مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۵، شماره ۵، مرداد ۱۳۹۶
صفحه: ۴۲۵-۴۱۴

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 25, No.5, Aug 2017
Pages:414-425

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

سهیل امینی زاده*[۱]، عبدالحمید حبیبی[۲]، حمید معرفتی[۳]، سعید شاکریان[۴]

چکیده

مقدمه: هدف از تحقیق حاضر بررسی بیان گیرنده وابسته استروژنی آلفا (ERRα) 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 هفتگی به صورت تصادفی به چهار گروه کنترل (n=۷)، گروه سالم+XCT790 (n=۸)، گروه تمرین استقامتی (n=۸) و تمرین استقامتی+XCT790 (n=۷) تقسیم شدند. مهار ERRα با تزریق درون صفاقی و روزانه XCT790 به میزان ۰/۴۸ mg/kg انجام گرفت. تمرین استقامتی دویدن 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 ERRα، آسیل کوآ دهیدروژناز (MCAD) و کارنیتین پالمیتیل ترانسفراز ۱ بتا (CPT1β) با روش Real-Time PCR اندازه‌گیری و با فرمول $۲^{-\Delta\Delta CT}$ کمی‌سازی و از تحلیل واریانس یک طرفه برای مقایسات بین‌گروهی استفاده شد.

نتایج: بیان ژن ERRα (P<۰/۰۳۷)، MCAD (P<۰/۰۰۱) و CPT1β (P<۰/۰۰۱) در گروه تمرین استقامتی به طور معنی‌داری از گروه کنترل بیشتر بود. در گروه تمرین استقامتی+XCT790 بیان ژن CPT1β (P<۰/۰۰۱)، MCAD (P<۰/۰۰۱) نسبت به گروه تمرین استقامتی به طور معنی‌داری کمتر بود.

نتیجه‌گیری: بیان ERRα در عضله اسکلتی فاکتوری تمرین پذیر است که هم‌راستا با افزایش بیان شاخص‌های متابولیسم لیپید به تمرین استقامتی پاسخ می‌دهد؛ لذا، احتمالاً ERRα نقشی مستقیم در سازگاری متابولیسم لیپید ناشی از تمرین استقامتی دارد.

واژه‌های کلیدی: ERRα؛ 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 دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۳ **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۲/۲۸**

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

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، تری گلیسریدهای درون عضلانی IMTG (Intramyocellular Triacylglycerol)، اسیدهای چرب آزاد و تری‌گلیسریدهای موجود در لیپوپروتئین‌ها می‌باشند (۱). تری آسیل گلیسرول‌های درون عضلانی و اسیدهای چرب آزاد مهم‌ترین منابع تامین انرژی حین تمرین استقامتی هستند که اکسیداسیون آن‌ها به طور فزآینده‌ای 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 (کربس 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 CPT1 (Carnitine Palmitoyl Transferase 1) آنزیم محدود کننده بتااکسیداسیون میتوکندریایی است که برداشت میتوکندریایی آسیل کوآنزیم‌های بلند زنجیر را انجام می‌دهد. ایزوفرم عضلانی آن، CPT1β، 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: ERRα (NR3B1)، ERRβ (NR3B2) و ERRγ (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، ERRα گیرنده‌ای است که به وسیله هم فعال رونویسی (Transcription Coactivator) با PGC-1α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) فعال می‌شود و بسیاری از ژن‌های هدف درگیر در بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب، سیکل کربس، فسفوریلاسیون اکسیداتیو و نهایتاً بیوژنز میتوکندری را تنظیم می‌کند (۱۰). لذا، این فاکتور تنظیم‌کننده‌ای حیاتی در متابولیسم انرژی است. در زمینه نقش ERRα در متابولیسم لیپید، ERRα زیرمجموعه‌ای از ژن‌های هدف PGC-1α 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 CPT1β که جزء مهم در انتقال و بتااکسیداسیون اسیدهای چرب هستند، تحت کنترل ERRα هستند (۱۳). در واقع، فعال شدن ERRα بیان MCAD را تنظیم مثبت می‌کند (۱۴). همچنین، بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های درگیر در اکسیداسیون اسیدهای چرب میتوکندریایی (کارنیتین پالمیتول ترانسفراز I عضلانی-CPTIβ و آسیل کوآنزیم آ دهیدروژناز (MCAD)) در پاسخ به افزایش بیان ERRα افزایش می‌یابند (۱۲). به عنوان مثال، در بررسی اثر ERRα بر بیان MCAD، در محیط‌های in vitro، افزایش مجازی سطوح ERRα در میوسیت‌های قلبی عاری از ERRα منجر به افزایش معنی‌دار اکسیداسیون پالمیتات می‌شود. لذا، با توجه به نقش

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

کاملاً تثبیت شده ERRα 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 ERRα 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 ERRα 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-1α/ERRα 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 بتا (CPT1β)، سطوح mRNA PGC-1α و ERRα در عضله پهن خارجی، سه ساعت بعد از تمرین می‌شود (۱۶). علی‌رغم مشخص بودن افزایش سطوح ERRα 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 ERRα 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 تائید این فرضیه وجود ندارد. لذا هدف اول از تحقیق حاضر، بررسی پاسخ بلندمدت تمرین استقامتی بر بیان ژن ERRα، CPT1β و MCAD در عضله دوقلوی میانی رت‌های نر نژاد ویستار بود و هدف دوم، تعیین نقش ERRα در سازگاری‌های ایجاد شده در شاخص‌های متابولیسم لیپید (MCAD و CPT1β) بود.

روش بررسی

موش‌ها

مطالعه حاضر از نوع تجربی بوده و ۳۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در سن هشت هفتگی در محدوده وزنی ۱۰±۲۰۰ از مرکز تحقیقات فیزیولوژی کرمان خریداری و در شرایط دمایی ۲±۲۲ 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=۷)، گروه کنترلXCT790 + (n=۸)، گروه تمرین استقامتی (n=۸) و تمرین استقامتی + XCT790 (n=۷) تقسیم شدند.

مهار ERRα

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

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

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

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 استفاده شد. تقریباً ۱۰۰ میلی‌گرم بافت عضله دوقلو با روش هاون کوبی پودر و در یک میلی‌لیتر Isol-RNA Lysis Reagent هموژن شد. سپس، محصول هموژن 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 ۶۰۰µL ایزوپروپانول اضافه و در ۱۲۰۰۰ g سانتریفیوژ و total RNA استخراج شد. غلظت RNA و خلوص آن به وسیله کنترل نسبت OD۲۶۰/۲۸۰ محاسبه و مقادیر بین ۱/۸ تا ۲ به عنوان خلوص قابل‌قبول تعریف شد.

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

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

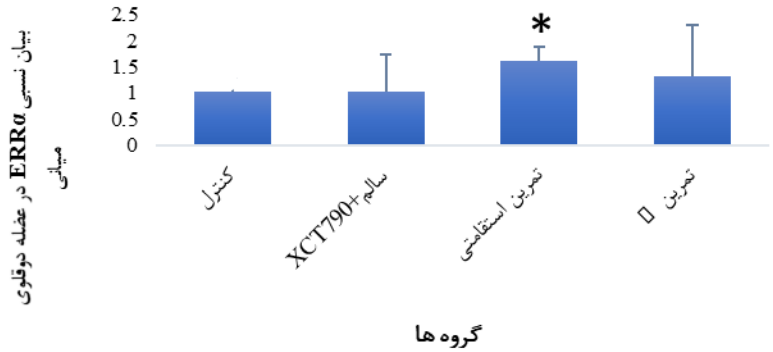
جدول ۲: توالی و اندازه پرایمرهای رفت و برگشت

ژن	Forward primer 5´-3´	Reverse primer 5´-3´	اندازه (bp)
18S	GCAATTATTCCCCATGAACG	GGCCTCACTAAACCATCCAA	۱۲۳
ERRα	AAGCCCTGATGGACACCTC	GAAGCCTGGGATGCTCTTG	۱۰۰
MCAD	CGCCCCAGACTACGATAAAA	CAAGACCACCACAACTCTCC	۱۰۷
CPT1β	GTGCTGGAGGTGGCTTTGGT	TGCTTGACGGATGTGGTTCC	۱۵۲
CS	CGCCCCAGACTACGATAAAA	CAAGACCACCACAACTCTCC	۱۰۷

نتایج

بیان ژن ERRα (P<۰/۰۳۷)، MCAD (P<۰/۰۰۱) و CPT1β (P<۰/۰۰۱) در عضله دوقلوی میانی گروه تمرین استقامتی در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری بیشتر بود (نمودار ۱-۳). در گروه تمرین استقامتی با مهار ERRα، تنها بیان CPT1β عضله اسکلتی نسبت به گروه کنترل بیشتر بود (P<۰/۰۵) و بیان سایر فاکتورها با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت.

نمودار ۱، مقادیر نسبی بیان ژن ERRα را در عضله دوقلوی میانی گروه‌های تحقیق را نشان می‌دهد. انجام تمرین استقامتی منجر به افزایش ۱/۵۸ برابری بیان ERRα در عضله دوقلوی میانی در گروه تمرین استقامتی نسبت به گروه کنترل سالم شد.

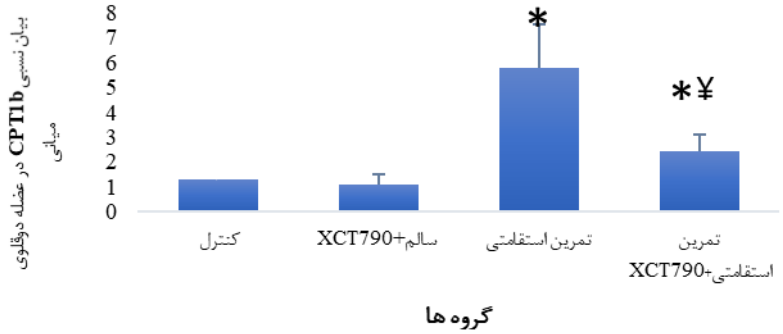


نمودار ۱: بیان نسبی ERRα در گروه‌های مختلف، گروه کنترل (n=۷)، گروه سالم +XCT90(n=۸)، گروه تمرین استقامتی (n=۸) و تمرین استقامتی + XCT790(n=۷)

* اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل سالم (P<۰/۰۵)

با انجام چهار هفته تمرین استقامتی افزایش ۴/۵ برابری در بیان ژن CPT1β در گروه تمرین استقامتی نسبت به گروه کنترل دیده شد (P<۰/۰۰۱). مهار ERRα به خودی خود اثری بر بیان CPT1β نداشت. چرا که اختلاف معنی‌داری برای بیان این فاکتور در عضله دوقلوی میانی بین گروه کنترل سالم و کنترل مهار وجود نداشت. با مهار ERRα، اثرات تمرین استقامتی بر بیان CPT1β در عضله دوقلوی میانی تعدیل شد و اختلاف معنی‌داری بین گروه تمرین استقامتی+XCT790 و تمرین استقامتی وجود داشت (P<۰/۰۰۱) (نمودار ۲).

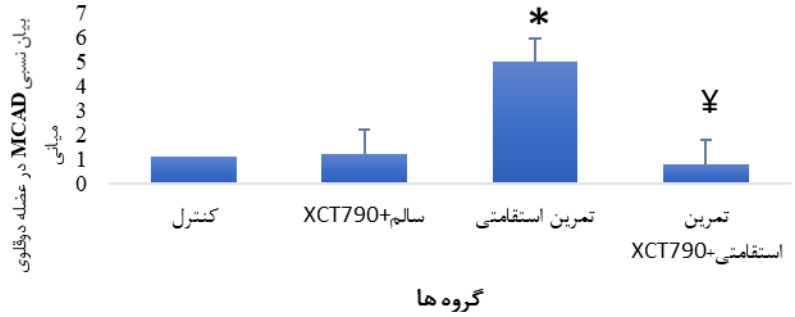
[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]



نمودار ۲: بیان نسبی CPT1b در گروه‌های مختلف، گروه کنترل (n=۷)، گروه سالم +XCT90(n=۸)، گروه تمرین استقامتی (n=۸) و تمرین استقامتی + XCT790(n=۷)

* اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل سالم (P<۰/۰۵)؛ ¥ اختلاف معنی‌دار با گروه تمرین استقامتی (P<۰/۰۵)

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<۰/۰۰۱). با مهار ERRα، اثر تمرین استقامتی بر بیان MCAD در عضله دوقلوی میانی کاملاً ملغی گردید و بیان این فاکتور در گروه تمرین استقامتی+XCT790 به ۲۲ درصدی گروه تمرین استقامتی سالم رسید (نمودار ۳).



نمودار ۳: بیان نسبی MCAD در گروه‌های مختلف، گروه کنترل (n=۷)، گروه سالم +XCT90(n=۸)، گروه تمرین استقامتی (n=۸) و تمرین استقامتی + XCT790(n=۷)

* اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل سالم (P<۰/۰۵)؛ ¥ اختلاف معنی‌دار با گروه تمرین استقامتی (P<۰/۰۵)

بحث

پژوهش حاضر به منظور بررسی اثرات بلندمدت تمرین استقامتی بر بیان ژن‌های ERRα، MCAD، CPT1b در عضله دوقلوی میانی رت‌های نر نژاد ویستار و تعیین نقش ERRα در تسهیل اکسیداسیون لیپید ناشی از تمرین استقامتی انجام شد. مهم‌ترین نتایج به دست آمده این بود که بیان ERRα در عضله اسکلتی فاکتوری تمرین‌پذیر است و متعاقب تمرین استقامتی بیان آن در عضله دوقلوی میانی رت‌های نر نژاد ویستار هم راستا با بیان MCAD و CPT1β افزایش می‌یابد. همچنین، افزایش ناشی از تمرین در MCAD و CPT1β وابسته به افزایش بیان ERRα در عضله اسکلتی است که موید این نکته است که بخشی از سازگاری‌های حاصله از تمرین در اکسیداسیون لیپید به واسطه تغییرات ERRα در عضله اسکلتی واسطه‌گری می‌شود.

در تحقیق حاضر از XCT790 به عنوان آگونیست مخالف آن برای مهار فعالیت ERRα استفاده شد که استفاده از آن در

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

تحقیقات پیشین نیز گزارش شده است (۱۷،۱۹،۲۱). این ماده ترکیبی سنتزی است و فعالیت ERRα را کاهش می‌دهد (۲۲). XCT790 نه تنها اثرات رونویسی ERRα را سرکوب می‌کند بلکه ارتباط متقابل بین ERRα و PGC-1α را نیز مختل می‌کند (۱۹،۲۱). همچنین به دلیل ضرورت دریافت داروی XCT790 جهت القاء مهار ERRα 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 استفاده‌شده 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 ERRα 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 ERRα 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 ERRα 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 CPT1β و MCAD مشاهده‌شده در تحقیق حاضر نیز خود موید این نیاز متابولیکی اعمال شده بر عضله اسکلتی گروه‌های تمرینی سالم است. لذا، با توجه به نقش ERRα در تنظیم انرژی سلولی، بخشی از افزایش بیان ERRα در اثر تمرین استقامتی، می‌تواند در جهت تامین این نیاز متابولیکی باشد.

MCAD، آنزیم کلیدی چرخه بتااکسیداسیون و CPT1β به عنوان آنزیم محدودکننده برداشت میتوکندریایی اسیدهای چرب به عنوان ژن‌های هدف و مهم ERRα شناسایی شده‌اند. به عنوان مثال نشان داده شده است که بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های مسئول اکسیداسیون لیپید نظیر CPT1β و MCAD در پاسخ به افزایش بیان ERRα افزایش می‌یابد (۱۲) یا در بررسی اثر ERRα بر بیان MCAD در محیط‌های آزمایشگاهی (in vitro)، افزایش مجازی سطوح ERRα در میوسیت‌های قلبی عاری از ERRα منجر به افزایش معنی‌دار اکسیداسیون پالمیتات شده است (۱۰،۱۲). در نتایج تحقیق حاضر نیز افزایش در بیان ERRα موازی با افزایش در بیان CPT1β و MCAD اتفاق افتاد. افزایش هم‌راستای ERRα با CPT1β و MCAD به نوعی این مطلب را تائید می‌نماید که بخشی از افزایش ERRα در عضله اسکلتی در جهت تسهیل هر چه بیشتر اکسیداسیون لیپید در عضله اسکلتی اتفاق می‌افتد. تمرین استقامتی فعالیت CPT1β 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). برتون 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

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

میتوکندریایی ([CPT1b, M-CPT1] و MCAD) در پاسخ به بیان ERRα یا PGC-1α افزایش می‌یابد (۱۲).

همچنین ERRα فاکتوری است که با PGC-1α رابطه متقابل متابولیکی دارد بدین گونه که هم فعال‌سازی این دو برای کنترل هموستاز متابولیکی سلول ضروری است. هم فعال‌کننده‌های ERRα مانند PGC-1α 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 Oxidative phosphorylation (OXPHOS) عملکرد متقابل PGC-1α/ERRα باشد (۲۹). این رابطه بدین گونه است که با افزایش بیان PGC-1α، بیان ERRα نیز افزایش می‌یابد. بیان PGC-1α 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 ERRα از طریق افزایش بیان PGC-1α واسطه‌گری شود. با این وجود صحبت دقیق در این مورد نیازمند انجام تحقیقات بعدی است. علاوه بر مطالب ذکرشده در تفسیر چرایی افزایش ERRα در پاسخ به تمرین استقامتی بلندمدت، در تحقیق حاضر فرضیه‌ای مبنی بر نقش ERRα 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 CPT1β با ERRα دلیل بر رابطه علت و معمولی نیست، از این رو برای اطمینان از نقش ERRα در متابولیسم لیپید از مهار ERRα با استفاده از تزریق درون صفاقی XCT790 استفاده شد، آگونیستی که با مختل کردن رابطه بین PGC-1α و ERRα اعمال بیولوژیک ERRα را خنثی می‌کند. اولین نکته جالب به دست آمده این بود که علی‌رغم مهار عملکرد ERRα 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 تحقیق حاضر صادق نبود. عدم وقوع پاسخ بار دیگر این نکته را گوشزد می‌کند که افزایش بیان ERRα 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 ERRα در پاسخ به تمرین استقامتی است. از طرف دیگر در گروه‌های تمرینی، نتایج نشان دادند که سطوح MCAD و ERRα 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 CPT1β قابل‌مشاهده بود. این امر نشان‌دهنده این است که بیان CPT1β توسط مسیرهای جبرانی دیگر که مستقل از ERRα هستند واسطه‌گری می‌شود. با این وجود مهار ERRα، 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 ERRα واسطه‌گری می‌شود.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج این پژوهش تمرین استقامتی باعث افزایش بیان ERRα می‌شود و از آنجایی که این فاکتور نقش مهمی در هومئوستاز انرژی دارد از این رو بیان MCAD و CPT1β را تحت تأثیر قرار می‌دهد اما در مسیرهایی که ERRα به شکلی دچار اختلال شود MCAD بیشترین تأثیر را می‌پذیرد ولی CPT1β احتمالاً مسیرهای جبرانی که مستقل از ERRα است را اتخاذ می‌کند. تحقیق حاضر قادر به ارائه مسیرهایی که عملکرد CPT1β را کنترل می‌کنند نیست و از آنجایی که یکی از هم فعال‌کننده‌های اصلی ERRα در مسیر سیگنالینگی این فاکتور، PGC-1α است پیشنهاد می‌شود که محققان اثرات متقابل این فاکتور را نیز در کنار ERRα 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

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

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. I***mpaired 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.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

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. [persion]

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.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

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-1alpha coactivates PDK4 gene expression via the orphan nuclear receptor ERRalpha: a mechanism for transcriptional control of muscle glucose metabolism.*** Mol Cell Biol 2005; 25(24): 10684-94.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

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

Soheil Aminizadeh *[1], Abdolhamid Habibi [2], Hamid Marefati [3], Saeed Shakerian [4]

[1,2,4] Department of Sport Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

[3] 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 (ERRα) - 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). ERRα 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 ERRα, Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) and Carnitine Palmitoyl Transferase 1 (CPT-1β) 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 ERRα (P<0.037), MCAD (P<0.001), and CPT1β (P<0.001) mRNA in endurance training group was significantly higher than the control group. The expression of MCAD (P<0.001) and CPT1β 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 ERRα 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: ERRα; 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 (ERRα) 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**

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]