, ۳۰). در عضله اسکلتی جوندگان، فعالیت‌های ورزشی و محدودیت کالری کاهش اتوفاژی مرتبط با سن را تنظیم می‌کند (۳۰, ۳۱). در این ارتباط در یک تحقیق انجام‌شده توسط دلشاد و همکاران (۲۰۲۱)، تأثیر HIIT بر نشانگر اتوفاژی BECLIN1 در عضله اسکلتی دوقلوی موش‌های نر سالمند مورد بررسی قرار گرفت. برنامه تمرینی شامل هشت هفته تمرین دویدن در تردمیل به صورت تمرین HIIT بالا بود که شامل دوره‌های ۲ دقیقه‌ای با شدت بالا در محدوده ۸۰ تا ۱۰۰ درصد از حداکثر مصرف اکسیژنی و دوره‌های بازیابی با شدت پایین به مدت ۲ دقیقه در محدوده ۵۰ درصد از حداکثر مصرف اکسیژنی بود. نتایج نشان داد که در گروه HIIT، محتوای پروتئین BECLIN1 به طور معناداری افزایش یافته است. این پژوهشگران به این نتیجه رسیدند که به نظر می‌رسد HIIT نقش تنظیمی در فرآیند اتوفاژی ایفا می‌کند و ممکن است تغییرات مرتبط با سالمندی در عضله اسکلتی موش‌های سالمند را تعدیل کند (۳۲). نتایج تحقیق‌های گزارش شده در بالا با نتایج تحقیق حاضر هم‌راستا می‌باشد. در هر دو تحقیق ما شاهد افزایش محتوای پروتئین BECLIN1 در عضله اسکلتی رت‌ها بودیم با وجود تفاوت در مکان اندازه‌گیری هستیم. در تحقیق حاضر نیز محتوای پروتئین BECLIN1 در عضله EDL که یک عضله تند انقباض است اندازه‌گیری شده است و این در حالی است که در تحقیق دلشاد و همکاران مکان اندازه‌گیری عضله دوقلو بوده است. در کل به دنبال انجام ۸ هفته HIIT، محتوای پروتئین BECLIN1 افزایش یافته بود که می‌تواند در نتیجه غیرفعال‌شدن مسیر سلولی ملکولی مرتبط با هیپرتروفی عضلانی از جمله مسیر mTORC1 باشد که در بالا دست پروتئین BECLIN1 قرار دارد.

در تحقیقی دیگر براندت و همکاران (۲۰۱۸) به بررسی تاثیر نشانگرهای اتوفاژی در عضلات اسکلتی انسان به دنبال انجام تمرین ورزشی پرداختند. آزمودنی‌های مرد با تمرین متوسط یک مداخله تمرینی ورزشی ۸ هفته‌ای شامل دوچرخه‌سواری متوسط مداوم به مدت ۶۰ دقیقه و دوچرخه‌سواری سرعتی با سرعت‌های ۳۰ ثانیه‌ای هر ۱۰ دقیقه را تکمیل کردند. بیوپسی عضله قبل، بلافاصله و ۲ ساعت بعد از اولین جلسه تمرین و همچنین در حالت استراحت بعد از جلسه تمرین گرفته شد. نتایج کاهش را در این مدت زمان‌ها در میزان BECLIN1 نشان داد. این محققان بیان کردند که تمرین‌های ورزشی ذکر شده، اتوفاژی را در عضلات اسکلتی انسان تنظیم می‌کنند و این که به طور کلی تحت تأثیر دوی سرعت پراکنده قرار نگرفته است (۳۳). در این راستا در تحقیقی جیو و همکاران (۲۰۱۶) به بررسی نقش اتوفاژی در عضله اسکلتی در شرایط فعالیت ورزشی استقامتی پرداختند. در مرحله اول رت‌ها ۱۵ دقیقه در روز به مدت ۲ روز با پروتکل تمرینی شنا آشنا شدند. برنامه تمرین استقامتی اصلی ۵ روز در هفته و به مدت ۸ هفته اجرا شد. این برنامه شامل ۱ ساعت شنا بود. نتایج کاهش را در این مدت زمان‌ها در میزان BECLIN1 نشان داد. این محققان بیان کردند که اتوفاژی نقش مهمی در بیوژنز میتوکندری ایفا می‌کند و این هماهنگی بین این فرآیندهای متضاد در سازگاری سلولی با تمرینات استقامتی دخیل است (۳۴). نتایج مطالعات گزارش‌شده بالا با نتایج تحقیق حاضر در یک راستا نمی‌باشد؛ زیرا در تحقیق‌های گزارش‌شده محتوای پروتئین BECLIN1 کاهش و این در صورتی است که در تحقیق حاضر محتوای پروتئین BECLIN1 به دنبال هشت هفته تمرین HIIT افزایش

یافته بود. نوع و شرایط تمرینی در تحقیق‌های گزارش‌شده در بالا با تحقیق حاضر متناقض می‌باشد. در تحقیق حاضر تمرین هوازی از نوع تناوبی با شدت بالا بوده است و این در حالی است که در تحقیق‌های بالا تمرین‌های هوازی استقامتی انجام شده است. در تحقیق براندت و همکاران آزمودنی‌ها انسان و در تحقیق جیو و همکاران آزمودنی‌ها مایس بودند و این در حالی است که در تحقیق حاضر آزمودنی‌ها رت‌های سالمند بودند. در کل شرایط آزمودنی‌ها همراه با عوامل کلی مرتبط با اصول تمرینی می‌توانند بر نتایج به دست آمده در تمرین‌ها متفاوت باشد.

پروتئین AMBRA1، مولکول تنظیم‌شده BECLIN1، یکی از پروتئین‌های مهم مرتبط با اتوفاژی است که تاکنون مطالعاتی در زمینه علوم ورزشی در مورد تأثیر انواع مختلف تمرین بر AMBRA1 انجام نشده است. با این وجود، در تحقیقی محققان گزارش کردند که فعالیت های ورزشی می‌تواند سطوح بیان AMBRA1 را کاهش دهد و بیان محصولات مرتبط با میتوفاژی مرتبط با AMBRA1 را افزایش دهد و در نتیجه سارکوپنیا را بهبود بخشد (۳۵). مکانیسم بیولوژیکی برای توضیح بیان تنظیم حجم عضلانی مرتبط با سالمندی از طریق فعالیت‌های ورزشی می‌تواند از طریق عوامل و مسیرهای مرتبط مانند FUNDC1، AMBRA1، Beclin1 و مسیرهای دیگر مانند PINK1/Parkin، AMPK، PGC-1α، مسیر BNIP3/NIX، مسیر mTOR و غیره تنظیم شود (۳۵). در شرایط عادی، AMBRA1 با BECLIN1 ارتباط برقرار کرده و از طریق تعامل با کمپلکس موتوری دایننئین به اسکلت سلولی متصل می‌شود (۳۶). عوامل تحریک‌کننده اتوفاژی منجر به فسفریلاسیون وابسته به AMBRA1-ULK1 می‌شود، سپس AMBRA1 را از BECLIN1 جدا و BECLIN1 را از اسکلت سلولی آزاد می‌کنند. این به BECLIN1 اجازه می‌دهد که به مکان‌های بیوژنز اتوفاژوزوم حرکت کند (۳۶, ۳۷). عوامل استرسی مانند گرسنگی دارای توانایی فعال‌سازی AMBRA1 و افزایش اتوفاژی هستند (۳۸). با این حال نتایج تحقیق حاضر در متنضاد با افزایش محتوای پروتئین BECLIN1 نشان داد که هشت هفته تمرین HIIT منجر به کاهش محتوای درون سلولی پروتئین‌های AMBRA1 می‌شود. با این حال، پاسخ اتوفاژی به محتوای درون سلولی پروتئین‌های AMBRA1 از طریق HIIT قبلاً بررسی نشده بود. مطالعه ما نشان می‌دهد که HIIT شار اتوفاژیک را تنظیم می‌کند.

نتیجه‌گیری

در نهایت نتایج تحقیق حاضر نشان داد که هشت هفته تمرین HIIT می‌تواند عامل اتوفاژی BECLIN1 را افزایش و در مقابل عامل دیگر یعنی AMBRA1 را کاهش دهد. داده‌های پراکنده ما درباره ادبیات کنونی اتوفاژی ناشی از فعالیت‌های ورزشی نشان می‌دهد که ممکن است پاسخ‌های تطبیقی HIIT در تنظیم مسیر اتوفاژی متفاوت باشد. اختلاف در پاسخ بین پروتئین‌ها از طریق HIIT ممکن است به تفاوت در شرایط تمرینی مانند شدت و مدت زمان ورزش نسبت داده شود، اگرچه تحقیقات بیشتری مورد نیاز است. با توجه به درک رو به رشد پیامدهای اتوفاژی بر عملکرد و طول عمر انسان و اثرات فعالیت‌های ورزشی در آن، کار بیشتری باید برای توصیف دوز و نوع پاسخ‌های ورزشی بر اتوفاژی در بافت‌های مختلف و همچنین بررسی تفاوت‌های جنسیتی انجام شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل تلاش نویسندگان تحقیق حاضر است که در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علی‌آباد کتول انجام شده است. از تمامی افرادی که در این تحقیق ما را یاری کردند کمال تشکر را داریم.

منابع

1. Partridge L, Deelen J, Slagboom PE. Facing up to the global challenges of ageing. Nature. 2018;561(7721):45-56.

2. Fang EF, Xie C, Schenkel JA, Wu C, Long Q, Cui H, et al. A research agenda for ageing in China in the 21st century: Focusing on basic and translational research, long-term care, policy and social networks. Ageing research reviews. 2020;64:101174.

3. Liang J, Zeng Z, Zhang Y, Chen N. Regulatory role of exercise-induced autophagy for sarcopenia. Experimental Gerontology. 2020;130:110789.

4. Xie G, Jin H, Mikhail H, Pavel V, Yang G, Ji B, et al. Autophagy in sarcopenia: Possible mechanisms and novel therapies. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2023;165:115147.

5. Li W, He P, Huang Y, Li Y-F, Lu J, Li M, et al. Selective autophagy of intracellular organelles: recent research advances. Theranostics. 2021;11(1):222.

6. Mao J, Lin E, He L, Yu J, Tan P, Zhou Y. Autophagy and viral infection. Autophagy regulation of innate immunity. 2019:55-78.

7. Levine B, Kroemer G. Biological functions of autophagy genes: a disease perspective. Cell. 2019;176(1):11-42.

8. Chen R-H, Chen Y-H, Huang T-Y. Ubiquitin-mediated regulation of autophagy. Journal of Biomedical Science. 2019;26:1-12.

9. Li J, Tian M, Hua T, Wang H, Yang M, Li W, et al. Combination of autophagy and NFE2L2/NRF2 activation as a treatment approach for neuropathic pain. Autophagy. 2021;17(12):4062-82.

10.Ma X, Lu C, Chen Y, Li S, Ma N, Tao X, et al. CCT2 is an aggrephagy receptor for clearance of solid protein aggregates. Cell. 2022;185(8):1325-45. e22.

11.Campanario S, Ramírez-Pardo I, Hong X, Isern J, Muñoz-Cánoves P. Assessing autophagy in muscle stem cells. Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2021;8:620409.

12.Vega-Rubín-de-Celis S. The Role of Beclin 1-Dependent Autophagy in Cancer. Biology. 2020;9(1):4.

13.Sun Y, Yao X, Zhang QJ, Zhu M, Liu ZP, Ci B, et al. Beclin-1-Dependent Autophagy Protects the Heart During Sepsis. Circulation. 2018;138(20):2247-62.

14.Xia Q, Huang X, Huang J, Zheng Y, March ME, Li J, Wei Y. The Role of Autophagy in Skeletal Muscle Diseases. Frontiers in Physiology. 2021;12.

15.Bell RAV, Al-Khalaf M, Megeney LA. The beneficial role of proteolysis in skeletal muscle growth and stress adaptation. Skeletal Muscle. 2016;6(1):16.

16.Gambarotto L, Metti S, Chrisam M, Cerqua C, Sabatelli P, Armani A, et al. Ambra1 deficiency impairs mitophagy in skeletal muscle. Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle. 2022;13(4):2211-24.

17.Yang B, Liu Q, Bi Y. Autophagy and apoptosis are regulated by stress on Bcl2 by AMBRA1 in the endoplasmic reticulum and mitochondria. Theoretical Biology and Medical Modelling. 2019;16(1):18.

18.Briand J, Tremblay J, Thibault G. Can Popular High-Intensity Interval Training (HIIT) Models Lead to Impossible Training Sessions? Sports. 2022;10(1):10.

19.Bacon AP, Carter RE, Ogle EA, Joyner MJ. VO2max trainability and high intensity interval training in humans: a meta-analysis. PloS one. 2013;8(9):e73182.

20.Buchheit M, Laursen PB. High-intensity interval training, solutions to the programming puzzle: Part I: cardiopulmonary emphasis. Sports medicine. 2013;43(5):313-38.

21.Liu Q-Q, Xie W-Q, Luo Y-X, Li Y-D, Huang W-H, Wu Y-X, Li Y-S. High intensity interval training: A potential method for treating sarcopenia. Clinical Interventions in Aging. 2022:857-72.

22.Mejías-Peña Y, Estébanez B, Rodriguez-Miguelez P, Fernandez-Gonzalo R, Almar M, de Paz JA, et al. Impact of resistance training on the autophagy-inflammation-apoptosis crosstalk in elderly subjects. Aging (Albany NY). 2017;9(2):408.

23.Kim YA, Kim YS, Oh SL, Kim H-J, Song W. Autophagic response to exercise training in skeletal muscle with age. Journal of physiology and biochemistry. 2013;69:697-705.

24.Alizadeh Pahlavani H, Laher I, Knechtle B, Zouhal H. Exercise and mitochondrial mechanisms in patients with sarcopenia. Frontiers in Physiology. 2022;13.

25.Endo Y, Nourmahnad A, Sinha I. Optimizing Skeletal Muscle Anabolic Response to Resistance Training in Aging. Frontiers in Physiology. 2020;11.

26.Hurst C, Weston KL, Weston M. The effect of 12 weeks of combined upper-and lower-body high-intensity interval training on muscular and cardiorespiratory fitness in older adults. Aging clinical and experimental research. 2019;31:661-71.

27.Bedford TG, Tipton CM, Wilson NC, Oppliger RA, Gisolfi CV. Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures. Journal of Applied Physiology. 1979;47(6):1278-83.

28.Leandro CG, Levada AC, Hirabara SM, MANHAS-DE-CASTRO R, De-Castro CB, Curi R, Pithon-Curi TC. Aprogram of moderate physical training for wistar rats based on maximal oxygen consumption. The Journal of Strength & Conditioning Research. 2007;21(3):751-6.

29.Kang JS, Kim MJ, Kwon ES, Lee KP, Kim C, Kwon KS, Yang YR. Identification of novel genes associated with exercise and calorie restriction effects in skeletal muscle. Aging (Albany NY). 2023;15(11):4667-84.

30.Schwalm C, Jamart C, Benoit N, Naslain D, Prémont C, Prévet J, et al. Activation of autophagy in human skeletal muscle is dependent on exercise intensity and AMPK activation. The FASEB Journal. 2015;29(8):3515-26.

31.Balasubramanian P, Howell PR, Anderson RM. Aging and caloric restriction research: a biological perspective with translational potential. EBioMedicine. 2017;21:37-44.

32.delshad S, yaghoubi A, rezaeian N. The effect of high intensity interval training on skeletal muscle autophagy biomarkers in male elderly rats. Daneshvar Medicine. 2021;28(6):37-48.

33.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.

34.Ju J-s, Jeon S-i, Park J-y, Lee J-y, Lee S-c, Cho K-j, Jeong J-m. Autophagy plays a role in skeletal muscle mitochondrial biogenesis in an endurance exercise-trained condition. The Journal of Physiological Sciences. 2016;66:417-30.

35.Guo H, Kong J, Tian C. The role of mitochondrial autophagy-related receptor proteins and signaling pathways in the prevention and treatment of sarcopenia through exercise. Chinese Journal of Tissue Engineering Research. 2024;28(27):4397.

36.Tran S, Fairlie WD, Lee EF. BECLIN1: Protein Structure, Function and Regulation. Cells. 2021;10(6):1522.

37.Menon MB, Dhamija S. Beclin 1 Phosphorylation – at the Center of Autophagy Regulation. Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2018;6.

38.Xia P, Wang S, Du Y, Zhao Z, Shi L, Sun L, et al. WASH inhibits autophagy through suppression of Beclin 1 ubiquitination. The EMBO journal. 2013;32(20):2685-96.