Journal of Sport and Exercise Physiology
2026, 19(2): 117-129

Orginal Article

The effect of six weeks of resistance training with whey protein supplementation on sphingosine 1-phosphate and gastrocnemius muscle hypertrophy in young male Wistar rats

Somaieh Jaafari Motlagh, Fereshteh Shahidi *, Majid Kashef

Exercise Physiology Department, Faculty of Sport Sciences, Shahid Rajaee Teacher Training University, Tehran, Iran

Abstract

Background and Purpose: Currently, increasing muscle mass and implementing methods to improve recovery after training are of particular importance. Resistance training plays a special role in increasing muscle mass and hypertrophy. Taking various types of supplements, such as whey protein after resistance training, can also help in this process. Sphingosine monophosphate (S1P) has a structural role in regulation, cell differentiation and hypertrophy, and this factor can play an important role in hypertrophy with training and supplementation. Whey protein, in combination with resistance training, can increase muscle protein synthesis, improve training and recovery in younger individuals. Therefore, this study aimed to investigate the combined effect of six weeks of resistance training with whey protein supplementation on S1P and hypertrophy of the gastrocnemius muscle of young male Wistar rats.

Materials and Methods: In this experimental study, 23 eight-week-old rats with a weight range of 250 to 270 grams were randomly assigned to four groups: supplement plus training, resistance training, sham, and control. They were trained for six weeks, five sessions per week. Each session included performance of 3 sets of 5 repetitions, climbing a one-meter ladder while carrying a weight attached to the tail. Whey protein supplement solution was administered by gavage in the supplementa plus training group. S1P gene expression was measured by Real Time-PCR and muscle hypertrophy was measured through weighing the gastrocnemius muscle. Data analysis were performed by using one-way variance, and Scheffe post-hoc test.

Results: Data analysis revealed a significant increase in S1P gene expression (P=0.001), muscle volume (P=0.016), and 1-RM (P=0.001) in training-supplement group compared to both training and sham groups. However, no significant differences in muscle volume were detected between the training and sham groups in comparison to the control group (p=0.6).

Conclusions: Overall, the findings of this study suggest that combining exercise with supplementation might induce muscle adaptations through its effects on S1P gene expression. However, due to study limitations, caution is warranted in generalizing these results to the population. Future studies with larger

* Corresponding Author's E-mail: fe-shahidi@sru.ac.ir
https://doi.org/10.48308/joeppa.2025.240277.1370
Received: 03/06/2025 Revised: 08/09/2025 Accepted: 17/09/2025

Copyright: © 2026 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

sample sizes, longer intervention periods, and concentrating on molecular mechanisms could help to shed some more lights on mechanisms.

Keywords: Resistance training, Muscle weight, Sphingosine-1-phosphate, Whey protein

How to cite this article: Jaafari motlagh S, Shahidi F, Kashef M. The effect of six weeks of resistance training with whey protein supplementation on Sphingosine 1-phosphate and gastrocnemius muscle hypertrophy in young male Wistar rats. J Sport Exerc Physiol. 2026;19(2):117-129.

نشریه فیزیولوژی ورزش و فعالیت بدنی
۱۴۰۵، دوره ۱۹، شماره ۲، صفحه‌های ۱۱۷-۱۲۹

مقاله پژوهشی

اثر شش هفته تمرین مقاومتی با مکمل‌یاری پروتئین وی بر اسفنگوزین- ۱- فسفات و هایپرتروفی ماهیچهٔ دوقلوی موش‌های صحرایی نر جوان نژاد ویستار

سمیه جعفری مطلق، فرشته شهیدی*، مجید کاشف

گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکدهٔ علوم ورزشی، دانشگاه تربیت دبیر شهید رجائی، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: امروزه افزایش حجم ماهیچه و اجرای روش‌هایی جهت بهبود بازیافت پس از تمرین از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. تمرین مقاومتی نقش ویژه‌ای در افزایش حجم ماهیچه و هایپرتروفی دارد. دریافت انواع مختلفی از مکمل‌ها، همچون پروتئین وی پس از تمرین مقاومتی نیز می‌تواند به این عمل کمک کند. اما از بین عوامل مختلف، اسفنگوزین مونو فسفات (S1P) نقش ساختاری در تنظیم، تمایز سلول و هایپرتروفی دارد و این عامل می‌تواند با تمرین و دریافت مکمل نقش مهم و ارزنده‌ای در هایپرتروفی داشته باشد. پروتئین وی نیز در ترکیب با تمرین مقاومتی می‌تواند پروتئین‌سازی ماهیچه، بهبود تمرین و بازیافت در افراد جوان‌تر را افزایش دهد. از این‌رو، هدف این پژوهش بررسی تأثیر شش هفته تمرین مقاومتی با مکمل‌یاری پروتئین Whey بر S1P و هایپرتروفی ماهیچهٔ دوقلوی موش‌های صحرایی نر جوان نژاد ویستار بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تجربی ۲۳ سر موش صحرایی هشت‌هفته‌ای با دامنهٔ وزن ۲۵۰ تا ۲۷۰ گرم به‌صورت تصادفی در چهار گروه تمرین- مکمل، تمرین مقاومتی، شم و کنترل جایگزین شدند و به مدت شش هفته با روش تمرینی پنج‌جلسه‌ای در سه نوبت و پنج تکرار به شکل بالا رفتن از نردبان یک‌متری و حمل وزنهٔ متصل به دم تمرین داده شدند. در گروه تمرین- مکمل محلول مکمل پروتئین وی نیز گاواژ شد. بیان ژن S1P به روش Real Time-PCR و هایپرتروفی ماهیچه با ترازوی مخصوص اندازه‌گیری شد. در تحلیل داده‌ها از آزمون شاپیروویلک، واریانس یکراهه و تعقیبی شفه در سطح P≤ ۰/۰۵ استفاده شد.

نتایج: نتایج نشان داد که بیان ژن S1P (p=۰/۰۰۱)، حجم ماهیچه (p=۰/۰۱۶ و 1-RM (p=۰/۰۰۱) درگروه تمرین- مکمل نسبت به گروه تمرین و شم به‌طور معناداری افزایش یافت. با این حال، تفاوت معناداری در میزان حجم ماهیچه در بین گروه‌های تمرین و شم با گروه کنترل مشاهده نشد (P=۰/۶).

نتیجه‌گیری: به‌طور کلی، نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که ترکیب تمرین با مصرف مکمل پروتئین وی ممکن است از طریق تأثیر بر بیان ژن S1P در بهبود برخی سازگاری‌های عضلانی نقش داشته باشد. با وجود این، به‌دلیل محدودیت‌های تحقیق، از جمله امکان محدود بودن حجم نمونه و شرایط اجرای پژوهش، تعمیم این نتایج به سایر جمعیت‌ها نیازمند احتیاط است. انجام پژوهش‌های آینده با حجم نمونهٔ بیشتر، دوره‌های مداخلهٔ طولانی‌تر و بررسی سازوکارهای مولکولی مرتبط می‌تواند به تبیین دقیق‌تر این یافته‌ها کمک کند.

واژه‌های کلیدی: اسفنگوزین -۱- فسفات، پروتئین آب پنیر، تمرین مقاومتی، قدرت بیشینه، وزن ماهیچه.

نحوه استناد به این مقاله: جعفری مطلق س، شهیدی ف، کاشف م. اثر شش هفته تمرین مقاومتی با مکمل‌یاری پروتئین وی بر اسفنگوزین مونو فسفات و هایپرتروفی ماهیچهٔ دوقلوی موش‌های صحرایی نر جوان نژاد ویستار. نشریهٔ فیزیولوژی ورزش و فعالیت بدنی. ۱۴۰۵؛۱۹(۲):۱۱۷-۱۲۹.

* رایانامه نویسنده مسئول: fe-shahidi@sru.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۳/۱۳ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۴/۰۶/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۶/۲۶

مقدمه

یکی از مسائل مهم و ارزشمندی که ورزشکاران با آن مواجه‌اند افزایش توده و قدرت ماهیچه و در پی آن بهبود عملکرد ورزشی است. انجام تمرینی که از یک مقاومت خارجی در انقباض ماهیچه‌ای استفاده می‌شود و در شکل‌های متفاوتی مانند تمرین با وزن بدن، تمرین با کش و تمرین با وزنه آزاد قابل انجام است، مؤثرترین راه و روش معمول با افزایش ساخت و تخریب پروتئین در افزایش حجم ماهیچهٔ اسکلتی است (۱)، به‌طوری‌که امرویچ[۱] و همکاران (۲۰۰۹) با بررسی تمرین برون‌گرا و درون‌گرا نشان دادند که آزمودنی‌ها از تمرین برون‌گرا در افزایش قدرت و هایپرتروفی، بیشتر سود بردند (۲). همسو با این فراتحلیل، ماتیاس مولر[۲] و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که تمرین مقاومتی و به‌ویژه تمرین برون‌گرا بار مکانیکی بیشتری بر ماهیچه وارد می‌کند (۳). اما افزون بر بهره‌مندی از تمرین قدرتی سنگین، دریافت مکمل‌های تجاری به‌منظور دستیابی به ظاهر بدنی مناسب، کسب موفقیت و قدرت در ورزشکاران به‌خصوص مردان جوان افزایش یافته است (۴). جدا از عوامل سن یا جنس، تمرین مقاومتی به‌همراه تأمین مقادیر کافی پروتئین رژیم غذایی یا اسیدهای آمینهٔ ضروری می‌توانند پروتئین‌سازی ماهیچه‌ای در بزرگسالان سالم را افزایش دهند. دریافت ترکیبی EAA[۳]/ PRO[۴] و تمرین بر مبنای مقاومتی می‌تواند سبب تحریک بیشتر در افزایش پروتئین‌سازی ماهیچه (MPS)[۵] شود و به اثر آنابولیکی بیشتر از ورزش به اضافهٔ کربوهیدرات‌ها بینجامد. در این دو دهه به‌سبب پیشرفت عملکرد ورزشی مکمل‌های اسید آمینهٔ فراوانی پیشنهاد شده‌اند که در تحریک هورمونی و بالا بردن تمرکز ذهنی و تمایل به اجرای بیشینه و کاهش نشانگرهای تخریب ماهیچه و خستگی مؤثر بوده‌اند (۵). مکمل‌های کراتین، HMB و آب پنیر (پروتئین Whey)[۶] از جمله مکمل‌هایی هستند که مورد توجه ورزشکاران مختلف قرار گرفته‌اند و هیچ‌گونه ضرری برای افراد سالم ندارند. در این زمینه اسپیلن و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که ترکیب مکمل کراتین با تمرین مقاومتی سنگین بر روی ترکیب بدنی موجب هایپرتروفی و افزایش قدرت و سطوح کراتین ماهیچه می‌شود(۶). همچنین ناصری و همکاران (۱۳۹۸) نشان دادند که دریافت مکمل HMB بر افزایش حجم ماهیچه مؤثر است (۷). یکی دیگر از این مکمل‌ها پروتئین وی است که منبع غنی از کلسیم و دیگر مواد معدنی بوده و شامل غلظت زیادی از اسید آمینه‌های ضروری به‌ویژه لوسین است و می‌تواند به شکل یک ضداکساینده و منبع غنی ضدباکتری و ضدویروس، ضدفشار خون، ضدتومور و کاهش‌دهندهٔ چربی خون عمل کند (۸). ناکلریو و سجیو[۷] (۲۰۱۹) نیز به تأثیرات مفید دریافت پروتئین وی به‌تنهایی و همراه با کربوهیدرات، کراتین مونوهیدرات و سایر منابع پروتئینی مانند کازئین بر افزایش تودهٔ بدون چربی اشاره کردند (۹). دریافت مداوم پروتئین وی به‌عنوان یک مکمل غذایی حاوی اسفنگولیپید مشابه لیپوپروتئین‌های پلاسمای سلول انسانی موجب افزایش تولید اسفنگوزین می‌شود. بدین صورت که اسفنگومیلین غذایی به اسفنگوزین و چربی آزاد هیدرولیز می‌شود، اسیدهای موجود در دستگاه گوارش به‌خوبی در سلول‌های مخاطی جذب شده و به شیلومیکرون تبدیل می‌شوند، بخش کوچکی از بازهای اسفنگوئیدی دوباره به مخاط وارد می‌شوند و اسفنگومیلین را تشکیل می‌دهند و از آن سرامید یا اسفنگوزین تولید می‌شود. این فرایند اسفنگوزین-۱-فسفات (S1P) پلاسما و ماهیچه را افزایش می‌دهد (۱۰). تودهٔ ماهیچه‌ای اسکلتی در موارد پاتولوژیک، مانند بیماری کاشکسی (لاغری و نزاری) یا بی‌اشتهایی عصبی و همچنین طی فرایند پیری (سارکوپنیا) یا روش زندگی از جمله قطع (بی‌تحرکی) یا کاهش (کم‌تحرکی) فعالیت ورزشی در ورزشکاران،

کاهش می‌یابد و در پی آن کم شدن قدرت ماهیچه‌ای و اختلال در عملکرد بدنی است که می‌تواند به ناتوانی و معلولیت بینجامد (۱۱). افزایش تودهٔ ماهیچهٔ اسکلتی و سازوکارهای اصلی حفظ و نگهداری آن در شرایط فیزیولوژیکی، مستلزم درگیری چندین مسیر پیام‌رسانی بسیار حساس و دقیق کنترل‌کنندهٔ فرایندهای ساخت و تخریب پروتئین ماهیچه‌ای است که در نتیجهٔ آن شمار رشته‌های میوزین، آکتین و افزایش درسارکوپلاسم و بافت همبند افزایش می‌یابد (۱۲). در بسیاری از فرایندهای پاتوفیزیولوژیک، مانند ساخت و تخریب ماهیچهٔ اسکلتی و دستگاه عصبی ماهیچه‌ای اسفنگولیپیدها (SL) نقش درون یا برون‌سلولی دارند و شامل S1P و سرامیدها می‌شوند؛ لیپیدهای فعال زیستی‌ای که از دید عملکردی در نقطهٔ مقابل هم بوده و قادر به راه‌اندازی چندین مسیر پیام‌رسانی تنظیم و تعیین سرنوشت سلول هستند (۱۳). S1P نقش دوگانه دارد؛ افزون بر پاسخ‌دهی یا مقاومت در برابر انسولین می‌تواند تأثیرات سودمندی همچون مقاومت در برابر خستگی داشته باشد و همچنین با اثر بر کانال‌های کلسیمی و گیرنده‌های ریانودین به تحریک و انقباض ماهیچه‌ای منجر شود (۱۴). همچنین به‌عنوان عاملی قوی در تمایز سلولی و در مسیر پیام‌رسانی وابسته به پروتئین کیناز فعال‌شده توسط میتوژن (MAPK)[۸] معرفی شود (۱۵). تا به امروز، صدها پروتئین کیناز شناخته شده است که از معروف‌ترین آن‌ها خانوادهٔ بزرگ MAPK است و عملکردهای بسیاری را در سلول کنترل می‌کند. میتوژن‌ها عوامل پیام‌رسانی هستند که از بخش خارجی سلول، برای القای میتوز و تقسیم سلولی پیام را ارسال می‌کنند. همان‌طور که در بررسی‌های پژوهشی مشخص شده است MAPK ذاتاً بیان ژن را از طریق حداقل دو سازوکار ۱. فسفوریلاسیون عوامل رونویسی و ۲. بازسازی کروماتین تعدیل می‌کند و تا به امروز، بسترهای فراوانی از MAPK شناسایی شده‌اند (۱۶). از جمله چندین عوامل رونویسی در بیان ژن، آنزیم اسفنگوزین - ۱- فسفات کیناز(SK) است (۱۷). SK آنزیمی است که از طریق فعال‌سازی داخل‌سلولی اسفنگوزین را به محصول S1P فسفوریله می‌کند (۱۸، ۱۹) و به دو شکل (SK1,SK2) شناخته می‌شود. این دو آنزیم نقش‌های متفاوتی دارند؛ SK1 در رشد سلول و بقای سلول نقش دارد و تحریک آن بر اثر تحریک سلول با عوامل رشدی و سایتوکین‌ها صورت می‌گیرد و با انتقال از سیتوپلاسم به غشای سیتوپلاسمی می‌رود، درحالی‌که SK2 به توقف رشد سلول منجر شده و افزایش مرگ برنامه‌ریزی‌شدهٔ سلول را به‌دنبال دارد و شاید S1P ترشح‌شده از سلول‌ها در این شرایط تولید می‌شود (۱۵).

با توجه به مطالب بیان‌شده هایپرتروفی به‌عنوان یک نیاز ورزشکاران در افزایش رشد، توان و کارایی ماهیچه‌ای اسکلتی و همچنین S1P با عملکرد گسترده و گوناگون در سلول به‌عنوان عامل فعال‌کنندهٔ مسیرهای رشدی جدید ماهیچه در تکثیر و بقای مزونژیوبلاست‌ها و یا برعکس فعال‌کنندهٔ مسیرهای مرگ برنامه‌ریزی‌شدهٔ سلول در بیماری‌ها و ایجاد تومور مورد توجه پژوهشگر حاضر قرار گرفته است و از آنجایی که طبق بررسی‌های انجام‌شده تاکنون پژوهشی دربارهٔ اثر این لیپید بیواکتیو بر مسیر رشد سلول‌های ماهیچه‌ای و افزایش هایپرتروفی در مدت شش هفته در دست نیست، این پژوهش با هدف بررسی تأثیر شش هفته تمرین مقاومتی با مکمل‌یاری پروتئین Whey بر S1P و هایپرتروفی ماهیچهٔ دوقلوی موش‌های صحرایی نر جوان نژاد ویستار انجام گرفت.

روش پژوهش

نمونه‌های پژوهش: این پژوهش در قالب یک طرح تجربی-توسعه‌ای روی ۲۳ موش صحرایی هشت‌هفته‌ای با وزن حدود ۲۵۰-۲۷۰ گرم که از آزمایشگاه سورن تهران خریداری شد و در اتاق با دمای ۱۸ تا ۲۳ درجهٔ

سانتی‌گراد، رطوبت بین ۴۰ تا ۶۰ درصد و با یک دوره ۱۲ ساعت روز، ۱۲ ساعت شب در قفس‌های پلی‌کربنات در حیوان‌خانهٔ آزمایشگاه دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی نگهداری شدند. موش‌های صحرایی آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند و غذای آن‌ها از نوع فشرده و آمادهٔ ویژهٔ موش‌های صحرایی بود و برای آب دریافتی نیز از آب شهری استفاده شده است. موش‌های صحرایی پس از دو هفته آشناسازی با محیط و روش تمرین به‌صورت تصادفی در چهار گروه کنترل (n=۳)، گروه شم (n=۶)، گروه تمرین (n=۷) و گروه تمرین- مکمل (n=۷) قرار گرفتند.

روش اجرای پژوهش: روش تمرین شامل دو هفته آماده‌سازی حیوانات با محیط و روش اجرای تمرین و شش هفته تمرین مقاومتی به شکل بالا رفتن از نردبان یک‌متری با شیب ۸۵ در صد و میله‌هایی به فاصلهٔ دو سانتی‌متر موجود در آزمایشگاه حیوانات دانشگاه شهید رجایی بود که با حمل وزنه‌هایی درون کیسه‌های پارچه‌ای که با چسب نواری به دوسوم انتهای پروگزیمال (نزدیک به تنه) دم موش‌های صحرایی متصل بود، انجام گرفت. سپس روش تمرین مقاومتی به مدت شش هفته روی موش‌های صحرایی گروه تمرین و تمرین-مکمل، از ساعت ۱۰ صبح تا ۱۶ عصر اجرا شد (روزهای استراحت دوشنبه‌ها و جمعه‌ها تعیین شد). موش‌های صحرایی در سه نوبت و استراحت دودقیقه‌ای بین هر نوبت و پنج تکرار با یک دقیقه استراحت از نردبان بالا می‌رفتند و در صورت توقف با لمس دم تحریک به حرکت می‌شدند و همچنین گروه تمرین مکمل در مدت شش هفته تمرین، حدوداً ۱۰ تا ۳۰ دقیقه پس از هر جلسهٔ تمرین به مقدار ۲/۰۵ گرم پروتئین وی محصول شرکت اپتیموم (GOLD STANDARD WHEY; Optimum USA., Inc, Nutritio)به صورت گاواژ دریافت کرد. میزان دوز مکمل پروتئین وی مورد استفاده در این پژوهش و بر پایهٔ میزان دریافتی توسط انسان نسبت سطح بدن و با استفاده از فرمول برآورد شده است. با فرض وزن انسان ۶۰ کیلوگرمی و میزان دریافتی معادل انسانی ۲۰ گرم برای یک فرد ۶۰ کیلوگرمی (۰/۳۳۳ گرم بر کیلوگرم وزن بدن) ۰/۳۳۳ × ۶/۱۷ = ۲/۰۵ گرم بر کیلوگرم میزان دریافتی محاسبه و ضریب تبدیل ۶/۱۷ برای محاسبهٔ تفاوت در سطح رویهٔ بدن بین رت و انسان استفاده شد (۲۰).

همهٔ مراحل جراحی در یک جلسه انجام گرفت. موش‌ها ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسهٔ تمرین (برای از بین رفتن آثار حاد تمرین) از طریق تزریق کتامین (۷۵mg/kg) و زایلازین (۲۰mg/kg) بی‌هوش شدند. سپس ماهیچهٔ دوقلو از پای چپ خارج و نمونهٔ ماهیچه به‌سرعت در نیتروژن مایع منجمد شده و به‌منظور بررسی‌های آتی در دمای ۸۰ - درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند. از کیت شرکت سیناکلون، برای استخراج RNA استفاده شد. روش استخراج به شرح زیر بود: ۲۰۰ میکرولیتر از بافت هموژنیزه‌شده در میکروتیوب ریخته شده و پس از آن ۴۰۰ میکرولیتر از محلول لیزکنندهٔ ۷ به آن اضافه و بلافاصله به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شد. ۳۰۰ میکرولیتر محلول Precipitation به آن اضافه شده و ۱۰ بار میکروتیوب سروته شد تا خوب مخلوط شود. همهٔ مواد داخل میکروتیوب، به میکروتیوب حاوی ستون ۸ انتقال داده شده و به مدت یک دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. ستون به میکروتیوب جدید انتقال داده شده و ۴۰۰ میکرولیتر از بافر شست‌وشودهندهٔ I به آن اضافه شده و به مدت یک دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. ستون مجدداً به میکروتیوب جدید انتقال یافت و ۴۰۰ میکرولیتر از بافر شست‌وشودهندهٔ II به آن اضافه شده و یک دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. انتقال ستون به میکروتیوب جدید و سانتریفیوژ به مدت دو دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ دور برای خشک شدن کامل اتانول باقی‌مانده. انتقال ستون به میکروتیوب استریل و بدون

نوکلئوتید و اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر آب مقطر بدون RNase به ستون و قرار دادن پنج دقیقه در دمای ۵۵ درجهٔ سانتی‌گراد، سپس سانتریفیوژ با دور ۱۳۰۰۰ به مدت یک دقیقه. بررسی یک میکرولیتر از RNA جهت تعیین خلوص RNA با دستگاه نانودراپ و نگهداری بقیه در دمای ۷۰- درجهٔ سانتی‌گراد تا زمان تهیهٔ cDNA.

جدول ۱. توالی آغازگر بیان ژن S1P

شمارهٔ سریال کیت	توالی آغازگر	بیان ژن
(5201Cat. No: RT9)	R1: gagtgagcttgtaggtggtg F1: tcatcgtccggcattacaacta	S1P

در این مرحله از کیت ساخت cDNA شرکت سیناکلون ۹ (۵۲۰۱Cat. No: RT) و میکروتیوب‌های استریل و بدون نوکلئاز استفاده شد. مراحل سنتز cDNA به شرح زیر است: مقدار هشت میکرولیتر از RNA استخراجی ۱۰ و یک میکرولیتر از رندوم هگزامر ۱۱ در میکروتیوب ۰/۲ میلی‌لیتری ریخته شده و حجم نهایی با آب مقطر ۱۲ به ۱۰ میکرولیتر رسانده شد و میکروتیوب به مدت پنج دقیقه در دمای ۶۵ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شده، سپس دو دقیقه در یخ قرار داده شد و برای اینکه همهٔ مواد موجود در میکروتیوب در قسمت عمقی باشد و به دیواره نچسبیده باشد، چند ثانیه سانتریفیوژ یا Spin شدند. برای ادامهٔ ساخت cDNA لازم بود محلول زیر آماده و به قسمت بالایی اضافه شود: در میکروتیوب جداگانه‌ای دو میکرولیتر بافر X M- Mulv۱۰Buffer، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Reverse Transcriptase M-Mulv، دو میکرولیتر ۱۰dNTP Mix mM، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم محافظت‌کنندهٔ Rnase inhibitor ترکیب و حجم نهایی با آب مقطر DEPC- treated Water به ۱۰ میکرولیتر رسانده شد(۱۷). اضافه کردن محلول آماده در میکروتیوب مرحلهٔ اول، پس از آن مخلوط و سانتریفیوژ شد و یک ساعت در دمای ۴۲ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت. مرحلهٔ غیرفعال کردن آنزیم، در دمای ۸۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه انجام گرفت. cDNA ساخته‌شده به‌طور مستقیم در Real time PCR استفاده شد.

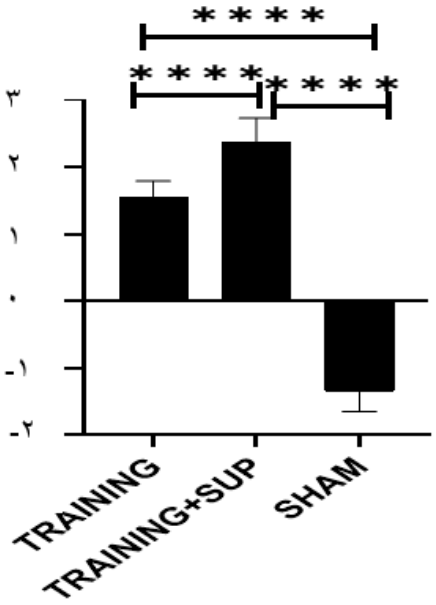
برای مشخص کردن توزیع طبیعی داده‌ها از آزمون شاپیروویلک و لون و برای همگنی واریانس‌ها و بررسی تغییرات بین گروه‌ها از آزمون تعقیبی شفه در سطح معناداری P≤ ۰/۰۵ توسط نرم‌افزار SPSS و جهت رسم نمودار از نرم‌افزار Prism استفاده شد.

نتایج

میانگین و انحراف معیار سن موش‌های صحرایی در آغاز پژوهش هشت هفته بود که در پایان به ۱۶ هفته رسید. میانگین و انحراف معیار متغیر وزن موش‌های صحرایی گروه تمرین و تمرین- مکمل در پس‌آزمون نسبت به پیش‌آزمون بیشتر از گروه کنترل و شم بود که تأثیر تمرین را نشان می‌دهد.

شکل ۱ اندازهٔ میانگین و انحراف معیار وزن ماهیچهٔ دوقلوی موش‌های صحرایی را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشخص است افزایش در وزن ماهیچهٔ گروه تمرین- مکمل نسبت به گروه تمرین و شم نشان‌دهندهٔ تأثیر بالای تمرین با مکمل‌یاری پروتئین وی است.

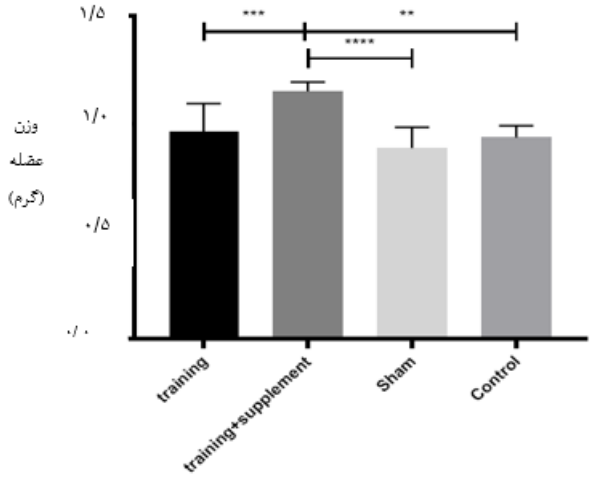
نتایج آزمون آماری تحلیل واریانس یکطرفه و آزمون تعقیبی شفه، نشان داد که وزن ماهیچه در گروه تمرین- مکمل نسبت به گروه تمرین و شم افزایش داشت و این اختلاف معنادار بود. داده‌های حاصل از اندازه‌گیری وزن ماهیچهٔ دوقلوی موش‌های صحرایی این افزایش در گروه تمرین- مکمل نسبت به دیگر گروه‌ها را تأیید می‌کند (P =۰/۰۱ و f =۸/۸۲۲) (شکل ۱).



شکل ۱. وزن ماهیچهٔ دوقلو پس از تمرین مقاومتی در موش‌های صحرایی(****نشان‌دهنده اختلاف آماری بسیار معنی‌دار (P<0.0001)بین گروه‌های مقایسه‌شده است.)

شکل ۲ میانگین و انحراف معیار بیان ژن S1P در گروه‌های مختلف، پس از شش هفته تمرین مقاومتی با مکمل‌یاری پروتئین وی را نشان می‌دهد. افزایش بیان ژن S1P در گروه تمرین- مکمل (۲/۳۸ ±۰/۳۴) نسبت به گروه تمرین (۱/۵۶±۰/۲۲) و شم (۱/۳۵-±۰/۲۹) .

نتایج تحلیل واریانس یکراههٔ این پژوهش نشان داد که بیان ژن S1P پس از تمرین با مکمل‌یاری پروتئین وی در گروه تمرین- مکمل نسبت به گروه تمرین و گروه تمرین نسبت به شم افزایش یافته است (P =۰/۰۰۰۱ و f =۲۴۹/۷) که نشان‌دهندهٔ تأثیر بالای تمرین با مکمل‌یاری پروتئین وی است (شکل ۲).



شکل ۲. بیان ژن S1P در موش‌های صحرایی پس از تمرین مقاومتی و مصرف مکمل Whey

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد پس از شش هفته تمرین مقاومتی با مکمل‌یاری پروتئین وی به‌طور معناداری بیان ژن S1P در گروه تمرین-مکمل نسبت به دیگر گروه‌ها و وزن ماهیچهٔ دوقلوی موش‌های صحرایی گروه تمرین و تمرین-مکمل نسبت به گروه شم و کنترل افزایش یافته است. از این‌رو، هایپرتروفی ماهیچه‌ای این موش‌های صحرایی در پژوهش مشهود است. همسو با یافته‌های این پژوهش محمدنژاد و همکاران (۲۰۲۰) با بررسی تأثیر شش هفته تمرین مقاومتی روی موش‌های صحرایی هشت‌هفته‌ای نر نژاد ویستار در مسیر رشد ماهیچه نشان دادند که یک برنامهٔ تمرینی با شدت و حجم تمرین مؤثر مشابه شمار هفته‌های بالاتر از شش هفته خواهد بود (۲۱). همسو با یافته‌های این پژوهش، قلی‌پور و همکاران (۱۳۹۸) در یک روش تمرین مقاومتی مشابه این پژوهش و تمرین استقامتی در هشت هفته تمرین روی ۲۴ موش صحرایی هشت‌هفته‌ای دریافتند که روش‌های ورزشی کنونی آثار کمابیش یکسانی بر تغییرات بیان ژن‌های درگیر مسیر ساخت و تخریب پروتئین دارند (۲۲). نتایج بررسی‌های کامیلا و همکاران (۲۰۱۹) روی ۲۰ سر موش‌های صحرایی با روش تمرینی شش‌هفته‌ای نیز نشان می‌دهد که هر دو نوع تمرین مقاومتی با شدت بالا و شدت متوسط موجب ایجاد هایپرتروفی ماهیچه‌ای و افزایش آن می‌شوند. گمان می‌رود که تمرین مقاومتی با شدت متوسط به‌دلیل افزایش حجم تمرین و مقایسهٔ اندازهٔ ۳۰٪-۹۰٪ 1 RM در این پژوهش و پژوهش دیگران، از هایپرتروفی تارهای کندانقباض حمایت می‌کند (۲۳). از آنجا که S1P به‌عنوان میانجی‌گر خارج‌سلولی در کنترل تحریک‌پذیری سلول با اتصال به G پروتئین‌ها، گیرنده‌های موجود در غشا (که S1P1(EDG-1)، S1P2(EDG-5)، S1P3(EDG-3)، S1P4(EDG-6)، S1P5(EDG-8) نام دارند)، به‌صورت پیام‌رسان اولیه و پیام‌رسان ثانویه عمل می‌کند، موجب فعالیت آن‌ها می‌شود (۲۴). آثار پیام‌رسانی S1P از طریق فعال‌سازی فسفولیپاز C، تحریک +Ca2، فعال‌سازی ERK1/2 ، JNK، Akt، Rho و Rac، PI3Kinase، MAPK و دیگر میانجی‌های پایین‌رونده تعدیل شده و با افزایش جریان کلسیم درون‌سلولی موجب مهار تجمع cAMP می‌شود (۲۵). مسیر پیام‌رسانی پروتئین‌سازی JNK، PI3K/AKTدر مسیر آبشاری وابسته به گیرندهٔ عوامل رشدی فعال است که ضمن غیرفعال کردن عوامل تجزیهٔ پروتئین، در نهایت به فعال شدن mTORC1 منجر می‌شود (۲۶). این مولکول از طریق فسفریله و فعال کردن P70S6K (Rps6kb1) موجب افزایش بیان پروتئین‌های تنظیمی چرخهٔ سلولی می‌شود. گرجیک و شوئنفلد (۲۰۱۸) و کوردیرو و همکاران (۲۰۱۸) با بازنگری یافته‌های پژوهشی موجود به این باور دست پیدا کردند که تمرین مقاومتی با زمان کم و بار زیاد شاید بتواند تأثیرات هایپرتروفی متفاوتی در تار ماهیچه‌ای ایجاد کند (۲۷) و این اثر تحت تأثیر نقش S1P در کنترل اعمال حیاتی سلول در رشد و بقا قرار می‌گیرد. با توجه به یافته‌های پژوهشی پیشین ساسولی و همکاران (۲۰۱۹) همسو با یافته‌های این پژوهش در بررسی نقش S1P ماهیچه به‌عنوان یک عامل تغذیه‌ای و پیام‌رسانی در ماهیچهٔ اسکلتی نیز می‌توان گفت فعالیت ورزشی به‌ویژه تمرین مقاومتی با ایجاد تغییر در شمارش و عملکرد پلاکت‌ها و فعال‌سازی مسیر آبشاری MAPK می‌تواند بر افزایش بیان ژن S1P ماهیچه‌ای مؤثر باشد و هایپرتروفی تحت تأثیر این عامل رشدی رخ خواهد داد (۲۸). با این همه، پژوهشی که اثر همزمان تمرین مقاومتی و مکمل‌یاری پروتئین وی را بر بیان ژن S1P و هایپرتروفی ماهیچهٔ دوقلو بررسی کرده باشد، یافت نشد ؛ اما یافته‌های این پژوهش مبنی بر اثرگذاری تمرین مقاومتی بر افزایش بیان ژن S1P ماهیچه در گروه تمرین و تمرین-مکمل نسبت به گروه

شم ناهمسو است با یافته‌های پژوهش احمدی کانی و همکاران (۲۰۱۲) که نشان می دهند مکمل یاری پروتئین وی برای تغییرات ترکیب بدنی و قدرت ضروری نیست که شاید دلیل این تفاوت در نوع آزمودنی‌ها (که مردان جوان تمرین‌نکرده بودند) و همچنین شدت تمرین باشد (۲۹). بنی طالبی و همکاران (۱۳۹۰) نیز با بررسی تأثیر تمرین مقاومتی بر S1P نشان دادند که افزایش میزان سطح S1P پلاسمایی و بافتی ماهیچه‌ای تند و کندانقباض بیان می‌کند که پاسخ تمرین مقاومتی می‌تواند نسبت به نوع تار ماهیچه ویژه باشد (۱۷). پیروچی و همکاران (۲۰۱۸) نیز نشان دادند که افزایش میزان فسفوریلاسیون و تولید S1P و کاهش تجزیهٔ این لیپید به‌عنوان میانجی‌گرهای خارج‌سلولی شاید بتواند موجب افزایش رشد ماهیچه‌ای (هایپرتروفی)، کنترل و تعدیل عملکردهای سلولی شود (۳۰). با توجه به این نتایج و یافته‌های این پژوهش در بررسی همزمان تأثیر تمرین مقاومتی با مکمل‌یاری پروتئین وی دریافتیم که تمرین مقاومتی با مکمل‌یاری پروتئین وی به افزایش پروتئین‌سازی و فعالیت سلول از طریق مسیرهای پیام‌رسانی وابسته به MAPK منجر شده‌اند. S1P با تأثیر بر افزایش فعالیت کانال‌های کلسیمی انقباض و تحریک ماهیچه، افزایش رونویسی و پروتئین‌سازی را به‌دنبال داشت که در تحلیل داده‌های بافت گروه تمرین و تمرین- مکمل نسبت به گروه شم به‌طور واضح مشهود بود و افزایش هایپرتروفی در این گروه‌ها با توجه به نتایج داده‌های وزن ماهیچه تأیید شد. روی‌هم‌رفته افزایش معنادار بیان ژن S1P ماهیچهٔ گروه تمرین-مکمل نسبت به گروه تمرین و شم بیانگر آن است که تمرین مقاومتی با مکمل‌یاری پروتئین وی اثر بیشتری نسبت به تمرین مقاومتی به‌تنهایی بر بیان ژن S1P ماهیچه داشته است.

در این پژوهش، بیان آنزیم‌ها و گیرنده‌های S1P بررسی نشد، بنابراین پیشنهاد می‌شود که پژوهش‌های آتی این موضوع را مدنظر قرار دهند و فعالیت آنزیم‌های S1P و بیان آن‌ها را همزمان بررسی کنند.

پیام مقاله: نتایج این تحقیق در مدل حیوانی نشان می‌دهد که ترکیب تمرین ورزشی با مصرف مکمل وی ممکن است از طریق تأثیر بر بیان ژن S1P در بهبود برخی سازگاری‌های عضلانی نقش داشته باشد. با این حال، با توجه به انجام پژوهش روی حیوانات آزمایشگاهی تعمیم این یافته‌ها به انسان با احتیاط امکان‌پذیر است و انجام مطالعات بالینی برای تأیید این نتایج ضروری است.

این مقالهٔ پژوهشی از نتایج انجام کار پایان‌نامه است که به‌صورت گروهی انجام شد.

ملاحظات اخلاقی: این پژوهش با رعایت موازین اخلاقی و طبق کد اخلاق دریافتی از کارگروه اخلاق در پژوهش پژوهش‌سرای علوم ورزشی با سریال (#SSRI.REC-2205-1628 (R1) صورت پذیرفته است.

تشکر و قدردانی

از همهٔ عزیزانی که ما را در این پژوهش یاری کردند به‌خصوص سرکار خانم فاطمه نورزاد دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی کمال تشکر را داریم.

حمایت مالی

برای انجام این پژوهش هیچ‌گونه حمایت مالی از هیچ ارگانی دریافت نشد.

مشارکت نویسندگان

تمامی نویسندگان در اجرای این پروژه و جمع‌آوری داده‌ها مشارکت یکسان داشتند.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارضی بین نویسندگان وجود ندارد.

پی‌نوشت‌ها

[1] Roig M
[2] Matthias, Mueller
[3] Essential amino acid (EAA)
[4] Dietary protein
[5] Muscle Protein Synthesis (MPS)
[6] Whey Protein
[7] Naclerio F, Seijo-Bujia M
[8] Mitogen-activated protein kinase (MAPK)

منابع

1. Mohammadnezhad G, Matin Homaee H, Ghazalian F. Effect of 6 Weeks of Aerobic Training on TGF-B1, Myostatin and Matrix Metalloproteinase 9 Genes Expression in the Tendon of Fast-and Slow-Twitch Muscles of Male Wistar Rats. Journal of Arak University of Medical Sciences. 2020;23(3):278-91. https://dor.isc.ac/dor/20.1001.1.17355338.1399.23.3.11.5

2. Roig M, O'Brien K, Kirk G, Murray R, McKinnon P, Shadgan B, et al. The effects of eccentric versus concentric resistance training on muscle strength and mass in healthy adults: a systematic review with meta-analysis. British journal of sports medicine. 2009;43(8):556-68. https://doi.org/10.1136/bjsm.2008.051417

3. Mueller M, Breil FA, Vogt M, Steiner R, Lippuner K, Popp A, et al. Different response to eccentric and concentric training in older men and women. European journal of applied physiology. 2009;107(2):145-53.. https://link.springer.com/article/10.1007/s00421-009-1108

4. Tipton KD, Elliott TA, Ferrando AA, Aarsland AA, Wolfe RR. Stimulation of muscle anabolism by resistance exercise and ingestion of leucine plus protein. Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism. 2009;34(2):151-61. https://doi.org/10.1139/H09-006

5. Bloomer RJ. The role of nutritional supplements in the prevention and treatment of resistance exercise-induced skeletal muscle injury. Sports Medicine. 2007;37(6):519-32. https://link.springer.com/article/10.2165/00007256-200737060-00005

6. Spillane M, Schoch R, Cooke M, Harvey T, Greenwood M, Kreider R, et al. The effects of creatine ethyl ester supplementation combined with heavy resistance training on body composition, muscle performance, and serum and muscle creatine levels. Journal of the International Society of Sports Nutrition. 2009;6(1):6. https://doi.org/10.1186/1550-2783-6-6

7. Amiri N, Matinhomaee H, Peeri M, Azarbaielani M. The effect of 6 weeks eeccentric training and HMB supplement on p70s6k expression of the adult male rats. Medical Journal of Mashhad University of Medical Sciences. 2019;62(5).. https://doi.org/10.22038/MJMS.2019.15191

8. Zahabi G. Effect of whey protein & creatine supplementation on the fitness indicators, velocity and muscle hypertrophy of untrained men over a period of resistance training. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology. 2015;10(2):19-28. http://nsft.sbmu.ac.ir/browse.php?a_id=1622&sid=1&slc_lang=en

9. Naclerio F, Seijo M. Whey protein supplementation and muscle mass: current perspectives. Nutrition and Dietary Supplements. 2019;2019(11):37-48. https://doi.org/10.2147/NDS.S166195

10. Haramizu S, Ota N, Otsuka A, Hashizume K, Sugita S, Hase T, et al. Dietary milk fat globule membrane improves endurance capacity in mice. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 2014;307(8):R1009-R17. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00004.2014

11. Mohammadi R, Afroundeh R, Khajehlandi M, Mohammadian M. Survey on the Acute Effect of Resistance Training with and without Blood Flow Restriction on Muscle Hypertrophy Indicators. The Scientific Journal of Rehabilitation Medicine. 2020;9(1):147-55. https://doi.org/10.22037/jrm.2019.112040.2146

12. Hulmi JJ, Lockwood CM, Stout JR. Effect of protein/essential amino acids and resistance training on skeletal muscle hypertrophy: A case for whey protein. Nutrition & metabolism. 2010;7(1):1-11. https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-51

13. Romero-Guevara R, Cencetti F, Donati C, Bruni P. Sphingosine 1-phosphate signaling pathway in inner ear biology. New therapeutic strategies for hearing loss? Frontiers in aging neuroscience. 2015;7:60. https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00060

14. Zeidan YH, Hannun YA. Translational aspects of sphingolipid metabolism. Trends in molecular medicine. 2007;13(8):327-36. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.06.002

15. Rapizzi E, Donati C, Cencetti F, Nincheri P, Bruni P. Sphingosine 1-phosphate differentially regulates proliferation of C2C12 reserve cells and myoblasts. Molecular and cellular biochemistry. 2008;314(1):193-9. https://link.springer.com/article/10.1007/s11010-008-9780.

16. Asada S, Daitoku H, Matsuzaki H, Saito T, Sudo T, Mukai H, et al. Mitogen-activated protein kinases, Erk and p38, phosphorylate and regulate Foxo1. Cellular signalling. 2007;19(3):519-27. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.08.015

17. Banitalebi E, Gharekhanlo R, Ghatre Samani K, Parnow A, Mohammad Ameli M, Teimori H. Sphingosine-1-Phosphate: a Growth Factor in Hypertrophy following Resistance Training. Journal of Sport Biosciences. 2012;4(12):111-34. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.08.015

18. Kim RH, Takabe K, Milstien S, Spiegel S. Export and functions of sphingosine-1-phosphate. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. 2009;1791(7):692-6. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.02.011

19. Lahiri S, Futerman AH. The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids. Cellular and Molecular Life Sciences. 2007;64(17):2270-84. https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-007-7076-0.

20. Soleimani H, Talebi-Garakani E, Safarzade A. The effect of endurance training and whey protein consumption on levels of antioxidant enzymes and oxidative stress in the heart muscle of rats fed a high-fat diet. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology. 2018;13(2):1-10. http://nsft.sbmu.ac.ir/article-1-2462-en.

21. Mohammadnezhad G, Matin Homayi H, Ghazalian F. Effect of a 6-Week Resistance

Training Program on Transforming Growth Factor Beta-1 and Myostatin Genes Expression in Tendons of Extensor Digitorum Longus and Soleus Muscles in Rats. Journal of Arak University of Medical Sciences. 2020;23(1):82-91. http://dx.doi.org/10.32598/JAMS.23.1.5849.1

22. Gholipour M, Seifabadi M, Asad MR. Comparing the effects of endurance and resistance trainings on gene expression involved in protein synthesis and degradation signaling pathways of Wistar rat soleus muscle. Tehran University Medical Journal TUMS Publications. 2020;77(11):668-77. http://tumj.tums.ac.ir/article-1-10197-en.html

23. Padilha CS, Cella PS, Ribeiro AS, Voltarelli FA, Testa MT, Marinello PC, et al. Moderate vs high-load resistance training on muscular adaptations in rats. Life sciences. 2019;238:116964. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116964

24. Cordeiro AV, Silva VR, Pauli JR, da Silva AS, Cintra DE, Moura LP, et al. The role of sphingosine-1-phosphate in skeletal muscle: Physiology, mechanisms, and clinical perspectives. Journal of Cellular Physiology. 2019;234(7):10047-59. https://doi.org/10.1002/jcp.27870

25. Sapkota A, Gaire BP, Kang M-G, Choi JW. S1P2 contributes to microglial activation and M1 polarization following cerebral ischemia through ERK1/2 and JNK. Scientific reports. 2019;9(1):1-13.. https://doi.org/10.1021/acschemneuro.1c00153

26. Kassouf T, Sumara G. Impact of conventional and atypical MAPKs on the development of metabolic diseases. Biomolecules. 2020;10(9):1256. https://doi.org/10.3390/biom10091256

27. Schoenfeld BJ. Potential mechanisms for a role of metabolic stress in hypertrophic adaptations to resistance training. Sports medicine. 2013;43:179-94. https://link.springer.com/article/10.1007/s40279-013-0017-1

28. Sassoli C, Pierucci F, Zecchi-Orlandini S, Meacci E. Sphingosine 1-phosphate (S1P)/S1P receptor signaling and mechanotransduction: implications for intrinsic tissue repair/regeneration. International journal of molecular sciences. 2019;20(22):5545. https://doi.org/10.3390/ijms20225545

29. Ahmadi F. The Effect of resistance training and whey protein supplement on antioxidant status in overweight young men. Journal of Sport Biosciences. 2012;4(11):103-21. https://doi.org/10.22059/jsb.2012.24996

30. Pierucci F, Frati A, Battistini C, Matteini F, Iachini MC, Vestri A, et al. Involvement of released sphingosine 1-phosphate/sphingosine 1-phosphate receptor axis in skeletal muscle atrophy. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease. 2018;1864(12):3598-614. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.08.040