

## پاسخ گیرنده وابسته استروژنی آلفا ( $ERR\alpha$ ) به تمرین استقامتی و اشتراک آن در سازگاری متابولیسم لیپید ناشی از تمرین استقامتی در عضله اسکلتی رت‌های نر نژاد ویستار

سهیل امینی زاده<sup>۱\*</sup>، عبدالحمید حبیبی<sup>۲</sup>، حمید معرفتی<sup>۳</sup>، سعید شاکریان<sup>۴</sup>

### چکیده

مقدمه: هدف از تحقیق حاضر بررسی بیان گیرنده وابسته استروژنی آلفا ( $ERR\alpha$ ) به عنوان فاکتوری مهم در تنظیم هموستاز انرژی سلولی در عضله اسکلتی رت‌های نر متعاقب چهار هفته تمرین استقامتی و تعیین نقش آن با شاخص‌های متابولیسم چربی بود. روش بررسی: مطالعه حاضر از نوع تجربی بود که طی آن تعداد ۳۰ رت نر نژاد ویستار در سن هشت هفتهگی به صورت تصادفی به چهار گروه کنترل ( $n=7$ )، گروه سالم  $XCT790+$  ( $n=8$ )، گروه تمرین استقامتی ( $n=8$ ) و تمرین استقامتی  $XCT790+$  ( $n=7$ ) تقسیم شدند. مهار  $ERR\alpha$  با تزریق درون صفاقی و روزانه  $XCT790$  به میزان  $0.48 \text{ mg/kg}$  انجام گرفت. تمرین استقامتی دوییدن به مدت چهار هفته (پنج جلسه در هر هفته)، شروع با سرعت ۱۵ متر بر دقیقه و زمان ۲۰ دقیقه و رسیدن به سرعت ۲۷ متر بر دقیقه به مدت ۵۰ دقیقه بر گروه‌های تمرینی اعمال شد. بیان ژن‌های  $ERR\alpha$ ، آسیل کوآ دهیدروژناز (MCAD) و کارنیتین پالمیتیل ترانسفراز ۱ بتا ( $CPT1\beta$ ) با روش Real-Time PCR اندازه‌گیری و با فرمول  $2^{-\Delta\Delta CT}$  کمی‌سازی و از تحلیل واریانس یک طرفه برای مقایسات بین گروهی استفاده شد. نتایج: بیان ژن  $ERR\alpha$  ( $P<0.037$ )، MCAD ( $P<0.001$ ) و  $CPT1\beta$  ( $P<0.001$ ) در گروه تمرین استقامتی به طور معنی‌داری از گروه کنترل بیشتر بود. در گروه تمرین استقامتی  $XCT790+$  بیان ژن  $CPT1\beta$  ( $P<0.001$ )، MCAD ( $P<0.001$ ) نسبت به گروه تمرین استقامتی به طور معنی‌داری کمتر بود. نتیجه‌گیری: بیان  $ERR\alpha$  در عضله اسکلتی فاکتوری تمرین پذیر است که هم‌راستا با افزایش بیان شاخص‌های متابولیسم لیپید به تمرین استقامتی پاسخ می‌دهد؛ لذا، احتمالاً  $ERR\alpha$  نقشی مستقیم در سازگاری متابولیسم لیپید ناشی از تمرین استقامتی دارد.

واژه‌های کلیدی:  $ERR\alpha$ ؛ متابولیسم لیپید؛ تمرین استقامتی؛ فسفوریلاسیون اکسیداتیو

- ۱- دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
- ۲- استاد، گرایش فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
- ۳- دانشیار، گرایش فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه بجنورد، خراسان شمالی، ایران
- ۴- استادیار، گرایش فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

\* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۳۲۴۷۴۲۹۳-۰۳۴۳۲۱۳۱۹۴۸، پست الکترونیکی: S.amini@sport.uk.ac.ir-U6009016@utah.edu

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۲/۲۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۳

## مقدمه

تری‌گلیسریدهای درون عضلانی منبع سوخت اصلی برای فراهمی انرژی در حین فعالیت زیر بیشینه طولانی مدت هستند که با شدت متوسط انجام می‌شوند. ذخایر اصلی اسیدهای چرب در بدن، تری‌گلیسریدهای ذخیره شده در آدیپوسیت‌ها، تری‌گلیسریدهای درون عضلانی (IMTG (Intramyocellular Triacylglycerol)، اسیدهای چرب آزاد و تری‌گلیسریدهای موجود در لیپوپروتئین‌ها می‌باشند (۱). تری‌آسیل گلیسرول‌های درون عضلانی و اسیدهای چرب آزاد مهم‌ترین منابع تامین انرژی حین تمرین استقامتی هستند که اکسیداسیون آن‌ها به طور فزاینده‌ای حین تمرین استقامتی طولانی مدت افزایش می‌یابد؛ استفاده‌ای که به وسیله شدت و مدت تمرین تعیین می‌شود (۲). لازمه استفاده هر چه بیشتر از این منابع انرژی حین تمرین، سازگاری‌هایی است که متعاقب تمرین استقامتی در فرآیندهای لیپولیز بافت چربی، انتقال و برداشت بافتی و میتوکندریایی این سوبسترا و چرخه‌های مسئول متابولیسم آن (کریس و بتا‌اکسیداسیون) اتفاق می‌افتد (۳).

به عنوان مثال، آسیل کوآنزیم آ دهیدروژناز MCAD (Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase) آنزیمی است که اولین مرحله در بتا‌اکسیداسیون اسیدهای چرب را انجام می‌دهد (۴). سطوح بیان این آنزیم نرخ اکسیداسیون اسیدهای چرب را مشخص می‌کند و بر همین اساس بافت‌هایی که ترجیحاً از اسیدهای چرب به عنوان سوبستراهای انرژی استفاده می‌کنند مانند قلب و کلیه‌ها سطوح بالایی از این آنزیم را دارند (۵). این آنزیم همان‌طور که گفته شد اولین مرحله از بتا‌اکسیداسیون را انجام می‌دهد و بیان آن در پاسخ به تمرین استقامتی با شدت زیاد و شدت کم افزایش می‌یابد (۶). علاوه بر این، کارنیتین پالمیتیل ترانسفراز ۱ (Carnitine Palmitoyl Transferase 1) آنزیم محدود کننده بتا‌اکسیداسیون میتوکندریایی است که برداشت میتوکندریایی آسیل کوآنزیم‌های بلند زنجیر را انجام می‌دهد. ایزوفرم عضلانی آن، CPT1 $\beta$ ، شکل غالب این آنزیم در عضله اسکلتی و قلب

است (۷) و در پاسخ به تمرین استقامتی فعالیت و بیان این آنزیم در عضله اسکلتی افزایش می‌یابد (۸). عمده سازگاری‌های ایجاد شده در بتا‌اکسیداسیون اسیدهای چرب در پاسخ به تمرین، توسط تنظیم‌گرهای رونویسی کنترل می‌شوند که یک زیرشاخه مهم از آن‌ها خانواده ERRs (Estrogen-Related receptor) می‌باشند. زیرمجموعه ERRها شامل سه عضو است:  $ERR\alpha$  (NR3B1)،  $ERR\beta$  (NR3B2) و  $ERR\gamma$  (NR3B3) (۹). گیرنده‌های هسته‌ای وابسته استروژنی به عنوان گیرنده‌های هسته‌ای تنها طبقه‌بندی می‌شوند، چرا که تاکنون لیگاند اختصاصی برای آن‌ها تعریف و معلوم نشده است (۱۰، ۱۱). در میان آن‌ها،  $ERR\alpha$  گیرنده‌ای است که به وسیله هم فعال رونویسی (Transcription Coactivator) با  $PGC-1\alpha$  (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) درگیر در بتا‌اکسیداسیون اسیدهای چرب، سیکل کریس، فسفوریلاسیون اکسیداتیو و نهایتاً بیوژنز میتوکندری را تنظیم می‌کند (۱۰). لذا، این فاکتور تنظیم‌کننده‌ای حیاتی در متابولیسم انرژی است. در زمینه نقش  $ERR\alpha$  در متابولیسم لیپید،  $ERR\alpha$  زیرمجموعه‌ای از ژن‌های هدف  $PGC-1\alpha$  را که در انتقال اسیدهای چرب، اکسیداسیون اسیدهای چرب و تنفس میتوکندریایی درگیر هستند را تنظیم مثبت می‌کند (۱۲). به طور خاص، ژن‌هایی مانند MCAD و CPT1 $\beta$  که جزء مهم در انتقال و بتا‌اکسیداسیون اسیدهای چرب هستند، تحت کنترل  $ERR\alpha$  هستند (۱۳). در واقع، فعال شدن  $ERR\alpha$  بیان MCAD را تنظیم مثبت می‌کند (۱۴). همچنین، بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های درگیر در اکسیداسیون اسیدهای چرب میتوکندریایی (کارنیتین پالمیتول ترانسفراز I عضلانی-CPT1 $\beta$  و آسیل کوآنزیم آ دهیدروژناز (MCAD)) در پاسخ به افزایش بیان  $ERR\alpha$  افزایش می‌یابد (۱۲). به عنوان مثال، در بررسی اثر  $ERR\alpha$  بر بیان MCAD، در محیط‌های *in vitro* افزایش مجازی سطوح  $ERR\alpha$  در میوسیت‌های قلبی عاری از  $ERR\alpha$  منجر به افزایش معنی‌دار اکسیداسیون پالمیتات می‌شود. لذا، با توجه به نقش

## روش بررسی

### موش‌ها

مطالعه حاضر از نوع تجربی بوده و ۳۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در سن هشت هفتگی در محدوده وزنی  $200 \pm 10$  از مرکز تحقیقات فیزیولوژی کرمان خریداری و در شرایط دمایی  $22 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد تحت شرایط ۱۲:۱۲ ساعت تاریکی-روشنایی و رطوبت ۵۰ درصد نگهداری و با غذای مخصوص رت (شرکت جوانه خراسان) و آب تغذیه شدند (کد اخلاقی: IR.KMU.REC.1394.449). بعد از یک هفته آشنایی با محیط آزمایشگاه، رت‌ها بر اساس وزن همسان‌سازی و به طور تصادفی به چهار گروه کنترل ( $n=7$ )، گروه کنترل XCT790 + ( $n=8$ )، گروه تمرین استقامتی ( $n=8$ ) و تمرین استقامتی + XCT790 ( $n=7$ ) تقسیم شدند.

### مهار ERR $\alpha$

جهت مهار ERR $\alpha$  در عضله اسکلتی از تزریق درون صفاقی XCT790 به مقدار ۰/۴۸ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن در روز در محلول ۱۰ میلی‌مولار دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) Dimethyl sulfoxide استفاده شد (۱۷). XCT790 لیگاند اختصاصی ERR $\alpha$  است که به عنوان آگونیست مخالف آن عمل می‌کند و نه تنها اثرات رونویسی ERR $\alpha$  را سرکوب می‌کند بلکه عملکرد متقابل بین ERR $\alpha$  و PGC-1 $\alpha$  را نیز مختل می‌کند (۱۸، ۱۹).

### پروتکل تمرینی

پروتکل تمرینی به مدت چهار هفته (پنج روز در هر هفته) انجام شد. ابتدا، گروه‌های تمرینی به مدت پنج روز با دویدن روی تردمیل با سرعت ۱۵ متر بر دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه آشنا شدند. سپس مدت‌زمان و سرعت به تدریج در طول چهار هفته افزایش یافت به طوری که در هفته پایانی سرعت به ۲۷ متر بر دقیقه و زمان تمرین به ۵۰ دقیقه در هر روز رسید. گروه‌های کنترل در طول دوره تمرین در قفس‌ها بدون تمرین نگهداشته شدند و برای ایجاد شرایط یکسان از نظر استرس ناشی از تردمیل، موش‌های این گروه در هر جلسه روی تردمیل خاموش با شوک الکتریکی روشن گذاشته شدند (جدول ۱) (۲۰).

کاملاً تثبیت شده ERR $\alpha$  در تسهیل اکسیداسیون لیپید در مطالعات آزمایشگاهی (in vitro)، این احتمال وجود دارد که تطابق‌های تمرینی در این فاکتور منجر به تسهیل اکسیداسیون لیپید در حین تمرین استقامتی و سازگاری‌های ایجاد شده در متابولیسم لیپید متعاقب تمرین استقامتی شود (۱۰، ۱۲).

با این وجود، تاکنون تعداد کمی از تحقیقات پاسخ و عملکرد ERR $\alpha$  را در عضله اسکلتی در پاسخ به تمرین گزارش کرده‌اند. در معدود تحقیقات انجام شده، نشان داده شده است که دو ساعت بعد از تمرین حاد استقامتی (۱۰ کیلومتر دوچرخه‌سواری تایم تریل بعد از افزایش ارتفاع از ۵۰۰ تا ۱۲۵۰ متر) بیان میتوفیوژین ۱ و ۲ (Mfn1/2) Mitofusin1/2 و ERR $\alpha$  در سطح نسخه‌برداری در عضله اسکلتی انسان افزایش می‌یابد و همچنین سیگنال‌های متابولیکی که متعاقب انقباض عضله اسکلتی آغاز می‌شوند از طریق مسیر وابسته به PGC-1 $\alpha$ /ERR $\alpha$  قادر به تحریک رونویسی ژن‌های درگیر در بیوژنز میتوکندریایی هستند (۱۵) و همچنین، در تحقیق دیگر روی نه مرد سالم نشان داده شده است که انجام تمرین استقامتی با دوچرخه کارسنج تا سر حد واماندگی باعث افزایش بیان کارنیتین پالمیتیل ترانسفراز-۱ (CPT1 $\beta$ )، سطوح mRNA PGC-1 $\alpha$  و ERR $\alpha$  در عضله پهن خارجی، سه ساعت بعد از تمرین می‌شود (۱۶). علی‌رغم مشخص بودن افزایش سطوح ERR $\alpha$  در عضله اسکلتی متعاقب انجام تمرین استقامتی تک جلسه‌ای، دلایل این افزایش و عملکرد فیزیولوژیک آن روی متابولیسم لیپید ناشناخته است. با توجه به نقش تثبیت شده ERR $\alpha$  در متابولیسم لیپید در محیط‌های in vitro این احتمال وجود دارد که این فاکتور در سازگاری‌های ایجاد شده در متابولیسم لیپید متعاقب تمرین استقامتی ایفای نقش کند. با این وجود، در حال حاضر مدارکی برای رد یا تأیید این فرضیه وجود ندارد. لذا هدف اول از تحقیق حاضر، بررسی پاسخ بلندمدت تمرین استقامتی بر بیان ژن ERR $\alpha$ ، CPT1 $\beta$  و MCAD در عضله دوقلوی میانی رت‌های نر نژاد ویستار بود و هدف دوم، تعیین نقش ERR $\alpha$  در سازگاری‌های ایجاد شده در شاخص‌های متابولیسم لیپید (MCAD و CPT1 $\beta$ ) بود.

جدول ۱: پروتکل تمرینی

هفته	هفته اول آشناسازی	۱	۲	۳	۴
سرعت (متر بر دقیقه)	۱۵	۲۲	۲۵	۲۷	۲۷
مدت (دقیقه)	۲۰	۳۵	۴۰	۴۵	۵۰

ژن‌های مورد نظر با روش Real Time PCR، اندازه‌گیری شد و با روش  $2^{-\Delta\Delta CT}$  کمی‌سازی شدند (۲۳). واکنش‌های PCR با استفاده از RealQ Plus 2x Master Mix Green High ROX ساخت شرکت امپلیکن (AMPLIQON) انجام شد. برنامه Real Time PCR شامل واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه، ۴۰ سیکل شامل: واسرشت در هر سیکل با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۲ ثانیه، بسط در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه انجام شد. از 18S به عنوان ژن مرجع برای سنجش بیان ژن نسبی و به منظور کنترل تکثیر تخصصی محصول از آنالیز منحنی ذوب استفاده گردید. توالی پرایمرهای مورد استفاده در تحقیق در جدول ۲ گزارش شده است.

## روش آماری

در قسمت آمار توصیفی از شاخص‌های پراکندگی نظیر میانگین و انحراف معیار استفاده شد. در قسمت آمار استنباطی از آزمون شاپیرو-ویلک برای تعیین توزیع طبیعی داده‌ها و آزمون لوین برای تعیین همگنی واریانس‌ها استفاده شد. از تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) برای تعیین اختلاف در متغیرها بین گروه‌ها به همراه آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. در تمام مقایسات آماری سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

۷۲ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، رت‌ها با تزریق درون صفاقی کتامین (۹۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم وزن بدن) بی‌هوش، عضله دوقلو میانی استخراج، در نیتروژن مایع منجمد و برای تجزیه و تحلیل بعدی در دمای ۸۰- سانتی‌گراد نگهداری شد.

## استخراج mRNA و سنتز cDNA

به منظور استخراج mRNA، از Isol-RNA Lysis Reagent هاون کوبی پودر و در یک میلی‌لیتر Isol-RNA Lysis Reagent هموزن شد. سپس، محصول هموزن در دور ۱۲۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ، سوپرناتانت جدا و به میکروتیوب جدید منتقل شد. در مرحله بعدی، کلروفرم به میزان ۲۰۰ میکرولیتر به سوپرناتانت اضافه و ۱۵ ثانیه با شدت زیاد تکان داده شد. سپس، میکروتیوب‌ها در دور ۱۲۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد مجدداً سانتریفیوژ شدند. فاز آبی نمونه‌ها برداشته و به آن ۶۰۰  $\mu\text{L}$  ایزوپروپانول اضافه و در ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ و total RNA استخراج شد. غلظت RNA و خلوص آن به وسیله کنترل نسبت OD<sub>۲۶۰</sub>/OD<sub>۲۸۰</sub> محاسبه و مقادیر بین ۱/۸ تا ۲ به عنوان خلوص قابل قبول تعریف شد.

سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA شرکت تاکارا (TaKaRa) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. بیان

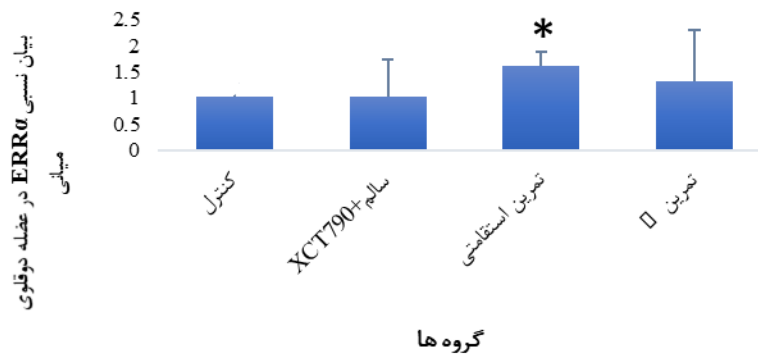
جدول ۲: توالی و اندازه پرایمرهای رفت و برگشت

ژن	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'	اندازه (bp)
18S	GCAATTATCCCCATGAACG	GGCCTCACTAAACCATCCAA	۱۲۳
$ERR\alpha$	AAGCCCTGATGGACACCTC	GAAGCCTGGGATGCTCTTG	۱۰۰
MCAD	CGCCCCAGACTACGATAAAA	CAAGACCACCACAACCTCTCC	۱۰۷
CPT1 $\beta$	GTGCTGGAGGTGGCTTTGGT	TGCTTGACGGATGTGGTTCC	۱۵۲
CS	CGCCCCAGACTACGATAAAA	CAAGACCACCACAACCTCTCC	۱۰۷

### نتایج

معنی داری نداشت. نمودار ۱، مقادیر نسبی بیان ژن  $ERR\alpha$  را در عضله دوقلوی میانی گروه‌های تحقیق را نشان می‌دهد. انجام تمرین استقامتی منجر به افزایش ۱/۵۸ برابری بیان  $ERR\alpha$  در عضله دوقلوی میانی در گروه تمرین استقامتی نسبت به گروه کنترل سالم شد.

بیان ژن  $ERR\alpha$  ( $P < 0.037$ )، MCAD ( $P < 0.001$ ) و CPT1 $\beta$  ( $P < 0.001$ ) در عضله دوقلوی میانی گروه تمرین استقامتی در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری بیشتر بود (نمودار ۱-۳). در گروه تمرین استقامتی با مهار  $ERR\alpha$ ، تنها بیان CPT1 $\beta$  عضله اسکلتی نسبت به گروه کنترل بیشتر بود ( $P < 0.05$ ) و بیان سایر فاکتورها با گروه کنترل تفاوت



نمودار ۱: بیان نسبی  $ERR\alpha$  در گروه‌های مختلف، گروه کنترل ( $n=7$ )، گروه سالم + XCT90 ( $n=8$ )، گروه تمرین استقامتی ( $n=8$ ) و تمرین استقامتی + XCT790 ( $n=7$ )

\* اختلاف معنی دار با گروه کنترل سالم ( $P < 0.05$ )

کنترل مهار وجود نداشت. با مهار  $ERR\alpha$ ، اثرات تمرین استقامتی بر بیان CPT1 $\beta$  در عضله دوقلوی میانی تعدیل شد و اختلاف معنی داری بین گروه تمرین استقامتی + XCT790 و تمرین استقامتی وجود داشت ( $P < 0.001$ ) (نمودار ۲).

با انجام چهار هفته تمرین استقامتی افزایش ۴/۵ برابری در بیان ژن CPT1 $\beta$  در گروه تمرین استقامتی نسبت به گروه کنترل دیده شد ( $P < 0.001$ ). مهار  $ERR\alpha$  به خودی خود اثری بر بیان CPT1 $\beta$  نداشت. چرا که اختلاف معنی داری برای بیان این فاکتور در عضله دوقلوی میانی بین گروه کنترل سالم و



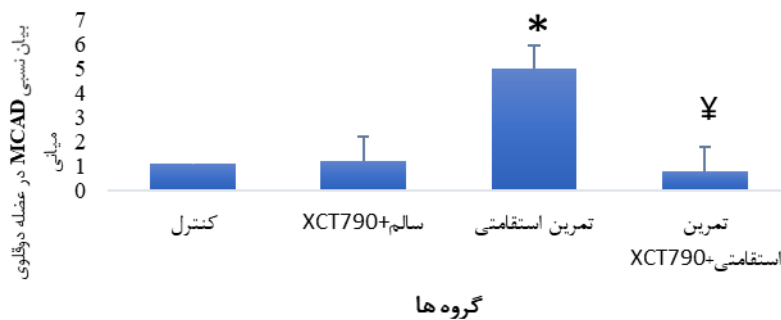
نمودار ۲: بیان نسبی CPT1b در گروه‌های مختلف، گروه کنترل (n=7)، گروه سالم XCT90+ (n=8)،

گروه تمرین استقامتی (n=8) و تمرین استقامتی + XCT790 (n=7)

\* اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل سالم ( $P < 0.05$ )؛ † اختلاف معنی‌دار با گروه تمرین استقامتی ( $P < 0.05$ )

دوقلوی میانی کاملاً ملغی گردید و بیان این فاکتور در گروه تمرین استقامتی+XCT790 به ۲۲ درصدی گروه تمرین استقامتی سالم رسید (نمودار ۳).

انجام چهار هفته تمرین استقامتی منجر به افزایش ۴/۵ برابری در بیان ژن MCAD در عضله دوقلوی گروه تمرین استقامتی در مقایسه با گروه کنترل سالم شد ( $P < 0.001$ ). با مهار  $ERR\alpha$ ، اثر تمرین استقامتی بر بیان MCAD در عضله



نمودار ۳: بیان نسبی MCAD در گروه‌های مختلف، گروه کنترل (n=7)، گروه سالم XCT90+ (n=8)، گروه تمرین استقامتی (n=8) و

تمرین استقامتی + XCT790 (n=7)

\* اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل سالم ( $P < 0.05$ )؛ † اختلاف معنی‌دار با گروه تمرین استقامتی ( $P < 0.05$ )

## بحث

راستا با بیان MCAD و  $CPT1\beta$  افزایش می‌یابد. همچنین، افزایش ناشی از تمرین در MCAD و  $CPT1\beta$  وابسته به افزایش بیان  $ERR\alpha$  در عضله اسکلتی است که موید این نکته است که بخشی از سازگاری‌های حاصله از تمرین در اکسیداسیون لیپید به واسطه تغییرات  $ERR\alpha$  در عضله اسکلتی واسطه‌گری می‌شود. در تحقیق حاضر از XCT790 به عنوان آگونیست مخالف آن برای مهار فعالیت  $ERR\alpha$  استفاده شد که استفاده از آن در

پژوهش حاضر به منظور بررسی اثرات بلندمدت تمرین استقامتی بر بیان ژن‌های  $ERR\alpha$ ، MCAD،  $CPT1b$  در عضله دوقلوی میانی رت‌های نر نژاد ویستار و تعیین نقش  $ERR\alpha$  در تسهیل اکسیداسیون لیپید ناشی از تمرین استقامتی انجام شد. مهم‌ترین نتایج به دست آمده این بود که بیان  $ERR\alpha$  در عضله اسکلتی فاکتوری تمرین‌پذیر است و متعاقب تمرین استقامتی بیان آن در عضله دوقلوی میانی رت‌های نر نژاد ویستار هم

تحقیقات پیشین نیز گزارش شده است (۱۷،۱۹،۲۱). این ماده ترکیبی سنتزی است و فعالیت ERR $\alpha$  را کاهش می‌دهد (۲۲). XCT790 نه تنها اثرات رونویسی ERR $\alpha$  را سرکوب می‌کند بلکه ارتباط متقابل بین ERR $\alpha$  و PGC-1 $\alpha$  را نیز مختل می‌کند (۱۹،۲۱). همچنین به دلیل ضرورت دریافت داروی XCT790 جهت القاء مهار ERR $\alpha$  به طور روزانه و با توجه به اثرات جانبی این دارو در مرگومیر حیوانات، پروتکل تمرینی فقط به مدت چهار هفته بر گروه‌های تمرینی اعمال شد.

با توجه به مدت‌زمان کوتاه اعمال پروتکل تمرینی، جهت اطمینان از اثربخش بودن پروتکل تمرینی در وقوع دستاوردهای بلندمدت تمرینی، میزان بیان سیترات سنتاز که افزایش آن متعاقب تمرین استقامتی کاملاً تثبیت شده است، اندازه‌گیری شد. بیان این فاکتور در گروه تمرین استقامتی سالم ۱/۸۶ برابر گروه کنترل سالم بود که موید اثربخش بودن پروتکل تمرینی اعمال شده در وقوع دستاوردهای بلندمدت تمرینی است.

همچنین در تحقیق حاضر از عضله دوقلوی میانی برای بررسی متغیرهای تحقیق استفاده شده چرا که عضله دوقلوی میانی یکی از گروه‌های عضلانی اصلی است که در دویدن روی تردمیل درگیر است (۲۳) و همچنین به دلیل اینکه قسمت‌های مختلف عضله دوقلو، خصوصیات متفاوتی دارند از تمامی حیوانات فقط بخش میانی عضله استخراج گردید.

بیان ERR $\alpha$  در عضله اسکلتی متعاقب چهار هفته تمرین استقامتی افزایش معنی‌داری داشت؛ که دلیل این افزایش را می‌توان در رسالت این فاکتور در فراهمی انرژی در بافت‌هایی که مستلزم تامین مقادیر انرژی زیاد هستند، جست‌وجو کرد (۱۵). بیان بالای ERR $\alpha$  برای رفع نیازهای انرژی پایه غیرضروری اما حضورش برای فراهم کردن سطوح بالای انرژی در پاسخ به رویدادهایی همانند محرک‌های تمرینی لازم است (۲۴). تمرین اعمال شده در تحقیق حاضر (۲۷ متر بر دقیقه)، شدتی معادل با تمرین با ۷۵٪ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی دارد که در خلال چنین تمرینی انرژی مصرفی عضله اسکلتی به بیشتر از پنج برابر حالت استراحت افزایش می‌یابد (۲۵).

نتایج تحقیق حاضر با نتایج تحقیق کارتنی (Cartoni) و همکاران که در دوچرخه‌سواران تایم تریل میزان ERR $\alpha$  را اندازه‌گیری کردند و افزایش بیان این فاکتور را گزارش کردند همخوانی دارد (۱۵). پیامد این سطح نیاز به انرژی سازگاری‌هایی است که در عضله اسکلتی اتفاق می‌افتد تا با این نیاز متابولیک را مرتفع سازد. افزایش ۴/۵ برابری در CPT1 $\beta$  و MCAD مشاهده شده در تحقیق حاضر نیز خود موید این نیاز متابولیکی اعمال شده بر عضله اسکلتی گروه‌های تمرینی سالم است. لذا، با توجه به نقش ERR $\alpha$  در تنظیم انرژی سلولی، بخشی از افزایش بیان ERR $\alpha$  در اثر تمرین استقامتی، می‌تواند در جهت تامین این نیاز متابولیکی باشد.

MCAD، آنزیم کلیدی چرخه بتااکسیداسیون و CPT1 $\beta$  به عنوان آنزیم محدودکننده برداشت میتوکندریایی اسیدهای چرب به عنوان ژن‌های هدف و مهم ERR $\alpha$  شناسایی شده‌اند. به عنوان مثال نشان داده شده است که بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های مسئول اکسیداسیون لیپید نظیر CPT1 $\beta$  و MCAD در پاسخ به افزایش بیان ERR $\alpha$  افزایش می‌یابد (۱۲) یا در بررسی اثر ERR $\alpha$  بر بیان MCAD در محیط‌های آزمایشگاهی (in vitro)، افزایش مجازی سطوح ERR $\alpha$  در میوسیت‌های قلبی عاری از ERR $\alpha$  منجر به افزایش معنی‌دار اکسیداسیون پالمیتات شده است (۱۰،۱۲). در نتایج تحقیق حاضر نیز افزایش در بیان ERR $\alpha$  موازی با افزایش در بیان CPT1 $\beta$  و MCAD اتفاق افتاد. افزایش هم‌راستای ERR $\alpha$  با CPT1 $\beta$  و MCAD به نوعی این مطلب را تأیید می‌نماید که بخشی از افزایش ERR $\alpha$  در عضله اسکلتی در جهت تسهیل هر چه بیشتر اکسیداسیون لیپید در عضله اسکلتی اتفاق می‌افتد. تمرین استقامتی فعالیت CPT1 $\beta$  عضله اسکلتی را در رت‌ها افزایش می‌دهد (۲۸-۲۶) و از طرفی والاس و همکاران که میزان بیان این فاکتور را در مردان سالم با دوچرخه کارسنج مورد بررسی قرار دادند افزایش بیان این فاکتور را گزارش کردند که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد (۱۶). برثون و همکاران افزایش در فعالیت CPT-1 را موازی با افزایش Vo2max گزارش کردند (۲۶). تحقیقات نشان می‌دهد که بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های اکسیداسیون اسید چرب

تحقیق حاضر صادق نبود. عدم وقوع پاسخ بار دیگر این نکته را گوشزد می‌کند که افزایش بیان  $ERR\alpha$  در بافتی نظیر عضله اسکلتی تنها در صورتی اتفاق می‌افتد که آن بافت نیاز متابولیکی فراتر از حد متعارف را دریافت نماید و تائید بر مطلب ارائه شده در قسمت‌های پیشین مبنی بر دخالت نیاز متابولیکی بافتی در افزایش بیان  $ERR\alpha$  در پاسخ به تمرین استقامتی است. از طرف دیگر در گروه‌های تمرینی، نتایج نشان دادند که سطوح MCAD و  $ERR\alpha$  عضله دوقلوی میانی هم‌راستا با یکدیگر در پاسخ به تمرین استقامتی افزایش می‌یابند اما این افزایش در گروه تمرین استقامتی که مهارکننده XCT790 را دریافت کردند تنها در فاکتور  $CPT1\beta$  قابل مشاهده بود. این امر نشان‌دهنده این است که بیان  $CPT1\beta$  توسط مسیرهای جبرانی دیگر که مستقل از  $ERR\alpha$  هستند واسطه‌گری می‌شود. با این وجود مهار  $ERR\alpha$  پاسخ افزایش MCAD را در گروه تمرین استقامتی+XCT790 را تقریباً به طور کامل مختل می‌کند که نشان‌دهنده این است که حداقل بخشی از سازگاری‌های تمرینی ایجاد شده در این فاکتور از طریق  $ERR\alpha$  واسطه‌گری می‌شود.

### نتیجه گیری

با توجه به نتایج این پژوهش تمرین استقامتی باعث افزایش بیان  $ERR\alpha$  می‌شود و از آنجایی که این فاکتور نقش مهمی در هومئوستاز انرژی دارد از این رو بیان MCAD و  $CPT1\beta$  را تحت تأثیر قرار می‌دهد اما در مسیرهایی که  $ERR\alpha$  به شکلی دچار اختلال شود MCAD بیشترین تأثیر را می‌پذیرد ولی  $CPT1\beta$  احتمالاً مسیرهای جبرانی که مستقل از  $ERR\alpha$  است را اتخاذ می‌کند. تحقیق حاضر قادر به ارائه مسیرهایی که عملکرد  $CPT1\beta$  را کنترل می‌کنند نیست و از آنجایی که یکی از هم فعال‌کننده‌های اصلی  $ERR\alpha$  در مسیر سیگنالینگ این فاکتور، PGC-1 $\alpha$  است پیشنهاد می‌شود که محققان اثرات متقابل این فاکتور را نیز در کنار  $ERR\alpha$  روی متابولیسم لیپید مورد بررسی قرار دهند.

### سپاسگزاری

از جناب آقای دکتر روح‌الله نیکویی عضو هیات علمی دانشکده تربیت‌بدنی و علوم ورزشی دانشگاه شهید باهنر کرمان

میتوکندریایی (CPT1b, M-CPT1] و MCAD) در پاسخ به بیان  $ERR\alpha$  یا PGC-1 $\alpha$  افزایش می‌یابد (۱۲).

همچنین  $ERR\alpha$  فاکتوری است که با PGC-1 $\alpha$  رابطه متقابل متابولیکی دارد بدین گونه که هم فعال‌سازی این دو برای کنترل هموستاز متابولیکی سلول ضروری است. هم فعال‌کننده‌های  $ERR\alpha$  مانند PGC-1 $\alpha$  فرآیندهای متابولیکی بنیادی شامل تکوین میتوکندیایی، فسفوریلاسیون اکسیداتیو، اکسیداسیون اسیدهای چرب را تنظیم می‌کنند و شاید یکی از اثربخش‌ترین و اختصاصی‌ترین استراتژی بهبود فسفوریلاسیون اکسیداتیو (OXPHOS) عملکرد متقابل PGC-1 $\alpha$ / $ERR\alpha$  باشد (۲۹). این رابطه بدین گونه است که با افزایش بیان PGC-1 $\alpha$ ، بیان  $ERR\alpha$  نیز افزایش می‌یابد. بیان PGC-1 $\alpha$  در تحقیق حاضر در گروه تمرین استقامتی افزایش معنی‌دار داشت (داده‌های گزارش نشده)، لذا این احتمال وجود دارد که بخشی از افزایش مشاهده شده در بیان  $ERR\alpha$  از طریق افزایش بیان PGC-1 $\alpha$  واسطه‌گری شود. با این وجود صحبت دقیق در این مورد نیازمند انجام تحقیقات بعدی است. علاوه بر مطالب ذکر شده در تفسیر چرایی افزایش  $ERR\alpha$  در پاسخ به تمرین استقامتی بلندمدت، در تحقیق حاضر فرضیه‌ای مبنی بر نقش  $ERR\alpha$  در سازگاری‌های ایجاد شده در متابولیسم لیپید متعاقب تمرین استقامتی توسعه یافت. این فرضیه بر این اساس مطرح گردید که با وجود هم‌راستا بودن افزایش MCAD و  $CPT1\beta$  با  $ERR\alpha$  دلیل بر رابطه علت و معمولی نیست، از این رو برای اطمینان از نقش  $ERR\alpha$  در متابولیسم لیپید از مهار  $ERR\alpha$  با استفاده از تزریق درون صفاقی XCT790 استفاده شد، آگونیستی که با مختل کردن رابطه بین PGC-1 $\alpha$  و  $ERR\alpha$  اعمال بیولوژیک  $ERR\alpha$  را خنثی می‌کند. اولین نکته جالب به دست آمده این بود که علی‌رغم مهار عملکرد  $ERR\alpha$  در گروه کنترل مهار، بیان فاکتور بعد از چهار هفته در عضله دوقلوی میانی تغییر نکرد. معمولاً پاسخ یک فاکتور متابولیکی بر مهار عملکرد آن با افزایش در بیان آن فاکتور، به عنوان یک پاسخ جبرانی، مخصوصاً در مراحل نسخه‌برداری انجام می‌شود. لیکن این موضوع در مورد نتایج



و همچنین همکاران محترم مرکز تحقیقات فیزیولوژی کرمان،  
جناب آقای یاسر معصومی و آقای بیدالله شاهوزهی که در طول  
انجام این پژوهش حداکثر همکاری را داشتند نهایت تشکر و  
قدردانی را داریم.

## References:

- 1- Smekal G, von Duvillard SP, Pokan R, Tschan H, Baron R, Hofmann P, et al. *Effect of endurance training on muscle fat metabolism during prolonged exercise: agreements and disagreements*. Nutrition 2003; 19(10): 891-900.
- 2- Horowitz JF, Klein S. *Lipid metabolism during endurance exercise*. Am J Clin Nutr 2000; 72(2): 558S-63S.
- 3- Talanian JL, Holloway GP, Snook LA, Heigenhauser GJ, Bonen A, Spriet LL. *Exercise training increases sarcolemmal and mitochondrial fatty acid transport proteins in human skeletal muscle*. Am J Physiol Endocrinol Metab 2010; 299(2): E180-8.
- 4- Chen X, Zhang F, Gong Q, Cui A, Zhuo S, Hu Z, et al. *Hepatic ATF6 Increases Fatty Acid Oxidation to Attenuate Hepatic Steatosis in Mice Through Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha*. Diabetes 2016; 65(7): 1904-15.
- 5- Pedraza-Chaverri J, Sanchez-Lozada LG, Osorio-Alonso H, Tapia E, Scholze A. *New Pathogenic Concepts and Therapeutic Approaches to Oxidative Stress in Chronic Kidney Disease*. Oxid Med Cell Longev 2016; 2016: 6043601.
- 6- Suwa M, Nakano H, Radak Z, Kumagai S. *Endurance exercise increases the SIRT1 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha protein expressions in rat skeletal muscle*. Metabolism 2008; 57(7): 986-98.
- 7- Miljkovic I, Yerges LM, Li H, Gordon CL, Goodpaster BH, Kuller LH, et al. *Association of the CPT1B gene with skeletal muscle fat infiltration in Afro-Caribbean men*. Obesity (Silver Spring) 2009; 17(7): 1396-401.
- 8- Tunstall RJ, Mehan KA, Wadley GD, Collier GR, Bonen A, Hargreaves M, et al. *Exercise training increases lipid metabolism gene expression in human skeletal muscle*. Am J Physiol Endocrinol Metab 2002; 283(1): E66-72.
- 9- Murray J, Auwerx J, Huss JM. *Impaired myogenesis in estrogen-related receptor gamma (ERRgamma)-deficient skeletal myocytes due to oxidative stress*. FASEB J 2013; 27(1): 135-50.
- 10- Giguere V. *Transcriptional control of energy homeostasis by the estrogen-related receptors*. Endocr Rev 2008; 29(6): 677-96.
- 11- Tremblay AM, Giguere V. *The NR3B subgroup: an ovERRview*. Nucl Recept Signal 2007; 5: e009.

- 12- Huss JM, Torra IP, Staels B, Giguere V, Kelly DP. *Estrogen-related receptor alpha directs peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling in the transcriptional control of energy metabolism in cardiac and skeletal muscle*. Mol Cell Biol 2004; 24(20): 9079-91.
- 13- Mootha VK, Bunkenborg J, Olsen JV, Hjerrild M, Wisniewski JR, Stahl E, et al. *Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria*. Cell 2003; 115(5): 629-40.
- 14- Sladek R, Bader JA, Giguere V. *The orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha is a transcriptional regulator of the human medium-chain acyl coenzyme A dehydrogenase gene*. Mol Cell Biol 1997; 17(9): 5400-9.
- 15- Cartoni R, Leger B, Hock MB, Praz M, Crettenand A, Pich S, et al. *Mitofusins 1/2 and ERRalpha expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise*. J Physiol 2005; 567(1): 349-58.
- 16- Wallace MA, Lamon S, Russell AP. *The regulation and function of the striated muscle activator of rho signaling (STARS) protein*. Front Physiol 2012; 3: 469.
- 17- Hu JZ, Long H, Wu TD, Zhou Y, Lu HB. *The effect of estrogen-related receptor alpha on the regulation of angiogenesis after spinal cord injury*. Neuroscience 2015; 80: 570-80.
- 18- Teyssier C, Bianco S, Lanvin O, Vanacker JM. *The orphan receptor ERRalpha interferes with steroid signaling*. Nucleic Acids Res 2008; 36(16): 5350-61.
- 19- Eskiocak B, Ali A, White MA. *The estrogen-related receptor alpha inverse agonist XCT 790 is a nanomolar mitochondrial uncoupler*. Biochemistry 2014; 53(29): 4839-46.
- 20- Mansouri M, Nikooie R, Keshtkar A, Larijani B, Omidfar K. *Effect of endurance training on retinol-binding protein 4 gene expression and its protein level in adipose tissue and the liver in diabetic rats induced by a high-fat diet and streptozotocin*. J Diabetes Investig 2014; 5(5): 484-91. [persian]
- 21- Lanvin O, Bianco S, Kersual N, Chalbos D, Vanacker JM. *Potentiation of ICI182,780 (Fulvestrant)-induced estrogen receptor-alpha degradation by the estrogen receptor-related receptor-alpha inverse agonist XCT790*. J Biol Chem 2007; 282(39): 28328-34.
- 22- Bianco S, Lanvin O, Tribollet V, Macari C, North S, Vanacker JM. *Modulating estrogen receptor-related receptor-alpha activity inhibits cell proliferation*. J Biol Chem 2009; 284(35): 23286-92.
- 23- Egan B, Zierath JR. *Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation*. Cell Metab 2013; 17(2): 162-84.
- 24- Deblois G, Giguere V. *Functional and physiological genomics of estrogen-related receptors (ERRs) in health and disease*. Biochim Biophys Acta 2011; 1812(8): 1032-40.
- 25- Hoydal MA, Wisloff U, Kemi OJ, Ellingsen O. *Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training*. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil. 2007; 14(6): 753-60.

- 26- Berthon PM, Howlett RA, Heigenhauser GJ, Spriet LL. *Human skeletal muscle carnitine palmitoyltransferase I activity determined in isolated intact mitochondria*. J Appl Physiol 1998; 85(1): 148-53.
- 27- Starritt EC, Howlett RA, Heigenhauser GJ, Spriet LL. *Sensitivity of CPT I to malonyl-CoA in trained and untrained human skeletal muscle*. Am J Physiol Endocrinol Metab 2000; 278(3): E462-8.
- 28- Jong-Yeon K, Hickner RC, Dohm GL, Houmard JA. *Long- and medium-chain fatty acid oxidation is increased in exercise-trained human skeletal muscle*. Metabolism 2002; 51(4): 460-4.
- 29- Wende AR, Huss JM, Schaeffer PJ, Giguere V, Kelly DP. *PGC-1 $\alpha$  coactivates PDK4 gene expression via the orphan nuclear receptor ERR $\alpha$ : a mechanism for transcriptional control of muscle glucose metabolism*. Mol Cell Biol 2005; 25(24): 10684-94.

# Response of Estrogen-related Receptor Alpha (ERR $\alpha$ ) to Endurance Training and its Participation in Endurance Training-induced Adaptations in Lipid Metabolism in Skeletal Muscle of Male Wistar rats

Soheil Aminizadeh <sup>\*1</sup>, Abdolhamid Habibi <sup>2</sup>, Hamid Marefati <sup>3</sup>, Saeed Shakerian <sup>4</sup>

<sup>1,2,4</sup> Department of Sport Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

<sup>3</sup> Department of Sport Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Bojnourd, Iran

Received: 22 Jan 2017

Accepted: 18 May 2017

## Abstract

**Introduction:** The aim of the present study was to investigate the expression of estrogen-related receptor alpha (ERR $\alpha$ ) - an important factor in cellular energy homeostasis regulation - in skeletal muscle of male Wistar rats after four weeks of endurance training and to determine its role with fat metabolism indexes.

**Methods:** In this experimental study, 30 male Wistar rats (eight weeks-old) were randomly divided into four groups: control (n=7), control+XCT790 (n=8), endurance training (n=8), and endurance training+XCT790 (n=7). ERR $\alpha$  was inhibited by intraperitoneal injection of XCT790 (0.48 mg/kg.day) on daily bases. Four weeks of endurance training (five times per week) started at 15 m/min for 20 min and reached to 27 m/min for 50 min was performed by the animals from trained groups. Expression of ERR $\alpha$ , Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) and Carnitine Palmitoyl Transferase 1 (CPT-1 $\beta$ ) mRNA was measured by Real-Time PCR and quantified by  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. One-way analyses of variance were used for cross-group comparison.

**Results:** The expression of ERR $\alpha$  (P<0.037), MCAD (P<0.001), and CPT1 $\beta$  (P<0.001) mRNA in endurance training group was significantly higher than the control group. The expression of MCAD (P<0.001) and CPT1 $\beta$  mRNA (P<0.001) in the endurance training+XCT790 group was significantly lower compared to those values of the endurance training group.

**Conclusion:** In sum, expression of ERR $\alpha$  is a trainable factor and its changes are parallel with the increase in expression of lipid metabolism indexes; so, it could have a direct role in endurance training-induced adaptation in fat metabolism.

**Keywords:** ERR $\alpha$ ; Lipid metabolism; Endurance training; Oxidative phosphorylation

### This paper should be cited as:

Aminizadeh S, Habibi A, Marefati H, Shakerian S. Response of Estrogen-related Receptor Alpha (ERR $\alpha$ ) to Endurance Training and its Participation in Endurance Training-induced Adaptations in Lipid Metabolism in Skeletal Muscle of Male Wistar rats. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2017; 25(5): 414-25.

\*Corresponding author: Tel: +98-9132474293-03432131948, email: S.amini@sport.uk.ac.ir