

## تأثیر تمرین مقاومتی بر میزان اسفنگوزین-۱- فسفات در سطح پلاسمایی و بیان ژن گیرنده‌های $SIP_{1,2,3}$

ابراهیم بنی طالبی<sup>۱</sup>، رضا قراخانلو<sup>۱\*</sup>، مهسا محمد آملی<sup>۲</sup>، کیهان قطره سامانی<sup>۳</sup>، عبدالحسین پرنو<sup>۴</sup>، حسین تیموری<sup>۵</sup>

### چکیده

**مقدمه:** هدف این تحقیق بررسی اثر ۸ هفته تمرین مقاومتی بر میزان اسفنگوزین-۱-فسفات (SIP) پلاسمایی و بیان ژن گیرنده‌های  $SIP_{1,2,3}$  موش صحرائی نر نژاد ویستار می‌باشد.

**روش‌ها:** ۲۴ موش صحرائی ۸ هفته‌ای نر نژاد ویستار (۱۹۰-۲۵۰ گرم) در این مطالعه استفاده شد. بعد از یک هفته آشناسازی حیوانات به صورت تصادفی به گروه کنترل (N=۱۲) و تجربی (N=۱۲) تقسیم شدند. نردبان مقاومتی یک متری با فاصله میله‌های ۲ سانتی متری با شیب ۸۵ درجه به عنوان وسیله تمرین مقاومتی و وزنه‌های متصل شده به دم حیوان به عنوان مقاومت استفاده شد. مقدار SIP در لایه کلروفورم بوسیله دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد. جهت بررسی بیان ژن از تکنیک Real-Time PCR استفاده شد.

**یافته‌ها:** تمرین مقاومتی محتوای SIP در پلاسما ( $P=۰/۰۰۱$ ) را در مقایسه با گروه کنترل افزایش داد. به علاوه، تمرین مقاومتی باعث افزایش بیان ژن گیرنده SIP1 در عضله تاکننده بلند انگشت شست پا (FHL) ( $P=۰/۰۰۱$ ) و عضله نعلی (SOL) ( $P=۰/۰۰۰$ )، SIP2 در عضله FHL ( $P=۰/۰۰۰$ ) و SOL ( $P=۰/۶۰۳$ )، SIP3 در عضله FHL ( $P=۰/۰۲۱$ ) و SOL ( $P=۰/۰۰۹$ ) گروه تمرینی نسبت به گروه کنترل شد.

**نتیجه‌گیری:** می‌توان نتیجه گرفت که تمرین مقاومتی به طور قابل ملاحظه‌ای بر میزان SIP پلاسمای موش صحرائی اثر می‌گذارد. با توجه به نقش ساختاری و عملکردی این اسفنگولیپید و از آنجا که این فاکتور و گیرنده‌های سطح سلولی آن بدنبال یک دوره تمرین مقاومتی افزایش می‌یابد، شاید یکی از فاکتورهای رشدی و مسیرهای سیگنال دهی در سازگاری عضلانی باشد.

**واژگان کلیدی:** تمرین مقاومتی، SIP، گیرنده‌های SIP، عضله تند و کند انقباض

۱- دانشگاه تربیت مدرس تهران

۲- مرکز تحقیقات غدد/ پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳- مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

۴- گروه فیزیولوژی ورزش، دانشگاه رازی کرمانشاه

۵- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

**نشانی:** تهران، جلال آل احمد، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم انسانی، تلفن: ۰۲۱-۸۲۸۸۴۶۴۶، نمابر: ۰۲۱-۸۲۸۸۴۶۴۶، پست الکترونیک: ghara\_re@modares.ac.ir

## مقدمه

فعال سازی فسفولیپاز  $^{13}\text{C}$  (PLC)، تحریک  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>۱۴</sup>، فعال سازی ERK1/2، آدنیلات سیکلاز C (AC)<sup>۱۵</sup>، MAPK، PI3Kinase، Rac و Rho، Akt، JNK، فسفولیپاز D (PLD)<sup>۱۶</sup> و دیگر واسطه های پایین رونده باعث افزایش جریان کلسیم درون سلولی و مهار تجمع cAMP می شود [۱۲-۱۴] که در نهایت منجر به فعال سازی فاکتورهای نسخه برداری، پروتئین های سیتواسکلتون، بیان مولکول های چسبان<sup>۱۷</sup>، فعالیت کاسپازها<sup>۱۸</sup> می گردند [۱۵]. در مورد اثرات SIP بر کنترل هموستاز قند خون تحقیقات نشان داد که افزایش قند خون منجر به افزایش تولید SIP و متعاقباً ترشح انسولین می گردد [۱۶]. مطالعات *in vitro* نشان داد که آنزیم SK1 و تولید SIP در مسیر سیگنالی انسولین درگیر بوده و نقش مهمی در جذب گلوکز تحریک شده با انسولین<sup>۱۹</sup> ایفاء می کند [۱۷]. SIP می تواند منجر به ترشح انسولین غیر تحریک شده با گلوکز از طریق مسیر سیستم فسفولیپاز C- $\text{Ca}^{2+}$  گردد [۱۸]. به علاوه SIP می تواند بهبود زخم در موش های دیابتی را تسریع نماید [۱۹]. Donati و همکاران نیز به نقش SIP در تکثیر و بقاء مزونژیو- بلاستها<sup>۲۰</sup> اشاره داشتند [۲۰]. اضافه کردن برونزاد SIP باعث تحریک رشد میوفیبرهای در حال بازسازی شد، در حالیکه کاهش محتوای سیستمی این لیپید از طریق خنثی کردن تولید آن، باعث نتایج معکوس شد. این تحقیق اشاره داشت که این لیپید بیواکتیو به عنوان یک فاکتور رشد جدید در رشد سلول می باشد [۲۱]. SIP می تواند اثرات سودمندی بر مقاومت در برابر خستگی داشته باشد و باعث تحریک انقباض عضلانی [۲۲] گردد. یک جلسه ورزش طولانی مدت با شدت متوسط منجر به افزایش محتوای اسفنگوزین گردید [۲۳]. Danielli-Betto و همکاران نشان دادند که ورزش حاد طولانی مدت محتوای SIP در عضله نعلی و بخش قرمز عضله دو قلو را افزایش داد [۲۲]. Błachnio-Zabielska و همکاران نشان دادند که در عضله

سلول های یوکاریوتیک<sup>۱</sup> به وسیله یک لایه چربی احاطه شده که ترکیبی از گلیسرولیپید<sup>۲</sup>، اسفنگولیپید (SLs)<sup>۳</sup> و استرول<sup>۴</sup> می باشند [۱،۲]. اسفنگولیپیدها که شامل اسفنگوزین<sup>۵</sup>، اسفنگوزین-۱-فسفات (SIP)<sup>۶</sup>، اسفنگانین<sup>۷</sup>، اسفنگوزین-۱-فسفوکلین (SIPch)<sup>۸</sup>، سرامید<sup>۹</sup> و سرامید-۱-فسفات<sup>۱۰</sup> می باشند علاوه بر نقش ساختاری، در تنظیم تکثیر، تمایز، هایپرتروفی، مرگ برنامه ریزی شده سلولی<sup>۱۱</sup>، مقاومت انسولینی، چاقی، تصلب شرایین و عملکرد قلب و عروق درگیر می باشد [۱-۴]. به طور عمده منابع درون سلولی SIP از پلاکت ها و گلوبول های قرمز خون (RBCs) می باشد [۴،۵]. غلظت های بالایی از SIP در پلاسما و سرم خون یافت می شود [۷]. تحقیقات نشان می دهد مقدار SIP بعد از تحریک پلاکت ها در جریان خون افزایش می یابد [۸]. دو آنزیم اسفنگوزین-۱-فسفات کیناز (SK)، آنزیمی که اسفنگوزین را به محصول SIP فسفوریله می کند مشخص شده (SK1, SK2) است. این دو آنزیم دارای نقش های متفاوت می باشند، به طوری که SK1 باعث رشد سلول و بقاء و SK2 باعث توقف رشد سلول و افزایش مرگ برنامه ریزی شده سلول می گردد [۹]. SIP می تواند به عنوان یک واسطه خارج سلولی در کنترل تحریک پذیری سلول از طریق متصل شدن به گیرنده های موجود در غشاء [۱۰] که خانواده ای از پروتئین های جفت شده به G-پروتئین ها<sup>۱۲</sup> که (EDG-1)SIP، (EDG-2)SIP، (EDG-3)SIP، (EDG-4)SIP، (EDG-5)SIP، (EDG-6)SIP، (EDG-7)SIP، (EDG-8)SIP نام دارند متصل شده و باعث فعال شدن آنها شوند [۱۰،۱۱]. گیرنده های SIP به G-پروتئین های مختلفی که شامل  $G_{\alpha, i, q}$  and  $12/13$  می باشند جفت می شوند [۱۲] و از طریق

13 Phospholipase C (PLC)

14  $\text{Ca}^{2+}$  mobilisation

15 Adenylate cyclase (AC)

16 Phospholipase D(PLD)

17 Adhesion molecule

18 Caspases

19 Insulin-stimulated glucose uptake

20 Mesoangioblast

1 Eukaryotic cells

2 Glycerolipids

3 Sphingolipids (SLs)

4 Sterols

5 Sphingosine

6 Sphingosine-1-phosphate (SIP)

7 Sphinganine

8 Sphingosine-1-phosphocholine (SIPCh)

9 Ceramide

10 Ceramid-1-phosphate

11 Apoptosis

12 Family of G protein-coupled receptors

رود. رت ها در پایین پله ها قرار می گرفتند و جهت بالا رفتن برانگیخته می شدند. فقط ضربات بسیار آهسته به دم آنها یا میله های دستگاه انگیزش جهت بالا رفتن بود. در این مطالعه از هیچ گونه پاداش غیر طبیعی و تحریک غیرطبیعی مثل تحریک الکتریکی، آب سرد و فشار هوا استفاده نشد. تعداد تکرارها در هر جلسه ۲۰ تکرار بود. وقتی یک حیوان به بالای دستگاه می رسید و یک تکرار را انجام می داد، بعد از ۴۵ ثانیه برای تکرار بعدی آماده می شد. در شروع هر برنامه ۲ ست ۵ تکراری گرم کردن بدون وزنه انجام می دادند. پروتکل تمرین در هر روز در ۴ ست ۵ تکراری انجام می شد که بعد از هر ست ۲ دقیقه استراحت در نظر گرفته شد. در پایان هر جلسه تمرین حیوان یک ست تمرین ۵ تکراری بدون وزنه با ۳ دقیقه استراحت بین هر تکرار را جهت سرد کردن انجام می داد. این برنامه تمرین برای ۸ هفته ادامه داشت.

**جراحی:** تمام مراحل جراحی در یک جلسه انجام شد. موش ها ۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرین (جهت از بین رفتن اثرات حاد تمرین) از طریق تزریق کتامین (۷۵ mg/kg) و گزالیسین (۲۰ mg/kg) بیهوش و سپس قربانی شدند. عضله تاکننده بلند انگشت شست پا<sup>۱</sup> (FHL) به عنوان عضله تند انقباض و عضله نعلی<sup>۲</sup> (SOL) به عنوان کند انقباض خارج شدند. نمونه های خونی در دستگاه سانتریفیوژ برای ۱۵ دقیقه در دمای ۴°C و ۸۰۰۰g سانتریفیوژ شدند تا سلول های خونی خارج شوند. نمونه های عضلات و پلاسما سریعاً در نیتروژن مایع فریز شده و سپس جهت آنالیزهای بیوشیمیایی بعدی در دمای ۸۰°C- جهت نگهداری شدند.

**اندازه گیری SIP:** SIP و C17-SIP (یک آنالوگ ۱۷ کربنی از SIP، به عنوان استاندارد داخلی) از شرکت Avanti Polar Lipids (Alabaster, Al) خریداری شد. فتال دی آلدهید<sup>۳</sup> (OPA) (که برای تشخیص HPLC فلورومتری مناسب می باشد) و آلکالین فسفاتاز<sup>۴</sup> از شرکت

نعلی رت هیچ تغییری در محتوای SIP تا دقیقه ۹۰ از یک تمرین دو روی تردمیل مشاهده نشد [۲۴]. از آنجا که در مطالعات بالا از SIP به عنوان یک عامل در بهبود ترشح انسولین، بهبود جذب انسولین و عامل میوزنیک با عملکرد گسترده و متنوع نام برده شد و از طرف دیگر هیچ تحقیقی مورد اثرات تمرین بلند مدت مقاومتی بر این فاکتور و بیان گیرنده های آن وجود ندارد، هدف این تحقیق بررسی تاثیر ۸ هفته تمرین مقاومتی بر میزان SIP در پلاسما و بیان گیرنده های سطح سلولی آن (SIP<sub>1,2,3</sub>) در موش صحرایی نژاد ویستار می باشد.

## روش ها

۲۴ سر موش صحرایی (رت) نر نژاد ویستار ۸ هفته ای با وزن ابتدائی ۱۹۰-۲۵ گرم انتخاب شدند. حیوانات در قفس های استاندارد و در محیط کنترل شده با درجه حرارت ۲۲°C و چرخه خواب و بیداری ۱۲:۱۲ نگهداری شدند. غذا به صورت پلیت و آب در دسترس آنها بود. بعد از یک ماه آشناسازی (برای رسیدن به وزن مطلوب و نیز یادگرفتن بالا رفتن از نردبان مقاومتی) حیوانات به صورت تصادفی ساده به یک گروه کنترل (N=۱۲) و یک گروه تمرینی (N=۱۲) تقسیم شدند. حیوانات به صورت جفتی در طول دوره تمرین در قفس قرار داشتند. جهت کنترل سلامت حیوانات وزن آنها هر هفته اندازه گیری می شد. این تحقیق توسط کمیته اخلاق دانشگاه تربیت مدرس تأیید شد. حیوانات مورد استفاده در این تحقیق از مرکز تحقیقاتی پاستور خریداری شدند.

**پروتکل تمرین:** نردبان مقاومتی با یک متر ارتفاع و فاصله میله های ۲ سانتی متری با شیب ۸۵ درجه استفاده گردید. از وزنه هایی که به دم موش های صحرایی بوسیله چسب نواری وصل می شد استفاده گردید. تمرین در هفته اول با وزنه ای معادل ۵۰٪ وزن بدن آنها شروع شد و این وزنه ها به دم آنها (درست ۱-۲ سانتی متر پایین تر از محل رویش مو) متصل شد. بار تمرین تا ۲۰٪ وزن بدن آنها تا پایان هفته هشتم ادامه داشت. یک تکرار موفق وقتی بود که حیوان بتواند پله ها را کامل و در زمان حدود ۸ ثانیه بالا

1 Flexor Hallucis Longus (FHL)

2 Soleus

3 O-phthalaldehyde

4 Alkaline Phosphatase

**18S –**

F: GTTGGTTTTTCGGAAGTGGAGGC,  
R: GTCGGCATCGTTTATGGTTCG (204bp),  
**S1P1** (NM\_017301)-  
F: TCATCGTCCGGCATTACAACATA,  
R: GAGTGAGCTTGTAGGTGGTG (273bp),  
**S1P2** (NM-017192)-  
F: CGGAGGCACTGACTAATCAGATT,  
R: TCCAGCACTCAGGACACAGTTA (278pb),  
**S1P3** (XM-225216)-  
F: ACGCGCGCATCTACTTCCT,  
R: TGGATCTCTCGGAGTTGTGGTT(69bp).

بیان ژن از طریق فرمول  $\Delta\Delta\text{CT}^{(2)}$  محاسبه گردید.

18S یک ژن کنترل و جهت نرمال کردن استفاده شد. از بافت عضله دوقلو<sup>۶</sup> در گروه کنترل (N=12) به عنوان استاندارد جهت بررسی بیان نسبی ژن‌ها استفاده گردید. کل حجم واکنش برابر ۲۰ میکرولیتر بود: این حجم شامل ۱۰ میکرولیتر Master Mix Syber Green (Primer design,UK) (کد: Precision-R-SY)، ۱/۴ میکرولیتر مجموع دو پرایمر (هر پرایمر به مقدار ۵ پیکومول)، ۵ میکرولیتر آب استریل RNAase Free و ۳/۶ میکرولیتر از نمونه cDNA (۵۰ نانوگرم) بود. مراحل PCR شامل یک مرحله دناتوراسیون ۷ در دمای ۹۵°C برای ۱۵ ثانیه، یک دمای جفت شدن<sup>۷</sup> در ۶۰°C برای ۱۵ ثانیه به همراه یک دمای ۷۲°C برای ۳۰ ثانیه که برای ۴۰ سیکل تکرار می‌شد، در پایان نیز یک دمای طویل شدن<sup>۹</sup> ۶۰ ثانیه ای در دمای ۷۲°C بود.

جهت بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون گلوبوگروف-اسمیرنف و جهت آنالیز آماری داده‌های بدست آمده از آزمون پارامتریک t-مستقل استفاده شد.

**یافته‌ها**

تغییر معناداری در وزن حیوانات دو گروه در شروع مطالعه ( $P=0/467$ ) و پس از ۸ هفته تمرین مقاومتی ( $P=0/840$ ) وجود نداشت. تمرین مقاومتی محتوای S1P پلاسما ( $P=0/001$ ) را در مقایسه با گروه کنترل افزایش داد (جدول ۱).

Sigma-Aldrich تهیه شدند. دیگر محلول‌ها مثل اتانول، بتا-مرکاپتواتانسل<sup>۱</sup> از شرکت مرک خریداری شدند (Hohmburg, Germany). تمام استانداردهای لیپیدی به صورت محلول تهیه و در ۲۰°C نگهداری شدند. محتوای S1P موجود در فاز کلروفرم به وسیله دستگاه کروماتوگرافی مایع با فشار بالا<sup>۲</sup> (HPLC) با یک سیستم دتکتور فلوروسنس<sup>۳</sup> اندازه‌گیری شد. بر اساس تحقیق Min و همکاران C17-S1P به عنوان استاندارد داخلی قبل از هموزن کردن نمونه‌ها اضافه شد [۲۵] و نمونه‌ها در محیط یخی اولتراسونیک شدند. S1P موجود در نمونه‌ها از طریق آلکالین فسفاتاز به اسفنگوزین تبدیل شده و این محصولات از طریق OPA قبل از تزریق به دستگاه مشتق سازی شدند. دستگاه HPLC شامل یک دتکتور فلوروسنس با یک ستون C18 بود (Aligent 1200 series NanoLC). محلول مورد استفاده استونیتریل<sup>۴</sup> (مرک) و آب HPLC grade به نسبت (۹:۱۷) بود. میزان جریان<sup>۵</sup> امیلی لیتر در دقیقه بود.

**استخراج RNA:** تقریباً ۵۰ میلی‌گرم عضله با روش هاون کوبی پودر گردید و جهت استخراج کل RNA از دستورالعمل تریزول (Trizol) شرکت Invitrogen استفاده شد. نمونه‌های RNA در دمای ۸۰°C جهت آزمایشات بعدی نگهداری شد.

**ساخت cDNA:** سنتز cDNA با استفاده از کیت Reverse Transcriptase M-MuLV (Fermantas) شماره کاتالوگ (EF0441) مطابق دستور کار شرکت سازنده، با استفاده از پرایمرهای تصادفی هگزامر در دستگاه ترموسایکلر Techne صورت گرفت. محصول تولید شده بلافاصله در دمای ۲۰°C نگهداری شد.

**تعیین بیان ژن:** بررسی بیان ژن. تعیین بیان mRNA نسبی از طریق Real-time RT-PCR با استفاده از دستگاه (48 well) Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR System نسبت به بیان ژن 18s (چند برابر-fold) انجام شد. توالی پرایمر برای ژن‌های 18s, S1P1, S1P2, S1P3:

6 Gastrocnemius  
7 Denaturation  
8 Annealing  
9 Extension

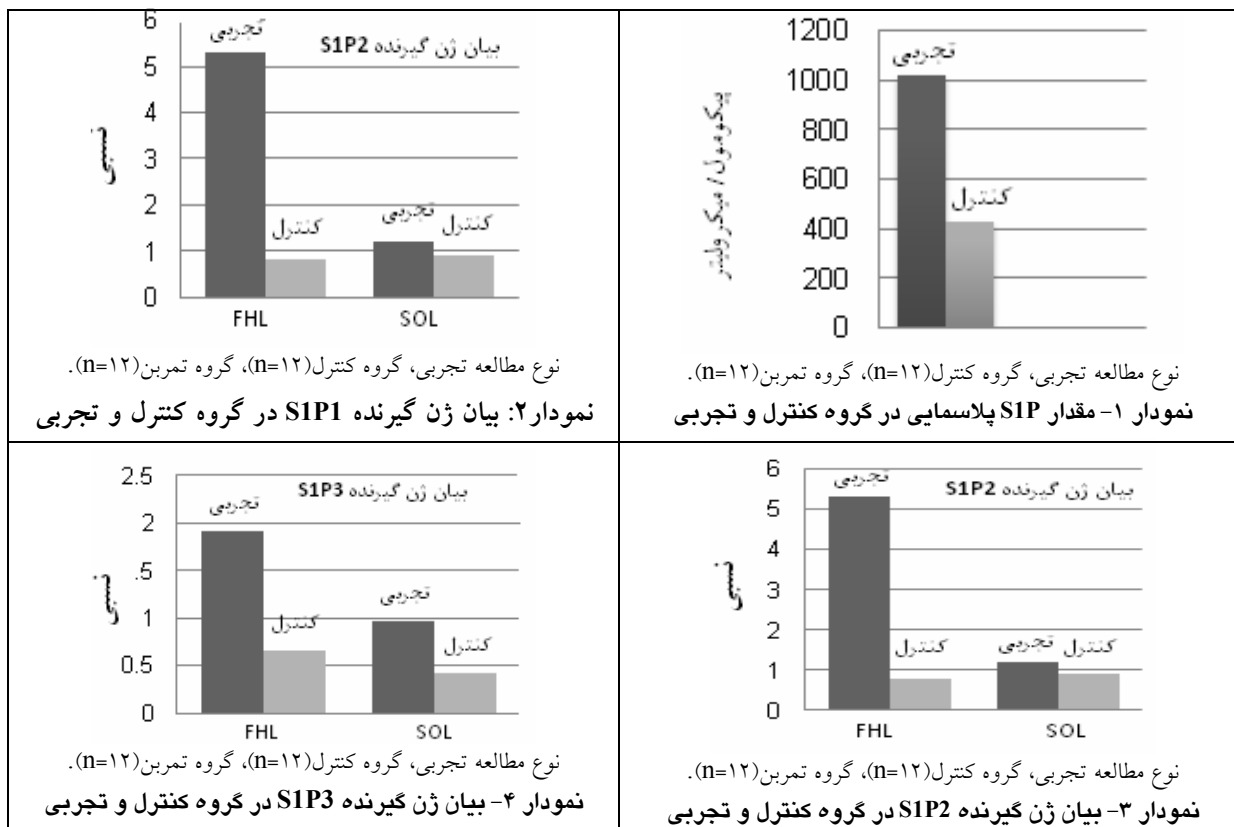
1  $\beta$ -Mercaptoethanol  
2 High pressure liquid chromatography (HPLC)  
3 Fluorescent detection  
4 Acetonitrile  
5 Flow Rate

جدول ۱- مقدار وزن و میزان SIP در پلاسما موش های صحرائی در گروه تمرین و کنترل

مقدار t	گروه کنترل	گروه تمرین	
۰/۲۰۴	۲۲۴/۴۱±۱۵/۷۷	۲۲۳/۲۵±۱۱/۹۵	وزن (گرم) (قبل از تمرین)
۰/۷۳۹	۲۸۰/۵۸±۱۶/۲۰	۲۸۵/۸۳±۱۸/۵۰	وزن (گرم) (بعد از تمرین)
**۴/۰۵۴	۴۳۰/۴۳±۱۹۵/۳۹	۱۰۱۶/۳۸±۴۶۱/۰۱	محتوای SIP پلاسما (pmol/ml)

نوع مطالعه تجربی، گروه کنترل (n=۱۲)، گروه تمرینی (n=۱۲).  
\*\* اختلاف معناداری بین گروه کنترل و تمرین در سطح (P<۰/۰۱)

با توجه به جدول ۱، تغییر معناداری در میزان SIP پلاسمایی بدنبال ۸ هفته تمرین مقاومتی دیده شد (P=۰/۰۰۱).



## بحث

مطالعه اخیر با هدف بررسی اثر ۸ هفته تمرین مقاومتی بر میزان سطح SIP پلاسمایی و بیان ژن های گیرنده های سطح سلولی SIP1,2,3 انجام شد. این مطالعه برای اولین بار محتوای SIP پلاسما و بیان ژن گیرنده های SIP1,2,3 را پس از یک دوره تمرین مقاومتی اندازه گیری کرد. نتایج نشان داد که تمرین مقاومتی به طور قابل ملاحظه ای میزان SIP در پلاسما (P=۰/۰۰۱) را افزایش داد.

در این مطالعه مشاهده شد که در گروه کنترل میزان SIP پلاسما، برابر (pmol/ml) ۴۳۰/۴۳±۱۹۵/۳۹ بود. Jiang and

با توجه به داده های آماری و نمودار ۲، تمرین مقاومتی باعث افزایش بیان ژن گیرنده SIP1 در عضله FHL (p=۰/۰۰۱) و SOL (p=۰/۰۰۰) گردید. با توجه به داده های آماری و نمودار ۳ تمرین مقاومتی باعث افزایش بیان ژن گیرنده SIP2 در عضله FHL (P=۰/۰۰۰) و SOL (P=۰/۰۰۳) گروه تمرینی نسبت به گروه کنترل شد. با توجه به داده های آماری و نمودار ۴ تمرین مقاومتی باعث افزایش بیان ژن گیرنده SIP3 در عضله FHL (P=۰/۰۲۱) و SOL (P=۰/۰۰۹) گروه تمرینی نسبت به گروه کنترل شد.

فیبروبلاست ها و کراتینوسیت ها<sup>۲</sup> و سلول های اقماری<sup>۳</sup> بهبود مقاومت انسولینی، افزایش ترشح انسولین و بهبود هموستاز گلوکز داشته باشد [۳۲]. ممکن است بدنبال تمریناتی شبیه به پرونکل تحقیق حاضر، افزایش فعالیت و/یا تعداد پلاکت ها منجر به افزایش در سطوح SIP مشتق شده از آنها گردد اگر چه نقش سایر منابع تولید SIP را هم نمی توان نادیده گرفت. بلاچنیو<sup>۴</sup> و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که یک وهله تمرین حاد استقامتی محتوای کل SIP را در عضله نعلی و بخش قرمز عضله دوقلو افزایش داد [۳۳]. در تحقیقی نشان داد که به دنبال ۶ هفته تمرین استقامتی افزایش معناداری در سطح پلاسمایی SIP دیده شد. این تحقیق به نکته اشاره می کند که افزایش مقدار SIP می توان یکی از سازوکارهای احتمالی در مورد اثرات سودمند فعالیت بدنی باشد [۳۴].

تمرین مقاومتی باعث افزایش بیان ژن گیرنده SIP1 در عضله FHL ( $P=0/001$ ) و SOL ( $P=0/000$ )، در SIP2 در عضله FHL ( $P=0/000$ ) و SOL ( $P=0/003$ )، در SIP3 در عضله FHL ( $P=0/021$ ) و SOL ( $P=0/009$ ) گروه تمرینی نسبت به گروه کنترل شد.

در این تحقیق نشان داده شد که تمرین مقاومتی میزان بیان mRNA گیرنده SIP1 را افزایش داد و بیان ژن این گیرنده در عضلات مختلف متفاوت بود، به طوریکه بیان این ژن به طور نسبی در تار تند انقباض FHL نسبت به تار کند انقباض در گروه کنترل بالاتر بود، اما از نظر آماری معنادار نبود ( $P=0/326$ ). از طرف دیگر، مقدار بیان این ژن در تارهای تند تمرین کرده در مقایسه با تارهای کند انقباض تمرین کرده بالاتر بود که از نظر آماری معنادار بود ( $P=0/000$ ). همین طور ۸ هفته تمرین مقاومتی باعث افزایش بیان ژن SIP2 در تار تند انقباض FHL تمرین کرده نسبت به کنترل شد ( $P=0/000$ ). در حالی که این تغییرات در تار کند انقباض معنادار نبود ( $P=0/603$ ). در مورد بیان گیرنده SIP3، ۸ هفته تمرین مقاومتی باعث افزایش بیان ژن SIP3 در تار تند انقباض FHL تمرین کرده نسبت به کنترل شد ( $p=0/000$ ) و نوع کند تمرین

Han نشان دادند که میزان SIP پلاسما در موش برابر با  $15/92 \pm 1310/190$  (pmol/mg) بود [۲۶]. در تحقیق دیگری Ruwisch و همکاران نشان دادند که سطوح سرمی SIP انسان و اسب به ترتیب برابر با  $982 \pm 89$  و  $240 \pm 48$  (pmol/mg) بود [۲۷]. Min و همکاران نشان دادند که میزان SIP در سرم گاو و اسب به ترتیب برابر با  $103/4 \pm 21/6$  و  $143/3 \pm 4/8$  (pmol/mg protein) گزارش شد. به علاوه، آنها نشان دادند که سطوح فراوانی SIP در عضله اسکلتی و قلب موش صحرائی به ترتیب برابر با  $76/4 \pm 5/5$  و  $24/2 \pm 4/1$  (pmol/mg protein) گزارش شد [۲۵]. در یک مطالعه Yatomi و همکاران توزیع بافتی SIP را در بافت های موش صحرائی نشان دادند. آنها نشان دادند که سطوح SIP در روده و طحال بالاترین مقدار و در کبد، عضله اسکلتی و قلب موش صحرائی کمترین مقدار بود [۲۸]. دلیل اختلاف به دست آمده در مقادیر SIP در تحقیقات مختلف می تواند به دلیل روش های استخراج و واحد اندازه گیری متفاوت این لیپید و نیز گونه مختلف جمعیت مورد مطالعه می باشد. پلاکت ها مقدار قابل توجهی از SIP را ذخیره می کنند و در حین تحریک و افزایش فعالیت آن را رها می کنند [۸]. تحقیقات نشان داده اند که تمرین ورزشی باعث تغییر در تعداد و عملکرد پلاکت ها می گردد [۲۹]. سازوکارهای مختلفی چون سطوح افزایش یافته اپی نفرین و نوراپی نفرین در پلاسما و تغییر در پاسخ گیرنده های آدرنژیک پلاکت ها می توانند دلیلی برای افزایش فعالیت پلاکت ها بعد از تمرین شدید بدنی باشند [۳۰]. Ahmadizad و همکاران افزایش معناداری در تعداد و فعالیت پلاکت ها در پاسخ به تمرین مقاومتی نشان دادند [۳۱] از طرف دیگر، بعد از ایجاد زخم، عروق آسیب دیده پلاکت ها را فعال می کنند. پلاکت های فعال شده نقش مهمی در فرآیند ترمیم آسیب به وسیله آزاد کردن واسطه های بیواکتیو جهت تکثیر، انتقال سلول، انعقاد و آنژیوژنر ایفا می کنند. به احتمال زیاد SIP نیز چنین واسطه آزاد شده از پلاکت های فعال شده می باشد که می تواند دارای اثرات میتوژنیک/مهاجرت<sup>۱</sup> روی سلول های اطراف مثل سلول های ایندوتلیال، سلول های عضلات صاف،

2 Keratinocytes  
3 Satellite cells  
4 Błachnio-Zabielska

1 Migration

SIP می تواند بازسازی را به وسیله بهبود و بازسازی مجدد شبکه رگی<sup>۱</sup> عضلات آسیب دیده تسهیل نماید. در تحقیق Danieli-Betto و همکاران نشان داده شد که بیان گیرنده های SIP در طول هفته اول بازسازی تغییر می کنند. این تغییرات نشان دهنده درگیری سیگنال SIP، در رخدادهای مولکولی است که مراحل اولیه رشد عضلانی سلول های عضلانی آسیب دیده را کنترل می کند [۲۱]. با توجه به داده های بیان ژن سه گیرنده SIP<sub>1,2,3</sub> می توان نتیجه گرفت که بیان این سه ژن در تارهای نوع تند بیشتر از نوع کند می باشد و از طرف دیگر، اثر تمرین تحقیق حاضر بر تار نوع تند بیشتر از کند می باشد. این ایجاد اختلاف در بیان ژن در بین تار تند و کند به دنبال تمرین مقاومتی می تواند مربوط به اثر تمرین بر نوع خاص تار عضلانی باشد [۳۷].

در مجموع، این تحقیق نشان داد که محتوای SIP پلاسما و بیان ژن گیرنده های SIP<sub>1,2,3</sub> به دنبال یک برنامه تمرین ۸ هفته ای مقاومتی افزایش یافت. این اطلاعات نشان می دهد که تمرین مقاومتی سنتز این لیپید را افزایش، یا تجزیه آن را کاهش و یا فراخوانی آن از منابع مختلف به پلاسما را تسهیل کرده است. هرچند این مطالعه بر جمعیت دیابتی انجام نشده، اما با توجه به آنکه دیابت منجر به از دست رفتن توده عضلانی می گردد [۳۸،۳۹] و از طرف دیگر این فاکتور با بهبود سازوکار گلوکز، مقاومت انسولینی و ترشح انسولین، بهبود زخم، هایپرتروفی و مقابله با مرگ سلولی همراه می باشد، به نظر می رسد که این الگوی تمرین می تواند بر هموستاز گلوکز و آتروفی ناشی از دیابت تاثیر داشته باشد که نیاز تحقیقات بیشتر می باشد. از آنجا که مطالعات قبلی از این لیپید به عنوان یک فاکتور رشدی و تروفیکی و نیز یک فاکتور در جهت بهبود هموستاز گلوکز و مقاومت انسولینی نام برده اند، به نظر می رسد که افزایش در محتوای SIP پلاسما و نیز افزایش بیان ژن گیرنده های سطح سلولی آن بعد از تمرین مقاومتی یک سازوکار موثر در تغییرات ساختمانی و/یا عملکردی ناشی از تمرین مقاومتی چون بهبود مقاومت انسولینی، دیابت، چاقی، آتروفی عضلانی و آسیب های بافتی و عضلانی باشد که

کرده نسبت به کنترل گردید ( $P=0/001$ ). به علاوه، اختلاف معناداری در بیان این ژن در گروه تمرین ( $P=0/003$ ) و گروه کنترل ( $P=0/021$ ) در بین عضله تند انقباض و FHL کند انقباض SOL دیده شد. در تحقیقی، PCR کمی نشان داد که گیرنده SIP1 در بین گیرنده ها در بافت قلبی غالب می باشد و mRNA گیرنده SIP3 در کمترین سطح می باشد [۳۵]. تحقیقی وجود ندارد تا بتوان نتایج حاصل از این تحقیق در مورد تاثیر تمرین، به ویژه تمرین مقاومتی را بر بیان گیرنده های SIPR مقایسه نمود. تعداد معدودی تحقیق به بررسی این گیرنده ها در بافت های مختلف پرداخته است. بسیاری از اثرات سودمند SIP از طریق سازوکار پیامبر اولیه یعنی از طریق اتصال SIP پلاسمایی به گیرنده های سطح سلولی انجام می گردد. لذا در این مطالعه پاسخ این گیرنده ها در عضله اسکلتی تند و کند بررسی گردید.

در تحقیقی Zanin و همکاران نشان دادند که گیرنده های SIP1 و SIP3 در عضله نعلی رت بیان می شود، در حالی که گیرنده SIP2 قابل شناسایی نبود. مقدار بیان گیرنده SIP1 در بالاترین حد بود [۳۶]. به علاوه در این تحقیق نشان داده شد که عصب زدایی با تنظیم منفی هر دو گیرنده SIP1 و SIP3 مرتبط است. این احتمال وجود دارد که فقدان گیرنده ها می تواند در آتروفی از طریق کاهش در اثر تروفیکی ناشی از SIP سهیم باشد و مسئول تغییر فنوتیپ مشاهده شده در طول عصب زدایی باشد. مهم است که به نظر می رسد گیرنده SIP3 اساسا در تحرک  $Ca^{2+}$  درگیر می باشد و این احتمال وجود دارد که سیگنال  $Ca^{2+}$  دهی از طریق این گیرنده می تواند عضله را با تحرک  $Ca^{2+}$  لازم برای فعال سازی کلسی نورین حمایت نماید [۳۶]. لذا شاید بتوان نتیجه گرفت همان طور که کاهش فعالیت ناشی از عصب زدایی باعث کاهش بیان این گیرنده ها در عضله نعلی و آتروفی می گردد و متعاقبا، فعالیت بدنی و فشار مکانیکی نیز می تواند همان طور که در تحقیق ما مشاهده شد باعث افزایش بیان این گیرنده ها شده و این افزایش بیان می تواند باعث افزایش مسیر سیگنال پایین دستی این عامل تروفیکی و متعاقبا هایپرتروفی و/یا مقاومت در مقابل خستگی گردد.

### سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده که از حمایت این واحد دانشگاهی کمال تشکر را دارد.

البته مستلزم تحقیقات بیشتر است. لذا پیشنهاد می‌گردد در تحقیقات بعدی الگوهای مختلف تمرینی در جمعیت‌های مختلف مقایسه گردد.

### منابع

1. Zeidan, Y.H. and Y.A. Hannun, Translational aspects of sphingolipid metabolism. *TRENDS in Molecular Medicine*, 2007. 13(8): p. 327-336.
2. Lahiri, S. and A.H. Futerman, The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2007. 64(17): p. 2270-2284.
3. Sattler, K. and B. Levkau, Sphingosine-1-phosphate as a mediator of high-density lipoprotein effects in cardiovascular protection. *Cardiovascular research*, 2009. 82(2): p. 201-211.
4. Dyatlovitskaya, E.V., The role of lysosphingolipids in the regulation of biological processes. *Biochemistry (Moscow)*, 2007. 72(5): p. 479-484.
5. Takuwa, Y., et al., Sphingosine-1-phosphate signaling and biological activities in the cardiovascular system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2008. 1781(9): p. 483-488.
6. Yatomi, Y., Plasma sphingosine 1-phosphate metabolism and analysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2008. 1780(3): p. 606-611.
7. Watterson, K., et al., Pleiotropic actions of sphingosine-1-phosphate. *Progress in Lipid Research*, 2003. 42(4): p. 344-357.
8. Dyatlovitskaya, E.V. and A.G. Kandyba, Bioeffector Sphingolipids as Stimulators of Cell Growth and Survival. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004. 30(3): p. 201-206.
9. Kim, R.H., et al., Export and functions of sphingosine-1-phosphate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2009. 1791(7): p. 692-696.
10. Sanchez, T. and T. Hla, Structural and functional characteristics of S1P receptors. *Journal of cellular biochemistry*, 2004. 92(5): p. 913-922.
11. Venkataraman, K., et al., Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine 1-phosphate. *Circulation research*, 2008. 102(6): p. 669.
12. Graler, M.H., Targeting sphingosine 1-phosphate (S1P) levels and S1P receptor functions for therapeutic immune interventions. *Cell Physiol Biochem*. 26(1): p. 79-86.
13. Pebay, A., C.S. Bonder, and S.M. Pitson, Stem cell regulation by lysophospholipids. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 2007. 84(3-4): p. 83-97.
14. Serra, M. and J.D. Saba, Sphingosine 1-phosphate lyase, a key regulator of sphingosine 1-phosphate signaling and function. *Advances in enzyme regulation*. 50(1): p. 349.
15. Pyne, N.J. and S. Pyne, Sphingosine 1-phosphate, lysophosphatidic acid and growth factor signaling and termination. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2008. 1781(9): p. 467-476.
16. Stanford, J.C., et al., Sphingosine-1 phosphate (S1P) regulates glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2012.
17. Ma, M.M., et al., Sphingosine kinase 1 participates in insulin signalling and regulates glucose metabolism and homeostasis in KK/Ay diabetic mice. *Diabetologia*, 2007. 50(4): p. 891-900.
18. Shimizu, H., et al., Sphingosine 1-phosphate stimulates insulin secretion in HIT-T 15 cells and mouse islets. *Endocrine journal*, 2000. 47(3): p. 261.
19. Kawanabe, T., et al., Sphingosine 1-phosphate accelerates wound healing in diabetic mice. *Journal of dermatological science*, 2007. 48(1): p. 53-60.
20. Donati, C., et al., Sphingosine 1 Phosphate Mediates Proliferation and Survival of Mesoangioblasts. *Stem cells*, 2007. 25(7): p. 1713-1719.
21. Danieli-Betto, D., et al., Sphingosine 1-phosphate signaling is involved in skeletal muscle regeneration. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 298(3): p. C550.
22. Danieli-Betto, D., et al., Sphingosine 1-phosphate protects mouse extensor digitorum longus skeletal muscle during fatigue. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2005. 288(6): p. C1367.
23. Dobrzyńska, A., M. Knapp, and J. Gorski, Effect of acute exercise and training on metabolism of ceramide in the heart muscle of the rat. *Acta physiologica scandinavica*, 2004. 181(3): p. 313-319.
24. Bachnio Zabielska, A., et al., Effect of exercise duration on the key pathways of ceramide metabolism in rat skeletal muscles. *Journal of cellular biochemistry*, 2008. 105(3): p. 776-784.
25. Min, J.K., et al., Simultaneous Quantitative Analysis of Sphingoid Base 1-Phosphates in Biological Samples by o-Phthalaldehyde



- Precolumn Derivatization after Dephosphorylation with Alkaline Phosphatase\* 1. *Analytical biochemistry*, 2002. 303(2): p. 167-175.
26. Jiang, X. and X. Han, Characterization and direct quantitation of sphingoid base-1-phosphates from lipid extracts: a shotgun lipidomics approach. *Journal of lipid research*, 2006. 47(8): p. 1865-1873.
  27. Ruwisch, L., M. Schäfer-Korting, and B. Kleuser, An improved high-performance liquid chromatographic method for the determination of sphingosine-1-phosphate in complex biological materials. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2001. 363(3): p. 358-363.
  28. Yatomi, Y., et al., Sphingosine 1-phosphate: synthesis and release. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 2001. 64(1-4): p. 107-122.
  29. Hilberg, T., et al., Differentiation of platelet-leukocyte conjugate formation by short term exercise. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 2004. 31(3): p. 217-226.
  30. Coppola, A., et al., Vigorous exercise acutely changes platelet and B-lymphocyte CD39 expression. *Journal of applied Physiology*, 2005. 98(4): p. 1414.
  31. Ahmadizad, S., M.S. El-Sayed, and D.P.M. MacLaren, Responses of platelet activation and function to a single bout of resistance exercise and recovery. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 2006. 35(1): p. 159-168.
  32. Ishii, I., et al., Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annual review of biochemistry*, 2004. 73(1): p. 321-354.
  33. BÅ,achnio-Zabielska, A., et al., Aerobic Training in Rats Increases Skeletal Muscle Sphingomyelinase and Serine Palmitoyltransferase Activity, While Decreasing Ceramidase Activity. *Lipids*: p. 1-10.
  34. Baranowski, M., et al., Exercise increases plasma levels of sphingoid base-1 phosphates in humans. *Acta Physiologica*.
  35. Means, C.K. and J.H. Brown, Sphingosine-1-phosphate receptor signalling in the heart. *Cardiovascular research*, 2009. 82(2): p. 193.
  36. Zanin, M., et al., Trophic action of sphingosine 1-phosphate in denervated rat soleus muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2008. 294(1): p. C36.
  37. Koopman, R., et al., Increase in S6K1 phosphorylation in human skeletal muscle following resistance exercise occurs mainly in type II muscle fibers. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 2006. 290(6): p. E1245-E1252.
  38. Frier, B.C., E.G. Noble, and M. Locke, Diabetes-induced atrophy is associated with a muscle-specific alteration in NF- $\kappa$ B activation and expression. *Cell Stress and Chaperones*, 2008. 13(3): p. 287-296.
  39. Krause, M.P., M.C. Riddell, and T.J. Hawke, Effects of type I diabetes mellitus on skeletal muscle: clinical observations and physiological mechanisms. *Pediatric Diabetes* 12(4pt1): p. 345-364.