The Journal of
Qazvin University of Medical Sciences (JQUMS)
June, July 2019. Vol 23. Num 2

Research Paper

The Effect of Endurance Exercise on mTORC1 Marker Pathway in the Soleus Muscle of Type 2 Diabetic Rats

Saeedeh Shadmehri[1], Mohammad Sherafati Moghadam[2], *Farhad Daryanoosh[3], Neda Aghaei Bahmanbeglou[4]

1. Department of Physical Education and Sport Sciences, Yadegar-e-Imam Khomeini (RAH) Shahr-e-Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Hashtgerd Branch, Islamic Azad University, Alborz, Iran.
3. Department of Exercise Physiology, Faculty of Education and Psychology, University of Shiraz, Shiraz, Iran.
4. Department of Physical Education and Sport Sciences, Aliabad-e-Katul Branch, Islamic Azad University, Aliabad-e-Katul, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Shadmehri S, Sherafati Moghadam M, Daryanoosh F, Aghaei Bahmanbeglou N. The Effect of Endurance Exercise on mTORC1 Marker Pathway in the Soleus Muscles of Type 2 Diabetic Rats. The Journal of Qazvin University of Medical Sciences. 2019; 23(2):92-103. https://doi.org/10.32598/JQUMS.23.2.92

https://doi.org/10.32598/JQUMS.23.2.92

CC BY NC

Received: 22 Oct 2018
Accepted: 27 Jan 2019
Available Online: 01 Jun 2019

Keywords:
Endurance training, mTORC1 pathway, Soleus muscle, Type 2 diabetes

ABSTRACT

Background mTORC1 marker pathway is one of the crucial pathways for the regulation of transcription level and an essential route involved in protein synthesis in skeletal muscles.
Objective This study aimed to investigate the effect of endurance training on mTORC1 marker pathway in soleus muscle of type 2 diabetic rats.
Methods In this experimental study, 16 Sprague-Dawley male rats (Mean±SD weight: 270±20g) were obtained. After induction of diabetes (by streptozotocin administration), the rats were randomly assigned into two groups: endurance training and control. The exercise training was administered to the experimental group performed 4 days a week for 8 weeks, while the control group did not receive any training program. The study proteins were measured using western blot method. The Independent t-test analyzed the obtained data.
Findings A significant change was not observed in the total content of Akt1 proteins, P70S6K1, 4E-BP1, and P70S6K1 phosphorylation content in the experimental group compared to the control group, but the total protein content of mTOR, the phosphorylation form of Akt1 proteins, and 4E-BP1 was significantly higher in the experimental group compared to the control group.
Conclusion Eight weeks of endurance training can activate the Akt1/mTOR/4E-BP1 pathway in the mTORC1. Therefore, with regard to muscle atrophy in type 2 diabetic patients, endurance training can activate the mTORC1 marker pathway to regulate the transcription genes and subsequently, the expression of proteins.

Extended Abstract

1. Introduction

The loss of muscle mass (atrophy) is a common consequence of diabetes. In this situation, protein degradation increases, and its production decreases [2]. Recent studies have shown that mTOR Complex 1 (mTORC1) signaling plays an essential role in regulating protein synthesis and degradation [3]. Akt protein regulates and activates the mTOR protein and pathway [4]. Therefore, mTOR protein can regulate protein synthesis through changes in the downstream phosphorylation of proteins such as P70S6K and 4EBP1 [6].

Corresponding Author:
Farhad Daryanoosh
Address: Department of Exercise Physiology, Faculty of Education and Psychology, University of Shiraz, Shiraz, Iran.
Tel: +98 (711) 6133318
E-Mail: daryanoosh@shirazu.ac.ir

Endurance exercises can improve muscle performance and functional capacity. The production of musculoskeletal strength is associated with the ability to perform daily living tasks [8]. Endurance exercises with specific intensity can be useful in increasing musculoskeletal mass and functional capacity [9]. So far, the effect of endurance exercises on all signaling pathways of protein synthesis or muscle hypertrophy, and especially the mTORC1 pathway, has not been well studied. In this regard, this study attempted to examine the effect of endurance exercises on mTORC1 signaling pathway in the soleus muscle of rats with type 2 diabetes.

2. Materials and Methods

This is an experimental study using test and control groups. The samples were 16 two-week-old Sprague-Dawley male rats with a Mean±SD weight of 270±20g. For induction of diabetes in rats, Streptozotocin (STZ) solution was administered intraperitoneally (60mg/kg) 15 min after injection of nicotinamide (110mg/kg) [13]. To ensure that the animals were diabetic, their blood glucose was taken 72 hours after injection. A blood glucose level of 126-260 mg/dL was considered as an indicator of type 2 diabetes mellitus [14]. One week after the induction of diabetes, the rats were randomly assigned to two groups of endurance (n=8) and control (n=8). The endurance group performed exercises for 8 weeks, 4 sessions per week. The exercise program was to run on a treadmill for 42 min per session which included 6-min warming up (10-12m/min), 30-min continuous exercise (15-20m/min), and 6-min cooling down (10-12m/min). The treadmill incline was 0 degree with no change during 8 weeks [15]. During this period, the control group performed no training. The rats in both groups received no insulin treatment.

To eliminate the acute effects of exercise and the uncontrollable stress variables of samples during exercise, they were anesthetized based on ethical principles with an intraperitoneal injection of a ketamine-xylazine combination 24 hours after the last exercise session. Then, the soleus muscle tissue was removed from the animal's body, rinsed in saline, and then immediately frozen with liquid nitrogen and kept in a freezer at -80°C. The study variables were measured using western blot analysis. Developed immune complexes were visualized by using a chemical radiation method and X-ray films. ImageJ software V. 1.18.0112 was used to measure the density of the bands, and the results were presented after normalization against reference protein (β-actin) [16]. For analyzing data, first, the Kolmogorov-Smirnov test was used to determine the normality of data distribution. Since the distribution was reported normal, the Independent t-test was used for comparing groups. The analysis was conducted in SPSS V. 19. The significance level was set as (0.05).

3. Results

There was no significant difference in the total protein level of Akt1 (P=0.45), P70S6K1 (P=0.35), and 4E-BP1 (P=0.94) between endurance and control groups, but the difference in protein content of mTOR (P=0.008) was significant. Moreover, 8-week endurance exercise caused a significant difference between two study groups in phosphorylation level of pAkt1 [ser473] (P=0.014), p-mTOR [ser2448] (P<0.001), and p-4E-BP1 [Thr37/46] (P<0.001); however, this difference was not significant in protein level of p-P70S6K1 [Thr389] (P=0.06). By comparing the total and phosphorylation levels of proteins, significant differences were seen between total and phosphorylation levels of Akt1 (P=0.03), and 4E-BP1 (P<0.001), but no significant difference between P70S6K1 (P=0.10) and mTOR (P=0.06).

4. Conclusion

The results of this study showed that after 8 weeks of endurance exercise, Akt1/ mTOR /4E-BP1 signaling pathway activates the mTORC1 pathway in subjects with type 2 diabetes. Therefore, endurance exercise resulted in protein synthesis through the mTORC1 pathway. This may be due to the conditions of the exercise program in terms of intensity or duration. Therefore, for protein synthesis or muscle atrophy in type 2 diabetics, an exercise program with adequate intensity, duration, and type (e.g. a combination of endurance and resistance exercises) should be considered.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study has an Ethical Code number (IR.SUMS.REC.1396.S1062) from Shiraz University of Medical Sciences.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Authors' contributions

Writing: All authors; Sources & validations: Saeedeh Shadmehri and Neda Aghaee Bahmanbeglou; Analytics of data and Methodology: Mohammad Sharafat Moghadam; Editing and management project: Farhad Daryanoush.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The study conducted at the University of Shiraz and Shiraz University of Medical Sciences. The authors would like to thank all those cooperated in this study.

تأثیر فعالیت ورزشی استقامتی بر مسیر نشانه‌پردازی mTORC1 در عضله اسکلتی نعلی موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع ۲

سعیده شادمهری[۱]، محمد شرافتی‌مقدم[۲]، *فرهاد دریانوش[۳]، ندا آقایی بهمن‌بگلو[۴]

۱- گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهر ری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲- واحد هشتگرد، دانشگاه آزاد اسلامی، البرز، ایران.
۳- گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روانشناسی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.
۴- گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد علی‌آباد کتول، دانشگاه آزاد اسلامی، علی‌آباد کتول، ایران.

تاریخ دریافت: ۰۳ مهر ۱۳۹۷
تاریخ پذیرش: ۰۷ بهمن ۱۳۹۷
تاریخ انتشار: ۱۱ خرداد ۱۳۹۸

کلیدواژه‌ها:
تمرین استقامتی، عضله اسکلتی نعلی، مسیر mTORC1، دیابت نوع ۲

چکیده

زمینه مسیر نشانه‌پردازی mTORC1 از مسیرهای مهم تنظیم میزان رونویسی و یکی از مهم‌ترین مسیرهای درگیر در سنتز پروتئین در عضله اسکلتی است.

هدف هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر تمرین‌های استقامتی بر مسیر نشانه‌پردازی mTORC1 در عضله نعلی موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع ۲ است.

مواد و روش‌ها در این مطالعه تجربی، ۱۶ موش صحرایی نر نژاد اسپراگ‌داولی (با میانگین و انحراف معیار وزن ۲۰±۲۷۰ گرم) انتخاب و پس از دیابتی‌شدن از طریق محلول استرپتوزوتوسین به روش تصادفی به ۲ گروه مداخله استقامتی (به عنوان گروه تجربی) و شاهد تقسیم شدند. گروه تجربی ۴ روز در هفته و به مدت ۸ هفته به فعالیت ورزشی پرداختند؛ در حالی که گروه شاهد هیچ‌گونه برنامه تمرینی نداشتند. پروتئین‌های تحقیق حاضر از طریق روش وسترن بلات اندازه‌گیری و برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون تی مستقل استفاده شد.

یافته‌ها تغییر معنی‌داری در محتوای تام پروتئین‌های AKT1، P70S6K1، 4EBP1 و محتوای فرم فسفریله پروتئین P70S6K1 در گروه تمرین استقامتی نسبت به گروه شاهد مشاهده نشد؛ اما محتوای تام پروتئین mTOR و فرم فسفریله پروتئین‌های AKT1، mTOR و 4EBP1 در گروه تمرین استقامتی نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد.

نتیجه‌گیری ۸ هفته تمرین ورزشی استقامتی توانست مسیر AKT1/mTOR/4E-BP1 را در mTORC1 فعال کند؛ بنابراین با توجه به تحلیل عضلانی در بیماران دیابتی نوع ۲، فعالیت ورزشی استقامتی می‌تواند مسیر نشانه‌پردازی mTORC1 را برای تنظیم رونویسی ژن‌ها و متعاقباً بیان پروتئین‌ها فعال کند.

مقدمه

عضله اسکلتی بزرگ‌ترین عضو در بدن انسان است و بیش از ۳۰ تا ۴۰ درصد از کل وزن بدن در افراد سالم را تشکیل می‌دهد. کاهش توده عضله اسکلتی که بر اثر اضافه بار، سوءتغذیه، پیری یا انواع بیماری‌های متعدد رخ می‌دهد، به کاهش اجرای عملکردی انسان، مشکلات سلامت و کیفیت پایین زندگی منجر می‌شود [۱].

ازبین‌رفتن توده عضلانی (آتروفی)[1] یکی از عواقب معمول دیابت است. در این شرایط، تجزیه پروتئین افزایش و ساخت آن کاهش می‌یابد. از آنجا که از نظر سازگاری‌های رونویسی، عوامل مختلفی بر آتروفی تأثیرگذار است، به نظر می‌رسد محرک‌های شروع‌کننده و پروتئین‌های درگیر در مسیرهای سنتز و مسیرهای آتروفی، در ازدست‌دادن توده عضلانی، از سازوکارهای مسیرهای سیگنالینگ اصلی باشد. میزان کم انسولین و احتمالاً IGF-1[2] همراه با افزایش میزان گلوکوکورتیکوئیدها، از دست دادن پروتئین عضلانی در دیابت را تحریک می‌کنند [۲].

متابولیسم پروتئین نقش مهمی در تنظیم توده عضلانی اسکلتی

1. Atrophy

2. Insulin-like growth factor 1

* نویسنده مسئول:
فرهاد دریانوش
نشانی: شیراز، دانشگاه شیراز، دانشکده علوم تربیتی و روانشناسی، گروه علوم ورزشی.
تلفن: ۶۱۳۳۳۱۸ (۷۱۱) ۹۸+
رایانامه: daryanoosh@shirazu.ac.ir

دارد و مطالعات اخیر نشان داده است که سیگنالینگ mTORC1 نقش مهمی در تنظیم سنتز پروتئین و تخریب پروتئین دارد [۳]. فاکتورهای رشدی از طریق مسیر PI3K-AKT و شاید سیگنال‌های دیگر به تنظیم mTORC1 منجر می‌شوند. پروتئین AKT با غیرفعال کردن کمپلکس تیوبروز اسکلروز ۱/۲ (TSC1/2)[۳] و فعال کردن پروتئین Rheb مسیر mTORC1 را تنظیم و فعال می‌کند. [۴] پروتئین‌ها حدود ۵۰ درصد از زیست توده سلول‌ها را تشکیل می‌دهند.

mTORC1 نقش مهمی در القای سنتز پروتئین در پاسخ به سیگنال‌های رشد سلولی دارد. به همین دلیل این فرض به‌طور گسترده‌ای تأیید شده است که mTORC1 مسئول رویدادهای سیگنالینگ وابسته به راپامایسین[۴] و وابسته به mTOR است که متابولیسم پروتئین را تنظیم می‌کند؛ اما مطالعات اخیر نشان داده‌اند که این فرض ممکن است کاملاً درست نباشد [۵]. مسیر سیگنالینگ mTORC1 می‌تواند سنتز پروتئین را از طریق تغییرات فسفریلاسیون پروتئین‌های بالادست مانند انسولین/ IGF-1و AKT و پروتئین‌های پایین‌دست مانند P70S6K و 4EBP1 تنظیم کند [۶].

عضله اسکلتی بافت بسیار انعطاف‌پذیری متناسب با محرک‌های مختلف از جمله انواع مختلف انقباض عضلانی است. انقباض عضلانی باعث سازگاری متابولیک و زیست‌شناسی[۵] متنوع می‌شود. این امر به دلیل تأثیر تجمعی تکرار تمرین‌ها و پاسخ‌های مولکولی و سلولی خاص به سازگاری‌های خاص، منجر می‌شود. ویژگی‌های شناخته‌شده انقباض عضلانی عبارت‌اند از: هیپرتروفی عضلانی[۶] و افزایش قدرت. این ویژگی‌ها به وسیله انقباض عضلانی در پی تمرین‌های مقاومتی و استقامتی ایجاد می‌شوند [۷].

تمرین‌های ورزشی استقامتی می‌تواند عملکرد عضلات و ظرفیت تمرین‌ها را بهبود بخشد. تولید قدرت عضلانی‌اسکلتی با توانایی انجام وظایف زندگی روزمره همراه است؛ افزایش ظرفیت فعالیت ورزشی می‌تواند از بیماری و مرگ‌ومیر زودهنگام جلوگیری کند. این روابط نشان می‌دهد که انجام فعالیت ورزشی منظم استقامتی می‌تواند کیفیت زندگی را بهبود بخشد که با افزایش ظرفیت عملکرد و کاهش خطر ابتلا به بیماری در بزرگ‌سالان همراه است [۸]. به طور خلاصه، این مشاهدات، برای پزشکان و دانشمندان انگیزه لازم را فراهم می‌آورد تا فعالیت ورزشی استقامتی با شدت‌های مشخص را نسخه‌ای مؤثر برای افزایش توده عضلانی‌اسکلتی و ظرفیت عملکردی، در نظر بگیرند. تمرین‌های ورزشی استقامتی برای بهبود سلامت قلب و عروق مناسب است؛ با این حال، اثرات آن بر گردش پروتئین‌ها برای سنتز پروتئین و هیپرتروفی توده عضلانی‌اسکلتی چندان روشن نیست [۹].

در تحقیقی لندبرگ[۷] و همکاران تأثیر فعالیت ورزشی استقامتی و مقاومتی را بر محتوای پروتئین mTOR (جایگاه فسفریلاسیون سرین ۲۴۴۸) و P70S6K (جایگاه فسفریلاسیون ترئونین ۳۸۹) بررسی کرده‌اند. نتایج تفاوت معنی‌داری را در محتوای فسفریلاسیون پروتئین‌های mTOR و P70S6K به دنبال هر دو فعالیت ورزشی نشان نداد. این محققان بیان کردند فعالیت ورزشی استقامتی، پاسخ‌های مولکولی عضلانی‌اسکلتی را به نسبت تمرینات مقاومتی تغییر می‌دهد [۱۰].

در مقابل در تحقیقی مسچر[۸] و همکاران تأثیر تمرین استقامتی بر محتوای تام و فسفریلاسیون پروتئین‌های mTOR، AKT و P70S6K1 را بررسی کردند. نتایج افزایش معنی‌داری را در محتوای فسفریلاسیون پروتئین‌های mTOR (جایگاه فسفریلاسیون سرین[۹] ۲۴۴۸) و P70S6K (جایگاه فسفریلاسیون ترئونین[۱۰] ۳۸۹) در ۹۰ تا ۱۸۰ دقیقه بعد از فعالیت ورزشی نشان داد؛ اما این تفاوت در محتوای پروتئین AKT (فسفریلاسیون سرین ۴۷۳) معنی‌دار نبود. این یافته‌ها نشان داد در ساعات اول برگشت به حالت اولیه پس از تمرین، سنتز پروتئین به‌تدریج افزایش می‌یابد. علاوه بر این، تحریک مسیر سیگنالینگ mTORC1 ممکن است حداقل بخشی از مسئولیت این سنتز بالای پروتئین باشد [۱۱].

تحقیق شوالم[۱۱] و همکاران تأثیر فعالیت ورزشی استقامتی با شدت کم و زیاد را بر پروتئین‌های AKT (جایگاه فسفریلاسیون سرین ۴۷۳ و ترئونین ۳۰۸) و 4EBP1 در عضله اسکلتی پهن بیرونی مردان بررسی کرد و نتایج تفاوت معنی‌داری را در محتوای پروتئین AKT (هر دو جایگاه) در شدت‌های کم و زیاد نشان داد؛ اما محتوای پروتئین 4EBP1 فقط در شدت زیاد تفاوت معنی‌داری داشت و در شدت کم تفاوت معنی‌داری را نشان نداد [۱۲].

مطالعات اخیر نشان می‌دهند سنتز پروتئین عضله اسکلتی در پاسخ به انواع فعالیت بدنی (مقاومتی و استقامتی) نتایج متفاوتی را در پی دارد. همچنین بعضی از پژوهش‌ها فعالیت ورزشی استقامتی را به‌عنوان نوعی کاهش‌دهنده توده عضلانی در نظر گرفته‌اند؛ اما تاکنون تأثیر فعالیت ورزشی استقامتی بر تمامی مسیرهای سیگنالینگ سنتز پروتئین یا هیپرتروفی عضلانی و به‌خصوص مسیر mTORC1 به‌خوبی بررسی نشده است. بنابراین در این پژوهش، نقش فعالیت ورزشی بر مسیر نشانه‌پردازی mTORC1 در عضله نعلی، که عضله‌ای کُند انقباض است و نقش دیابت نوع ۲ در این مسیر بررسی می‌شود.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربی است که در دو گروه مداخله و شاهد انجام گرفت. در این پژوهش، ۱۶ موش صحرایی نر دوماهه

3. Tuberous sclerosis proteins 1 and 2
4. Rapamycin
5. Morphology
6. Hypertrophy muscle

7. Lundberg
8. Mascher
9. Serine
10. Threonine
11. Schwalm

نژاد اسپراگ‌داولی با میانگین و انحراف معیار وزنی ۲۰±۲۷۰ گرم انتخاب شدند. موش‌های صحرایی در حیوان‌خانه دانشگاه علوم پزشکی شیراز با دمای ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۴۰ تا ۵۰ درصد و چرخه تاریکی‌روشنایی ۱۲-۱۲ نگه داشته شدند. غذای حیوانات به طور آزادانه و استاندارد مخصوص حیوانات آزمایشگاهی از دانشگاه علوم پزشکی شیراز تهیه شد. همچنین آب مورد نیاز حیوانات به طور آزاد در بطری ۵۰۰ میلی‌لیتری ویژه حیوانات آزمایشگاهی، در اختیار آن‌ها قرار داده شد. به اصول اخلاقی مطالعه مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه علوم پزشکی شیراز توجه شد.

برای ایجاد دیابت نوع ۲ در موش‌ها، محلول استرپتوزوتوسین[12] (حل‌شده در بافر سیترات ۰/۱ مولار با pH=۴/۵) به صورت داخل صفاقی و فقط یک مرتبه با دز ۶۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن، بعد از ۱۵ دقیقه تزریق نیکوتین‌آمید با دز ۱۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن تزریق شد [۱۳]. برای اطمینان از دیابتی‌شدن حیوان‌ها، قند خون آن‌ها از سیاهرگ دمی‌شان، ۷۲ ساعت پس از تزریق، با کمک گلوکومتر و نمونه خونی اندازه‌گیری شد؛ قند خون از ۱۲۶ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر تا ۲۶۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر به عنوان شاخص دیابتی‌شدن نوع ۲ در نظر گرفته شد [۱۴]. یک هفته پس از القای دیابت، موش‌های صحرایی به روش تصادفی به ۲ گروه مداخله (۸ تا) و شاهد (۸ تا) تقسیم شدند. سپس موش‌های گروه‌های تمرین برای آشنایی با نوارگردان[13]، به مدت یک هفته با سرعت ۵ تا ۱۰ متر بر دقیقه، روی نوارگردان دویدند.

برنامه گروه تمرینی به مدت ۸ هفته و هر هفته ۴ جلسه بود. کل مدت زمان دویدن موش‌ها در هر جلسه روی نوارگردان ۴۲ دقیقه، شامل ۶ دقیقه گرم‌کردن (سرعت ۱۰ تا ۱۲ متر بر دقیقه)، ۳۰ دقیقه تمرین تداومی (سرعت ۱۵ تا ۲۰ متر بر دقیقه) و ۶ دقیقه سردکردن (سرعت ۱۰ تا ۱۲ متر بر دقیقه) بود. شیب نوارگردان صفر درجه بود و در ۸ هفته تغییری نداشت [۱۵]. در این مدت، گروه شاهد هیچ‌گونه برنامه تمرینی نداشتند. همچنین موش‌های صحرایی هر دو گروه (مداخله و شاهد) هیچ‌گونه درمانی با انسولین را در طول دوره پژوهش نداشتند.

برای از بین بردن آثار حاد تمرین و متغیرهای غیرقابل‌کنترل استرس آزمودنی‌ها در زمان اجرای برنامه تمرینی، ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، موش‌ها با رعایت اصول اخلاقی و با تزریق درون‌صفاقی ترکیبی از کتامین (۳۰ تا ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۳ تا ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، بی‌هوش شدند. سپس بافت عضله اسکلتی نعلی (کند انقباض) از بدن حیوان برداشته شد و در سرم فیزیولوژیک شست‌وشو داده و سپس بلافاصله با استفاده از مایع ازت منجمد و برای سنجش‌های بعدی در یخچال با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

با استفاده از روش آزمایشگاهی وسترن بلات متغیرهای پژوهش اندازه‌گیری شدند. در این روش ابتدا مخلوط بافت عضله اسکلتی نعلی در لیزکننده RIPA[14] حاوی آنتی‌پروتئاز کوکتیل[15] (سیگما آلدریچ، کشور آمریکا) تهیه شد و پس از سانتریفیوژ در ۱۲هزار دور در دقیقه و مخلوط‌کردن با محلول نمونه، با الکتروفورز (مدل عمودی، شرکت BioRad، ساخت آمریکا) در ژل آکریلامید حاوی سدیم دودسیل سولفات[16] تفکیک شدند.

بعد از تفکیک، باندهای پروتئینی بر غشاء انتقال داده‌شده (غشاء دیفورید پلی‌وینیلیدین) و بعد از پوشاندن غشا با محلول سرم آلبومین گاوی ۳ درصد به مدت یک ساعت در دمای آزمایشگاه در معرض آنتی‌بادی اولیه خرگوشی رقیق‌شده (۱/۵۰۰) در محلول پوشاننده به مدت یک شب در دمای ۴ درجه قرار داده شدند. پس از سه بار شست‌وشو با محلول فسفات نمکی توین‌دار با آنتی‌بادی ثانویه ضدخرگوشی متصل به IgG-HRP: sc-2004 در دمای اتاق به مدت یک ساعت مجاور شدند.

شماره سریال آنتی‌بادی‌ها در تحقیق حاضر از این قرار است:

Total form anti-AKT1 (Sc-135829), anti-mTOR (Sc-1550-R), anti-P70S6K1 (Sc-230) and anti-4E-BP1 (Sc-9977); Phosphorylated form anti-AKT1 (sc-52940), anti-mTOR (Sc-293133), anti-P70S6K1 (Sc-11759) and anti-4E-BP1 (#-2855).

ایمیون کمپلکس‌های[17] ایجادشده با روش پرتوزایی شیمیایی و با استفاده از فیلم رادیوگرافی به ظهور رسیدند. دانسیته باندها را نرم‌افزار Image J (نسخه ۱/۸/۰/۱۱۲) اندازه‌گیری کرد و نتایج بعد از طبیعی‌شدن در مقابل کنترل داخلی (بتا اکتین) به صورت چند برابر گروه از شاهد ارائه شدند [۱۶].

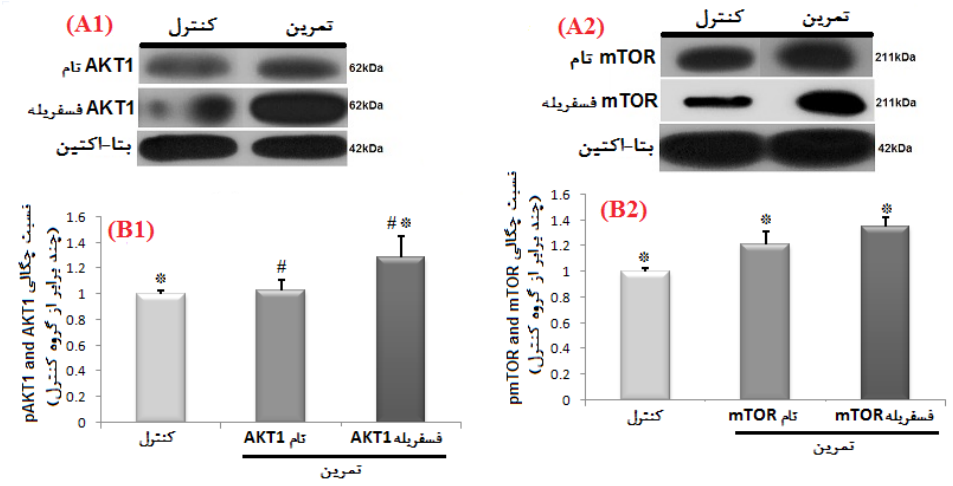
ابتدا از آزمون کولموگروف‌اسمیرنوف برای تعیین نرمالیتی توزیع داده‌های پژوهش استفاده شد. با توجه به عادی‌بودن توزیع نمرات در متغیرها، از آزمون پارامتریک تی مستقل برای مقایسه بین‌گروهی استفاده شد و داده‌ها با استفاده از نسخه ۱۹ نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری P≤۰/۰۵ در نظر گرفته شده است.

یافته‌ها

نتایج تحقیق حاضر نشان داد به دنبال ۸ هفته تمرین استقامتی، تفاوت معنی‌داری میان محتوای تام پروتئین AKT1 (P<۰/۴۵) (شکل شماره ۱. A1، B1)، پروتئین P70S6K1 (P<۰/۳۵)

12. Streptozotocin (STZ)
13. Treadmill

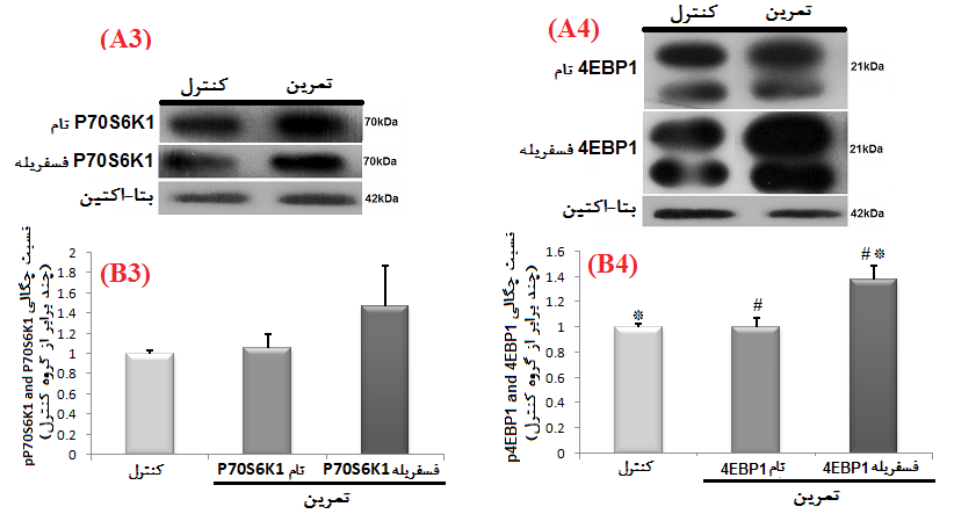
14. Radioimmunoprecipitation assay
15. Protease inhibitor cocktail
16. Sodium dodecyl sulfate (SDS)
17. Immune complex



مجله‌علمی
دانشگاه‌علوم‌پزشکی قزوین

شکل ۱. مقایسه محتوای فرم‌های تام و فسفریله پروتئین‌های AKT1 و mTOR در گروه‌های مورد مطالعه (تعداد ۸ موش صحرایی)
A1. تصاویر وسترن‌بلات پروتئین AKT1 ؛ A2. پروتئین **mTOR** و بتا-اکتین به‌عنوان کنترل داخلی در بافت عضله اسکلتی نعلی؛ B1. میانگین و انحراف معیار، نشان‌دهنده مقادیر کمّی‌شده باندهای پروتئین AKT1 و B2. پروتئین **mTOR** در مقابل کنترل داخلی (بتا-اکتین) که به صورت چندبرابر از گروه شاهد ارائه شده است.
* وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه مداخله نسبت به شاهد، در سطح ۰/۰۵
# وجود تفاوت معنی‌دار بین فرم‌های تام و فسفریله در سطح ۰/۰۵

(شکل شماره ۲. A۳، B۳) و پروتئین 4E-BP1 (P<۰/۹۴) (شکل شماره۲. A۴، B۴) در بین گروه تمرین و شاهد وجود ندارد؛ اما این تفاوت در محتوای پروتئین mTOR بین گروه مداخله و شاهد معنی‌دار بود (P<۰/۰۰۸) (شکل شماره ۱. A۱، B۱). همچنین ۸ هفته تمرین استقامتی، تفاوت معنی‌داری میان محتوای فسفریلاسیون پروتئین $pAKT1^{ser473}$ (P<۰/۰۱۴) (شکل شماره ۱. A۲، B۲)، پروتئین $p\text{-}mTOR^{ser2448}$ (P<۰/۰۰۰۱) (شکل شماره ۱. B۲، A۲) و پروتئین $p\text{-}4E\text{-}BP1/46^{THR37/46}$ (P<۰/۰۰۱) (شکل شماره ۲. A۴، B۴) در بین گروه مداخله و شاهد ایجاد کرد؛ اما این تفاوت در محتوای پروتئین p-P70S6K-



مجله‌علمی
دانشگاه‌علوم‌پزشکی قزوین

شکل ۲. مقایسه محتوای فرم‌های تام و فسفریله پروتئین‌های P70S6K1 و 4EBP1 در گروه‌های مطالعه‌شده (تعداد ۸ موش صحرایی)
A3. تصاویر وسترن‌بلات پروتئین P70S6K1؛ A4. پروتئین 4EBP1 و بتا-اکتین به عنوان کنترل داخلی در بافت عضله اسکلتی نعلی؛ B3. میانگین و انحراف معیار، نشان‌دهنده مقادیر کمّی‌شده باندهای پروتئین P70S6K1 و B4. پروتئین 4EBP1 در مقابل کنترل داخلی (بتا-اکتین) که به صورت چندبرابر گروه شاهد ارائه شده است.
* وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه مداخله نسبت به شاهد در سطح ۰/۰۵
# وجود تفاوت معنی‌دار بین فرم‌های تام و فسفریله در سطح ۰/۰۵

1^{Thr389} در بین دو گروه معنی‌دار نبود (P<۰/۰۶) (شکل شماره ۲. A۳، B۳).

همچنین محتوای فرم تام و فسفریله پروتئین‌ها با یکدیگر مقایسه شدند. به دنبال ۸ هفته تمرین استقامتی، تفاوت معنی‌داری میان محتوای فرم‌های تام و فسفریله پروتئین‌های AKT1 (P<۰/۰۳) (شکل شماره ۱. A۱، B۱) و 4E-BP1 (P<۰/۰۰۱) (شکل شماره ۲. A۴، B۴) مشاهده شد؛ اما میان فرم‌های تام و فسفریله پروتئین‌های mTOR (P<۰/۰۶) (شکل شماره ۱. A۲، B۲) و P70S6K1 (P<۰/۱) (شکل شماره ۲. A۳، B۳) تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج تفاوت معنی‌داری را به دنبال ۸ هفته فعالیت ورزشی استقامتی بین گروه‌های مداخله و شاهد در محتوای پروتئین‌های تام P70S6K1، AKT1 و 4E-BP1 در عضله اسکلتی نعلی نشان نداد؛ اما این افزایش در محتوای تام پروتئین mTOR معنی‌دار بود. از طرفی محتوای فسفریلاسیون پروتئین‌های mTOR، AKT1 و 4E-BP1 افزایش معنی‌داری یافت؛ اما این افزایش در محتوای پروتئین P70S6K1 معنی‌دار نبود.

تمرین استقامتی به طور منظم سنتز پروتئین در عضله اسکلتی و به‌ویژه سنتز پروتئین‌های میتوکندری را افزایش می‌دهد و باعث افزایش اکسیداسیون چربی و افزایش استقامت عضلانی می‌شود؛ در این راستا، شبکه‌های سیگنالینگ سلولی پیچیده به طور مستقیم و غیرمستقیم بسیار مهم هستند و به عوامل متعدد مانند فعالیت‌های ورزشی (مقاومتی، استقامتی و غیره) پاسخ می‌دهند و منجر به تغییرات بیولوژیکی می‌شوند [۱۷]. فعالیت‌های متداول ورزشی (استقامتی) محرکی قوی است که قادر به ایجاد تغییرات در انتقال سیگنال و متابولیسم سلولی است و با شدت، نوع و مدت زمان فعالیت ورزشی تغییر می‌کند؛ بنابراین، انتخاب فعالیت‌های ورزشی با شرایط (شدت، نوع و مدت زمان) متفاوت برای سازگاری بیوشیمیایی و زیست‌شناختی خاص در عضله اسکلتی مهم است [۱۸].

تحقیق اوگاساوارا[18] و همکاران تأثیر فعالیت‌های ورزشی استقامتی و مقاومتی را روی پروتئین‌های AKT (جایگاه‌های فسفریلاسیون ترئونین ۳۰۸ و سرین ۴۷۳)، mTOR (جایگاه فسفریلاسیون سرین ۲۴۴۸) و P70S6K (جایگاه فسفریلاسیون ترئونین ۳۸۹) بررسی کرده است. فعالیت ورزشی استقامتی شامل ۶۰ دقیقه دویدن بر نوارگردان و فعالیت ورزشی مقاومتی، ایجاد انقباض ایزومتریک از طریق جریان الکتریسیته بود. محتوای این پروتئین‌ها در سه زمان (۳ و ۶ و ۱۲ ساعت) بعد از فعالیت ورزشی اندازه‌گیری شدند. نتایج افزایش معنی‌داری را در محتوای پروتئین‌های AKT و mTOR و P70S6K در زمان ۳ ساعت بعد از فعالیت ورزشی استقامتی نشان داد و در دو زمان دیگر (۶ و ۱۲ ساعت) تمایل به کاهش داشت. همچنین افزایش معنی‌داری در محتوای پروتئین‌های AKT و mTOR و P70S6K در هر سه زمان (۳، ۶ و ۱۲ ساعت) اندازه‌گیری بعد از فعالیت مقاومتی نشان داده شد [۱۹].

نتایج تحقیق اوگاساوارا و همکاران با نتایج تحقیق حاضر، در محتوای پروتئین‌های AKT و mTOR پس از فعالیت ورزشی استقامتی، در یک راستاست؛ زیرا سطوح این پروتئین‌ها در هر دو تحقیق در طی انجام فعالیت ورزشی استقامتی افزایش معنی‌داری یافته بود و نشان‌دهنده این مطلب است که فعالیت ورزشی استقامتی می‌تواند با کاهش مقاومت به انسولین، به فعال‌شدن پروتئین AKTمنجر شود. همچنین محتوای تام و فسفریلاسیون پروتئین mTOR در جایگاه فسفریلاسیون ۲۴۴۸ افزایش معنی‌داری یافته است که می‌توان گفت فعالیت ورزشی استقامتی در افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ می‌تواند فعال‌کننده مسیر mTORC1 برای سنتز پروتئین و هیپرتروفی عضلانی باشد.

در تحقیق حاضر سطوح پروتئین P70S6K1 تفاوت معنی‌داری را نشان داد. پروتئین P70S6K کیناز، بخشی از مسیر سیگنالینگ mTORC1 است که سیگنالینگ فعال‌شدن آن در مسیر mTORC1 از طریق تحریک سلول‌های عضلانی با انسولین یا IGF-1است که به فعال‌سازی فسفواینوزیتید ۳ کیناز[19] منجر می‌شود، به طوری که تولید پیام‌رسان فسفاتیدیل‌اینوزیتول (۳، ۴، ۵) تری‌فسفات[20] می‌کند. سپس تری‌فسفات در غشاء به استفاده از پروتئین کیناز PDK1 و AKT منجر می‌شود، سپس این امر به فسفریلاسیون و فعال‌شدن AKT منجر می‌شود [۲۰]. این پروتئین از طریق سرکوب‌کردن فعالیت کمپلکس ۲ تیوبروز اسکلروز[21] فعالیت mTORC1 را افزایش می‌دهد [۲۱]. مهم‌ترین تأثیر مسیرهای پیام‌رسانی AKT/mTOR اثر بر پروتئین‌های درگیر در کنترل ترجمه‌ای پروتئین‌های P70S6K است [۲۲].

در تحقیق حاضر فعالیت ورزشی استقامتی به افزایش معنی‌دار محتوای تام و فسفریلاسیون پروتئین P70S6K1منجر نشد که از عوامل تأثیرگذار در آن، می‌توان به نوع فعالیت ورزشی اشاره کرد. برخلاف تمرین‌های استقامتی، فعالیت ورزشی مقاومتی به هیپرتروفی از طریق مسیر AKT/mTOR/P70S6K1 منجر می‌شود. البته مدت زمان فعالیت ورزشی نیز عامل بسیار مهم دیگری است؛ سازگاری طولانی‌مدت با تمرین‌های ورزشی به تغییر سطوح پروتئین‌های عضلانی خاص منجر می‌شود. این سازگاری در طی هر نوع فعالیت ورزشی به فعال یا مهارشدن رخدادهای مولکولی منجر می‌شود که بسته به ماهیت فعالیت

18. Ogasawara

19. Phosphoinositide 3-kinases (PI3K)
20. Phosphatidylinositol (3, 4, 5)-trisphosphate (PIP3)
21. Tuberous sclerosis complex 2 (TSC2)

ورزشی می‌تواند باعث سنتز یا تجزیه پروتئین شود [۱۰]. در تحقیق حاضر تمرین‌های استقامتی به تغییرات معنی‌دار محتوای پروتئین P70S6K1 منجر نشد.

نتایج تحقیق کازایور[۲۲] و همکاران در بررسی تأثیر تمرین‌های استقامتی و مقاومتی بر سطوح پروتئین‌های AKT و mTOR و P70S6K1 نشان داد که محتوای پروتئین AKT پس از تمرین‌های استقامتی افزایش معنی‌داری یافته است؛ اما تمرین‌های مقاومتی نتوانسته بود تأثیر معنی‌داری بر محتوای پروتئین AKT داشته باشد. همچنین پس از تمرین‌های استقامتی و مقاومتی، محتوای پروتئین mTOR افزایش معنی‌داری یافته و در مقابل محتوای پروتئین P70S6K1 کاهش معنی‌داری یافته بود [۲۳].

نتایج این تحقیق با نتایج تحقیق حاضر درباره پروتئین AKT و mTOR در یک راستاست، زیرا در هر دو تحقیق محتوای پروتئین AKT افزایش معنی‌داری یافته است؛ اما تمرین‌های استقامتی نمی‌تواند سطوح پروتئین P70S6K1 را افزایش معنی‌دار دهد، بلکه همان‌طور که در تحقیق کازایور و همکاران مشاهده می‌شود، تمرین‌های استقامتی به کاهش این پروتئین منجر می‌شوند. با توجه به نتایج مطالعات گزارش‌شده به‌خوبی مشخص است مسیر فعال‌شدن AKT مسیر اصلی برای فعال‌کردن کمپلکس mTOR و سنتز پروتئین است؛ اما درباره پروتئین‌های پایین‌دست این مسیر که از دو طریق (پروتئین‌های P70S6K1 و 4E-BP1) به سنتز منجر می‌شود، دیدگاه‌های متفاوتی وجود دارد.

در این راستا در تحقیق کامِرا[۲۳] و همکاران، سطوح پروتئین‌های P70S6K1، mTOR، AKT و 4E-BP1 پس از دو نوع فعالیت ورزشی استقامتی و مقاومتی اندازه‌گیری شد. نتایج با هر دو فعالیت ورزشی استقامتی و مقاومتی افزایش معنی‌داری را در سطوح پروتئین AKT (در جایگاه‌های فسفریلاسیون ترئونین ۳۰۸ و سرین ۴۷۳)، پروتئین mTOR (جایگاه فسفریلاسیون ۲۴۴۸) و پروتئین P70S6K1 (ترئونین فسفریلاسیون ۳۸۹) نشان داد؛ اما سطوح پروتئین 4E-BP1 (جایگاه فسفریلاسیون ترئونین ۳۷/۴۶) در تمرین‌های استقامتی، اول کاهش و سپس افزایش چشمگیری را نشان داد و در تمرین‌های مقاومتی تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. در مقابل سطوح پروتئین 4E-BP1 در جایگاه ترئونین ۷۰ با تمرین‌های استقامتی کاهش و با تمرین‌های مقاومتی افزایش چشمگیری را نشان داد [۲۴].

نتایج تحقیق کامِرا و همکاران در محتوای پروتئین‌های AKT و mTOR افزایش معنی‌داری را نشان داد، که با نتایج مطالعه حاضر در یک راستاست؛ اما در محتوای پروتئین P70S6K1 این چنین نیست، زیرا در تحقیق حاضر افزایش معنی‌داری مشاهده نشد و گواه این مطلب است که ممکن است در طی انجام فعالیت ورزشی، سنتز پروتئین از مسیر دیگری مانند پروتئین 4E-BP1 صورت گیرد. ضمناً در هر دو تحقیق سطوح 4E-BP1 در جایگاه ترئونین ۳۷/۴۶ افزایش معنی‌داری یافته است.

در تحقیقی دیگر فلیپ[۲۴] و همکاران تأثیر تمرین‌های استقامتی را بر سطوح پروتئین‌های mTOR و P70S6K1 و 4E-BP1 در سه زمان ۳۰ دقیقه، ۳ و ۶ ساعت بعد از فعالیت ورزشی بررسی کردند. محتوای تام و فسفریلاسیون پروتئین mTOR (جایگاه سرین ۲۴۴۸) تفاوت معنی‌داری را در سه زمان نشان نداد. محتوای پروتئین‌های P70S6K1 (جایگاه فسفریلاسیون ترئونین ۳۸۹) و 4E-BP1 (جایگاه فسفریلاسیون ترئونین ۳۷/۴۶) در هر سه زمان کاهش معنی‌داری را نشان داد. محققان این پژوهش به این نتیجه رسیدند که تمرین‌های استقامتی برای سنتز پروتئین از طریق مسیر mTORC1 عمل نمی‌کند و این‌گونه تمرینات مسیر mTORC1 را غیرفعال می‌کند [۲۵].

همچنین در تحقیق دیگری مشاهده شد که سطوح پروتئین 4E-BP1 با تمرین‌های استقامتی تمایل به کاهش دارد [۲۶]. پروتئین 4E-BP1 یک تنظیم‌گر منفی پروتئین eIF4E است که میانجی بالقوه‌ای در ترجمه پروتئین است [۲۷]. eIF4E توسط فسفریلاسیون و همچنین جداسازی آن توسط پروتئین‌های متصل به eIF4E 4E–BPs تنظیم می‌شود. پروتئین بازدارنده 4E-BP1 علاوه بر eIF4E، به پروتئین eIF4G متصل می‌شود؛ بنابراین 4E-BP1 با eIF4G برای اتصال به جایگاه‌های مشابه در eIF4E رقابت می‌کند و درنتیجه از تولید کمپلکس eIF4F جلوگیری می‌کند و به مهار شروع ترجمه منجر می‌شود. درنتیجه mTORC1 به فسفریله‌شدن 4E-BP1 در پیش‌برنده‌های[۲۵] باقی‌مانده منجر می‌شود که باعث تفکیک eIF4E از 4E-BP1 و درنتیجه کاهش اثر مهاری 4E-BP1 بر eIF4E وابسته به شروع ترجمه می‌شود.[۶]

درنهایت، نتایج تحقیق حاضر در طول ۸ هفته فعالیت ورزشی استقامتی توانست آبشار سیگنالینگ AKT1/mTOR/4E-BP1 در مسیر نشانه‌پردازی mTORC1 را در آزمودنی‌های مبتلا به دیابت نوع ۲ فعال کند؛ بنابراین با توجه به نتایج این مطالعه فعالیت ورزشی استقامتی به سنتز پروتئین از طریق مسیر mTORC1 منجر شده است. این ممکن است به دلیل شرایط برنامه ورزشی انجام‌شده از حیث شدت یا مدت‌زمان فعالیت ورزشی باشد؛ بنابراین، با توجه به نتایج تحقیق حاضر برای سنتز پروتئین و یا هیپرتروفی عضلانی برای افراد دیابت نوع ۲ باید برنامه تمرینی با شدت، مدت زمان و نوع (مثلاً ترکیبی از فعالیت ورزشی استقامتی و مقاومتی) مناسبی در نظر گرفته شود.

22. Kazior
23. Camera
24. Philp
25. Promoter

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه کد اخلاق به شماره IR.SUMS.REC.1396.S1062 از دانشگاه علوم پزشکی شیراز را دارد.

حامی مالی

تمام مخارج این مقاله بر عهده نویسندگان مقاله بوده است و هیچ کمک خاصی از سازمان‌های تأمین مالی در بخش‌های عمومی، تجاری یا غیرانتفاعی دریافت نکرده است.

مشارکت نویسندگان

نگارش: همه نویسندگان؛ منابع و اعتبارسنجی: سعیده شادمهری و ندا آقایی بهمن‌بگلو؛ روش‌شناسی و تحلیل‌داده‌ها: محمد شرافتی‌مقدم؛ ویراستاری و مدیریت پروژه: فرهاد دریانوش.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

سپاسگزاری

نویسندگان از همه کسانی که در این مطالعه، در دانشگاه شیراز و دانشگاه علوم پزشکی شیراز، همکاری کرده‌اند، تشکر می‌کنند.

References

[1] Biglari S, Gaeini AA, Kordi MR, Ghardashi Afousi AG. The effect of 8 weeks high-intensity interval training on myostatin and follistatin gene expression in gastrocnemius muscle of the rats. J Arak Uni Med Sci. 2018; 21(1):1-10. [In Persian]

[2] Panahi S, Agha-Alinejad H, Gharakhanloo R, Fayazmilani R, Hedayati M, Safarzadeh A, et al. The effect of 4 weeks resistance training on murf1 gene expression and muscle atrophy in diabetic wistar rats. Medical J Tabriz Uni Med Sci Health Serv. 2016; 38(2):6-13. [In Persian]

[3] Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. Cell J. 2013; 149(2):274-93. [DOI:10.1016/j.cell.2012.03.017] [PMID] [PMCID]

[4] Menon S, Dibble CC, Talbott G, Hoxhaj G, Valvezan AJ, Takahashi H, et al. Spatial control of the TSC complex integrates insulin and nutrient regulation of mTORC1 at the lysosome. Cell J. 2014; 156(4):771-85. [DOI:10.1016/j.cell.2013.11.049] [PMID] [PMCID]

[5] Patursky-Polischuk I, Kasir J, Miloslavski R, Hayouka Z, Hausner-Hanochi M, Stolovich-Rain M, et al. Reassessment of the role of TSC, mTORC1 and microRNAs in amino acids-meditated translational control of TOP mRNAs. PLOS One. 2014; 9(10):e109410. [DOI:10.1371/journal.pone.0109410] [PMID] [PMCID]

[6] Showkat M, Beigh MA, Andrabi KI. mTOR signaling in protein translation regulation: Implications in cancer genesis and therapeutic interventions. Mol Biol Int. 2014; 2014(686984):1-14. [DOI:10.1155/2014/686984] [PMID] [PMCID]

[7] Ogasawara R, Yasuda T, Ishii N, Abe T. Comparison of muscle hypertrophy following 6-month of continuous and periodic strength training. Eur J Appl Physiol. 2013; 113(4):975-85. [DOI:10.1007/s00421-012-2511-9] [PMID]

[8] Crane JD, MacNeil LG, Tarnopolsky MA. Long-term aerobic exercise is associated with greater muscle strength throughout the life span. J Gerontol Ser A Biol Sci Med Sci. 2012; 68(6):631-8. [DOI:10.1093/gerona/gls237] [PMID]

[9] Konopka AR, Harber MP. Skeletal muscle hypertrophy after aerobic exercise training. Exerc Sport Sci Rev. 2014; 42(2):53-61. [DOI:10.1249/JES.0000000000000007] [PMID] [PMCID]

[10] Lundberg TR, Fernandez-Gonzalo R, Gustafsson T, Tesch PA. Aerobic exercise alters skeletal muscle molecular responses to resistance exercise. Med Sci Sports Exerc. 2012; 44(9):1680-8. [DOI:10.1249/MSS.0b013e318256fbe8] [PMID]

[11] Mascher H, Ekblom B, Rooyackers O, Blomstrand E. Enhanced rates of muscle protein synthesis and elevated mTOR signalling following endurance exercise in human subjects. Acta Physiol. 2011; 202(2):175-84. [DOI:10.1111/j.1748-1716.2011.02274.x] [PMID]

[12] 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. FASEB J. 2015; 29(8):3515-26. [DOI:10.1096/fj.14-267187] [PMID]

[13] Pierre W, Gildas AJ, Ulrich MC, Modeste WN, Benoît N, Albert K. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of Bersama engleriana leaves in nicotinamide/ streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. BMC Complement Altern Med. 2012; 12(1):264-9. [DOI:10.1186/1472-6882-12-264] [PMID] [PMCID]

[14] Shirwaikar A, Rajendran K, Barik R. Effect of aqueous bark extract of Garuga pinnata Roxb. in streptozotocin-nicotinamide induced type-II diabetes mellitus. J Ethnopharmacol. 2006; 107(2):285-90. [DOI:10.1016/j.jep.2006.03.012] [PMID]

[15] Burniston JG. Adaptation of the rat cardiac proteome in response to intensity-controlled endurance exercise. J Proteomics. 2009; 9(1):106-15. [DOI:10.1002/pmic.200800268] [PMID]

[16] Khani M, Motamedi P, Dehkhoda MR, Dabagh Nikukheslat S, Karimi P. Effect of thyme extract supplementation on lipid peroxidation, antioxidant capacity, PGC-1α content and endurance exercise performance in rats. J Int Soc Sports Nutr. 2017; 14:11. [DOI:10.1186/s12970-017-0167-x] [PMID] [PMCID]

[17] Hansen D, De Strijcker D, Calders P. Impact of endurance exercise training in the fasted state on muscle biochemistry and metabolism in healthy subjects: Can these effects be of particular clinical benefit to type 2 diabetes mellitus and insulin-resistant patients. Sports Med. 2017; 47(3):415-28. [DOI:10.1007/s40279-016-0594-x] [PMID]

[18] Coffey VG, Jemiolo B, Edge J, Garnham AP, Trappe SW, Hawley JA. Effect of consecutive repeated sprint and resistance exercise bouts on acute adaptive responses in human skeletal muscle. Am J Physiol Regul, Integr Comp Physiol. 2009; 297(5):R1441-51. [DOI:10.1152/ajpregu.00351.2009] [PMID]

[19] Ogasawara R, Sato K, Matsutani K, Nakazato K, Fujita S. The order of concurrent endurance and resistance exercise modifies mTOR signaling and protein synthesis in rat skeletal muscle. Am J Physiol-Endocrinol Metab. 2014; 306(10):E1155-62. [DOI:10.1152/ajpendo.00647.2013] [PMID]

[20] Hobert JA, Embacher R, Mester JL, Frazier II TW, Eng C. Biochemical screening and PTEN mutation analysis in individuals with autism spectrum disorders and macrocephaly.Eur J Hum Genet. 2014; 22(2):273-6. [DOI:10.1038/ejhg.2013.114] [PMID] [PMCID]

[21] Lipton JO, Sahin M. The neurology of mTOR. Neuron. 2014; 84(2):275-91. [DOI:10.1016/j.neuron.2014.09.034] [PMID] [PMCID]

[22] Ci Y, Shi K, An J, Yang Y, Hui K, Wu P, et al. ROS inhibit autophagy by downregulating ULK1 mediated by the phosphorylation of p53 in selenite-treated NB4 cells. Cell Death Dis. 2014; 5:e1542. [DOI:10.1038/cddis.2014.506] [PMID] [PMCID]

[23] Kazior Z, Willis SJ, Moberg M, Apró W, Calbet JA, Holmberg HC, et al. Endurance exercise enhances the effect of strength training on muscle fiber size and protein expression of Akt and mTOR. PLOS One. 2016; 11(2):e0149082. [DOI:10.1371/journal.pone.0149082] [PMID] [PMCID]

[24] Camera DM, Edge J, Short MJ, Hawley JA, Coffey VG. Early time course of Akt phosphorylation after endurance and resistance exercise. Med Sci Sports Exerc. 2010; 42(10):1843-52. [DOI:10.1249/MSS.0b013e3181d964e4] [PMID]

[25] Philp A, Schenk S, Perez-Schindler J, Hamilton DL, Breen L, Laverone E, et al. Rapamycin does not prevent increases in my-

ofibrillar or mitochondrial protein synthesis following endurance exercise. J Physiol. 2015; 593(18):4275-84. [DOI:10.1113/JP271219] [PMID] [PMCID]

[26] Rose AJ, Bisiani B, Vistisen B, Kiens B, Richter EA. Skeletal muscle eEF2 and 4EBP1 phosphorylation during endurance exercise is dependent on intensity and muscle fiber type. Am J Physiol Regul, Integr Comp Physiol. 2009; 296(2):R326-33. [DOI:10.1152/ajpregu.90806.2008] [PMID]

[27] Glass DJ. PI3 kinase regulation of skeletal muscle hypertrophy and atrophy. Curr Top Microbiol Immunol. 2010; 2010(346):267-278. [DOI:10.1007/82_2010_78] [PMID]