

# The effect of six weeks of resistance training with whey protein supplementation on S1P and gastrocnemius muscle hypertrophy in young male Wistar rats

Somaieh Jaafari motlagh<sup>1\*</sup>, Fereshteh Shahidi<sup>2</sup>, Majid Kashef<sup>3</sup>

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

<sup>1</sup> 0009-0007-7593-0287

<sup>2</sup> 0000-0001-6593-4435

<sup>3</sup> 0000-0001-8551-3371

## ABSTRACT

**Background and Aim:** Nowadays, increasing muscle mass and implementing methods to improve recovery after exercise have become particularly important. Resistance training plays a crucial role in muscle growth and hypertrophy. Consuming various supplements, such as whey protein, after resistance training can also aid this process. Among different factors, sphingosine-1-phosphate (S1P) has a structural role in regulation, cell differentiation, and hypertrophy. This factor can significantly contribute to hypertrophy through exercise and supplementation. Whey protein, when combined with resistance training, can enhance muscle protein synthesis, improve exercise performance, and aid recovery, especially in younger individuals. The aim of this study was to examine the effects of six weeks of resistance training combined with whey protein supplementation on S1P and muscle hypertrophy in the gastrocnemius muscle of young male Wistar rats.

**Materials and Methods:** In this experimental study, 23 male Wistar rats, aged eight weeks and weighing between 250 to 270 grams, were randomly divided into four groups: exercise + supplement, resistance training, sham, and control. They underwent a six-week training protocol consisting of five sessions per week, with three sets of five repetitions. The exercise involved climbing a one-meter ladder while carrying weight attached to their tail. In the exercise + supplement group, a whey protein supplement solution was also administered via gavage. The expression of the S1P gene was measured using Real-Time PCR, and muscle hypertrophy was assessed using a specialized scale. Data analysis included Shapiro-Wilk tests, one-way ANOVA, and Scheffé post hoc tests at a significance level of  $P \leq 0.05$ . Additionally, Prism software was used to plot the graphs.

**Results:** This study showed that the level of S1P increased, and on average, the level of this gene was higher in the exercise + supplement group. However, to assess statistical significance, a significant increase in S1P gene expression ( $P=0.0001$ ), muscle volume ( $P=0.016$ ), and 1RM ( $P=0.0001$ ) was observed between the exercise + supplement group and the exercise and sham groups. However, there was no significant difference in muscle volume increase between the exercise, sham exercise + supplement, and control groups ( $P=0.6$ ).

**Conclusion:** Based on the results of the present study, the significant difference observed in the exercise + supplement group compared to the other groups may be due to the effect of resistance training combined with whey protein supplementation on the increased expression of S1P and activation of the MAPK pathway, leading to increased weight and 1RM in the gastrocnemius muscle of young male Wistar rats. Therefore, it can be concluded that resistance training combined with whey protein consumption may have a synergistic effect on this pathway.

**Keywords:** resistance training, muscle weight, sphingosine-1-phosphate, whey protein

\*Corresponding Author's E-mail: somayejafarimotlagh@gmail.com

## اثر شش هفته تمرین مقاومتی با مکمل یاری پروتئین Whey بر S1P و هایپرتروفی عضله دو قلو رت های نر جوان نژاد ویستار

سمیه جعفری مطلق\*، فرشته شهیدی، مجید کاشف

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

### چکیده:

**سابقه و هدف:** امروزه افزایش حجم عضله و اجرای روشهایی جهت بهبود ریکاوری پس از تمرین از اهمیت ویژه ای برخوردار است. تمرینات مقاومتی از جمله تمریناتی هستند که نقش ویژه ای در افزایش حجم عضله و هایپرتروفی دارند. مصرف انواع مختلفی از مکملها همچون پروتئین وی پس از تمرین مقاومتی نیز می تواند به این عمل کمک کند. اما از میان عوامل مختلف، اسفنگوزین مونو فسفات نقش ساختاری در تنظیم، تمایز سلول و هایپرتروفی دارد و این فاکتور می تواند با تمرین و مصرف مکمل نقش مهمی در هایپرتروفی داشته باشد. پروتئین وی، نیز در ترکیب با تمرین مقاومتی می تواند سنتز پروتئین عضله، بهبود تمرین و ریکاوری در افراد جوانتر را افزایش دهد. هدف این مطالعه بررسی تاثیر شش هفته تمرین مقاومتی با مکمل یاری پروتئین Whey بر S1P و هایپرتروفی عضله دو قلو رت های نر جوان نژاد ویستار بود.

**مواد و روش ها:** در این پژوهش تجربی از ۲۳ سر رت محدوده وزنی ۲۵۰ تا ۲۷۰ گرم با سن هشت هفته استفاده شد که به صورت تصادفی در چهار گروه تمرین\_مکمل، تمرین مقاومتی، شم و کنترل تقسیم و به مدت شش هفته با پروتکل تمرینی پنج جلسه ای در سه ست و پنج تکرار به شکل بالارفتن از نردبان یک متری و حمل وزنه متصل به دم تمرین داده شدند، در گروه تمرین\_مکمل محلول مکمل پروتئین Whey نیز گاوژن شد. بیان ژن S1P به روش Real Time-PCR و هایپرتروفی عضله با ترازوی مخصوص اندازه گیری شد. در تحلیل داده ها از آزمون شاپیروویلک، واریانس یک راهه و تعقیبی شفه در سطح  $P \leq 0/05$  استفاده شد. همچنین جهت رسم نمودار از نرم افزار Prism استفاده گردید.

**یافته ها:** این پژوهش نشان داد که سطح S1P افزایش یافته است و به طور میانگین سطح این ژن در گروه تمرین به همراه مکمل بیشتر بود. اما به منظور بررسی معناداری، افزایش معنادار در بیان ژن S1P ( $P=0/001$ ) و حجم عضله ( $P=0/016$ ) و RM ۱ ( $P=0/001$ ) بین گروه های تمرین\_مکمل و تمرین و شم تمرین\_مکمل را نشان دادند، اما در بین گروه های تمرین و شم تمرین\_مکمل و کنترل در افزایش حجم عضله تفاوت معناداری وجود نداشت ( $P=0/6$ ).

**نتیجه گیری:** با توجه به نتیجه تحقیق حاضر امکان دارد که اختلاف معنادار در گروه تمرین\_مکمل با دیگر گروه ها حاصل از تاثیر تمرین مقاومتی با مکمل یاری پروتئین WHEY بر افزایش بیان S1P و فعال شدن مسیر MAPK در نتیجه افزایش وزن و 1 RM در عضله دو قلو رت های نر جوان نژاد ویستار بوده باشد. بنابراین می توان به این نتیجه رسید که تمرین مقاومتی به همراه مصرف پروتئین وی، می تواند تاثیر هم افزایی بر این مسیر داشته باشد.

## مقدمه

یکی از مسائل مهمی که ورزشکاران با آن مواجه هستند افزایش حجم و قدرت عضله و به دنبال آن بهبود عملکرد ورزشی است. انجام تمریناتی که از یک مقاومت خارجی در انقباض عضلات استفاده می‌شود و در شکل‌های متفاوتی مانند تمرین با وزن بدن، تمرین با کش و تمرین با وزنه آزاد قابل انجام است به عنوان مؤثرترین راه و روشی معمول با افزایش سنتز و تجزیه پروتئین در افزایش حجم عضله اسکلتی است (۱)، به طوریکه در مطالعه ام‌رویچ<sup>۱</sup> و همکاران (۲۰۰۹) در مقایسه تمرین برون‌گرا با تمرین درون‌گرا نشان داده شد که آزمودنی‌ها از تمرین برون‌گرا در افزایش قدرت و هایپرتروفی، بیشتر سود بردند (۲). همسو با این فراتحلیل، ماتیاس مولر<sup>۲</sup> و همکاران (۲۰۰۹) در تحقیقاتی مجزا نشان دادند که تمرین مقاومتی و به ویژه تمرین برون‌گرا بار مکانیکی بیشتری بر عضله وارد می‌کند (۳). اما علاوه بر استفاده از تمرینات قدرتی سنگین مصرف مکمل‌های تجاری به منظور دستیابی به ظاهر بدنی مناسب، کسب موفقیت و قدرت در ورزشکاران بخصوص مردان جوان افزایش یافته است (۴). صرف نظر از سن یا جنس، تمرینات مقاومتی به همراه تامین مقادیر کافی پروتئین رژیم غذایی یا اسیدهای آمینه ضروری می‌توانند سنتز پروتئین عضلانی در بزرگسالان سالم را افزایش دهند. مصرف ترکیبی PRO /EAA و تمرین بر مبنای مقاومتی می‌تواند تحریک بیشتر در افزایش سنتز پروتئین ماهیچه (MPS) ایجاد کند که باعث یک اثر آنابولیکی بیشتر از ورزش به اضافه کربوهیدرات هاست. در دو دهه اخیر به جهت پیشرفت عملکرد ورزشی مکمل‌های اسیدآمینه فراوانی پیشنهاد شده‌اند که بر تحریک هورمونی و بالا بردن تمرکز ذهنی و تمایل به اجرای بیشینه و کاهش شاخص‌های تخریب عضله و خستگی مؤثر بوده‌اند (۵). مکمل‌های کراتین، HMB و آب پنیر (پروتئین Whey) از جمله مکمل‌هایی هستند که مورد توجه ورزشکاران مختلف قرار گرفته‌اند و هیچ‌گونه ضرری برای افراد سالم ندارند. در تحقیق اسپیلن و همکاران (۲۰۰۹) نشان داده شده است که ترکیب مکمل کراتین و تمرین مقاومتی سنگین بر روی ترکیب بدنی، هایپرتروفی، قدرت و سطوح کراتین عضله را افزایش داده است (۶). همپنین در تحقیقات ناصری و همکاران (۱۳۹۸) بیان شده است که مصرف مکمل HMB بر افزایش حجم عضله موثر است (۷). یکی دیگر از این مکمل‌ها پروتئین Whey بوده که یک منبع غنی از کلسیم و دیگر مواد معدنی است و شامل غلظت زیادی از اسیدآمینه‌های ضروری به‌ویژه لوسین است و می‌تواند به شکل یک آنتی‌اکسیدان و یک منبع غنی ضد باکتری و ضد ویروس، ضد فشار خون، ضد تومور و کاهش دهنده چربی خون عمل کند (۸). در تحقیقات ناکلریو و سجویو (۲۰۱۹) اثرات مفید پروتئین Whey را در افزایش توده بدون چربی هنگامی که به عنوان بخشی از چند عنصر کربوهیدرات، کراتین مونوهیدرات و سایر منابع پروتئینی مانند کازئین حاوی آن، مصرف می‌شود بررسی شده است (۹). مصرف مداوم پروتئین WHEY به عنوان یک مکمل غذایی حاوی اسفنگولپید 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

- 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

به خوبی در سلول‌های مخاطی جذب می‌شوند و به شیلومیکرون تبدیل می‌شود، 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 (SIP) پلازما و عضله را افزایش می‌دهد (۱۰). توده عضلات اسکلتی در موارد پاتولوژیک؛ از قبیل بیماری کاشکسی (لاغری و نزاری) و یا بی‌اشتهایی عصبی و همچنین طی فرآیند پیری (سارکوپنیا) و یا روش زندگی از جمله قطع (بی‌حرکی) و یا کاهش (کم‌حرکی) فعالیت ورزشی در ورزشکاران، کاهش می‌یابد و در پی آن کم شدن قدرت عضلانی و اختلال در عملکرد جسمانی است که می‌تواند به ناتوانی و معلولیت منجر گردد (۱۱). از طرفی افزایش در توده عضله اسکلتی و مکانیسم‌های اصلی در حفظ این توده، مستلزم درگیری چندین مسیر سیگنالینگ است و مکانیسم مولکولی آن نیز از ارتباط بین مسیرهای مختلف سیگنالینگ که تحت شرایط فیزیولوژیکی، پیام‌های سنتز و تجزیه پروتئین عضله را بسیار دقیق و حساس کنترل می‌کند انجام می‌شود و نتیجه‌ی آن افزایش در تعداد رشته‌های میوزین، آکتین و افزایش در سارکوپلاسم و بافت همبند است (12). در بسیاری از فرایندهای پاتوفیزیولوژیک، مانند ساخت و تخریب عضله اسکلتی و سیستم عصبی عضلات اسفنگولیپیدها (SL) نقش درون یا برون سلولی دارند و شامل SIP و سرامیدها می‌شوند، لیپیدهای فعال زیستی ای که از نظر عملکردی در نقطه مقابل هم بوده و قادر به راه اندازی چندین مسیر پیام رسانی تنظیم و تعیین سرنوشت سلول هستند (۱۳). SIP دارای نقش دوگانه است، علاوه بر پاسخ دهی یا مقاومت در برابر انسولین می‌تواند اثرات سودمندی همچون مقاومت در برابر خستگی داشته باشد و همچنین با اثر بر کانال‌های کلسیمی و گیرنده‌های ریانودین منجر به تحریک و انقباض عضلانی شود (۱۴). همچنین به عنوان عاملی قوی در تمایز سلولی و در مسیر سیگنالی وابسته به پروتئین کیناز فعال شده توسط میتوزن (MAPK) معرفی شود (۱۵). تا به امروز صدها پروتئین کیناز شناخته شده است، که از معروف‌ترین آن‌ها خانواده بزرگ MAPK است و عملکردهای بسیاری را در سلول کنترل می‌کند. میتوزنها سیگنال‌هایی هستند که از بخش خارجی سلول، برای القای میتوز و تقسیم سلولی پیام را ارسال می‌کنند. همان‌طور که در تحقیقات مشخص شده است MAPK ذاتا بیان ژن را از طریق حداقل دو مکانیسم (۱) فسفوریلاسیون عوامل رونویسی و (۲) بازسازی کروماتین تعدیل می‌کند و تا به امروز، بسترهای متعددی از MAPK شناسایی شده‌اند (۱۶). از جمله چندین عوامل رونویسی در بیان ژن، آنزیم اسفنگوزین - ۱ - فسفات کیناز (SK) است (۱۷). SK آنزیمیست که از طریق فعال‌سازی داخل‌سلولی اسفنگوزین را به محصول SIP فسفوریله می‌کند است (۱۸). (۱۹) و به دو شکل (SK1, SK2) شناخته می‌شود، این دو آنزیم دارای نقش‌های متفاوت هستند، به طوریکه SK1 در رشد سلول و بقاء سلول نقش دارد و تحریک آن بر اثر تحریک سلول با فاکتورهای رشدی و سایتوکین‌ها صورت می‌گیرد و با انتقال از سیتوپلاسم به غشاء سیتوپلاسمی می‌رود، در حالی که SK2 منجر به توقف رشد سلول شده و افزایش مرگ برنامه‌ریزی شده سلول را به دنبال دارد و احتمالا SIP ترشح شده از سلول‌ها در این شرایط تولید می‌شود (۱۵).

با توجه به مطالب بیان شده هایپرتروفی به عنوان یک نیاز ورزشکاران در افزایش رشد، توان و کارایی عضلات اسکلتی و همچنین SIP با عملکرد وسیع و متنوع در سلول بعنوان یک عامل فعال کننده مسیرهای رشدی جدید عضله در تکثیر و بقای مزونژئوبلاست‌ها و یا بالعکس فعال کننده مسیر های مرگ برنامه ریزی شده سلول در بیماریها و ایجاد تومور مورد توجه پژوهشگر حاضر قرار گرفته و از آنجا که طبق بررسی‌های انجام شده تاکنون تحقیقی به بررسی آثار این لیپید بیواکتیو در مسیر رشد سلول‌های عضلانی و افزایش هایپرتروفی در مدت شش هفته نپرداخته، جهت یافتن پاسخی برای این سوال که استرس تمرین مقاومتی که در تحقیقات به عنوان یک فعال کننده مسیر هایپر

- 
- 1- Sphingosine-1-phosphate(SIP)
  - 2- cachexia
  - ۳- Mitogen-activated protein kinase(MAPK)

تروفی معرفی شده است چگونه می تواند تحت تاثیر پروتئین Whey بر SIP موثر باشد، پژوهش حاضر به بررسی تاثیر شش هفته تمرین مقاومتی با مکمل یاری پروتئین Whey بر SIP و هایپر تروفی عضله دو قلو رت های نر جوان نژاد ویستار به این ضرورت می پردازد.

## مواد و روش

پژوهش حاضر از نوع تجربی و از لحاظ هدف، توسعه ای و از لحاظ اجرا آزمایشگاهی با گروه تجربی و کنترل و شم است. ۲۳ رت هشت هفته ای با وزن تقریبی (۲۷۰-۲۵۰) گرم از آزمایشگاه سورن تهران خریداری شد و در یک اتاق با دمای ۱۸ تا ۲۳ درجه سانتی گراد رطوبت بین ۴۰ تا ۶۰ درصد و با یک دوره ۱۲ ساعت روز، ۱۲ ساعت شب در قفس های پلی کربنات در حیوان خانه آزمایشگاه دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی نگهداری شدند. رت ها دسترسی آزادانه به آب و غذا داشتند و غذای آنها از نوع فشرده و آماده مخصوص رت بوده و آب مصرفی نیز از آب شهری نگهداری شده است. رت ها بعد از دو هفته آشناسازی با محیط و پروتکل تمرین به صورت تصادفی در ۴ گروه کنترل (n=۳) گروه شم (n=۶)، گروه تمرین (n=۷) و گروه تمرین-مکمل (n=۷) قرار گرفتند.

پروتکل تمرین شامل دو هفته آماده سازی رت ها با محیط و روش اجرای تمرین و شش هفته تمرین مقاومتی به شکل بالا رفتن از نردبان یک متری با شیب ۸۵ در صد و میله هایی به فاصله دو سانتی متر موجود در آزمایشگاه حیوانات دانشگاه شهید رجایی بود که با حمل وزنه هایی درون کیسه های پارچه ای که با چسب نواری به دو سوم انتهای پروگزیمال دم رت ها متصل بود، انجام گرفت. سپس پروتکل تمرین مقاومتی به مدت شش هفته بر روی رت های گروه تمرین و تمرین-مکمل، از ساعت ۱۰ صبح تا ۱۶ عصر اجرا شد (روزهای استراحت دو شنبه ها و جمعه ها تعیین شد). رت ها در سه ست و استراحت دو دقیقه ای بین هر ست و پنج تکرار با یک دقیقه استراحت از نردبان بالا می رفتند و در صورت توقف با لمس دم تحریک به حرکت می شدند و همچنین گروه تمرین مکمل در مدت شش هفته تمرین، حدودا ۱۰ تا ۳۰ دقیقه بعد از هر جلسه تمرین به میزان ۲/۰۵ گرم پروتئین WHEY محصول شرکت اپتیوموم (GOLD STANDARD WHEY; Optimum USA., Inc, Nutritio) به صورت گاوآژ دریافت کرد. میزان دوز مکمل پروتئین WHEY مورد استفاده در این مطالعه و بر اساس دوز مصرفی توسط انسان نسبت سطح بدن و با استفاده از فرمول برآورد شده است. با فرض وزن انسان ۶۰ کیلوگرمی و دوز مصرفی معادل انسانی ۲۰ گرم برای یک فرد ۶۰ کیلوگرمی (۰/۳۳۳ گرم بر کیلوگرم وزن بدن)  $6/17 \times 0/333 = 2/05$  گرم بر کیلوگرم دوز مصرفی محاسبه و ضریب تبدیل ۶/۱۷ برای محاسبه تفاوت در سطح رویه بدن بین رت و انسان استفاده شد (۲۰).

تمام مراحل جراحی در یک جلسه انجام گرفت. موش ها ۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرین (برای از بین رفتن آثار حاد تمرین) از طریق تزریق کتامین (۷۵mg/kg) و زایلازین (۲۰mg/kg) بیهوش شدند. سپس عضله دو قلو از پای چپ خارج و نمونه عضله به سرعت در نیتروژن مایع فریز شده و به منظور آنالیزهای بعدی در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. از کیت شرکت سیناکلون، برای استخراج RNA استفاده شد. پروتکل استخراج به شرح زیر است: ۲۰۰ میکرولیتر از بافت هموژنیزه شده را در میکروتیوب ریخته و پس از آن ۴۰۰ میکرولیتر از محلول لیز کننده ۷ به آن اضافه و بلافاصله به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شد. ۳۰۰ میکرولیتر محلول Precipitation به آن اضافه نموده و ۱۰ بار میکروتیوب را سروته کرده تا خوب مخلوط شود. تمامی

مواد داخل میکروتیوب، به میکروتیوب حاوی ستون ۸ انتقال داده و به مدت یک دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ گردید. ستون را به یک میکروتیوب جدید انتقال داده و ۴۰۰ میکرولیتر از بافر شستشو دهنده I به آن اضافه نموده و به مدت یک دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ گردید. ستون را مجدداً به یک میکروتیوب جدید انتقال و ۴۰۰ میکرولیتر از بافر شستشو دهنده II به آن اضافه نموده و یک دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ می‌گردد. انتقال ستون به یک میکروتیوب جدید و سانتریفوژ به مدت دو دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ در دور برای خشک شدن کامل اتانول باقی‌مانده. انتقال ستون را به یک میکروتیوب استریل و بدون نوکلئوتید و اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر آب مقطر بدون RNase به ستون و قرار دادن پنج دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد، سپس سانتریفوژ با دور ۱۳۰۰۰ به مدت یک دقیقه. بررسی یک میکرولیتر از این RNA جهت تعیین خلوص RNA با دستگاه نانودراپ و نگهداری بقیه در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد تا زمان تهیه cDNA.

جدول ۱: توالی پرایمر بیان ژن S1P

بیان ژن	توالی پرایمر	شماره سریال کیت
S1P	R1: gagtgagcttgtagtggtg F1: tcatcgctccggcattacaacta	(5201Cat. No: RT9)

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

برای مشخص کردن توزیع طبیعی داده‌ها از آزمون شاپیروویلیک و لون و برای همگنی واریانس‌ها و بررسی تغییرات بین گروه‌ها از آزمون تعقیبی شفه در سطح معنا داری (P ≤ ۰/۰۵) توسط نرم افزار SPSS و جهت رسم نمودار از نرم افزار Prism استفاده شد.

## یافته‌ها

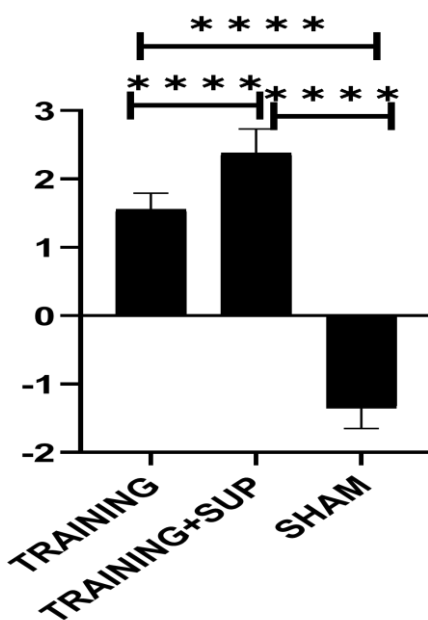
میانگین و انحراف معیار سن رت ها در ابتدا هشت هفته بود که در پایان تحقیق سن رت ها به حدود ۱۶ هفته رسید. میانگین و انحراف معیار متغیر وزن رت های گروه تمرین و تمرین-مکمل در پس آزمون نسبت به پیش آزمون بیشتر از گروه کنترل و شم تمرین-مکمل بوده است که تاثیر تمرین را نشان می دهد.

جدول شماره دو اندازه میانگین و انحراف معیار وزن عضله دوقلو رت ها را نشان داده است. همانطور که مشخص است افزایش در وزن عضله گروه تمرین-مکمل نسبت به گروه تمرین و شم تمرین-مکمل نشان دهنده تاثیر بالای تمرین با مکمل یاری پروتئین WHEY است.

جدول ۲: میانگین و انحراف معیار وزن عضله

گروه ها	تمرین-مکمل M ±SD	تمرین M ±SD	شم تمرین-مکمل M ±SD
وزن عضله پس از تمرین	۱/۱۵±۰/۰۴	۰/۹۶±۰/۱۳	۰/۸۷±۰/۱

نتایج آزمون آماری تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی شفه، نشان داد که وزن عضله در گروه تمرین-مکمل نسبت به گروه تمرین و شم افزایش داشته و این اختلاف معنادار بود. داده های حاصل از اندازه گیری وزن عضله دوقلو رت ها این افزایش در گروه تمرین-مکمل نسبت به دیگر گروه ها را تایید می کند (P = ۰/۰۱ و f = ۸/۸۲۲). (نمودار ۱)



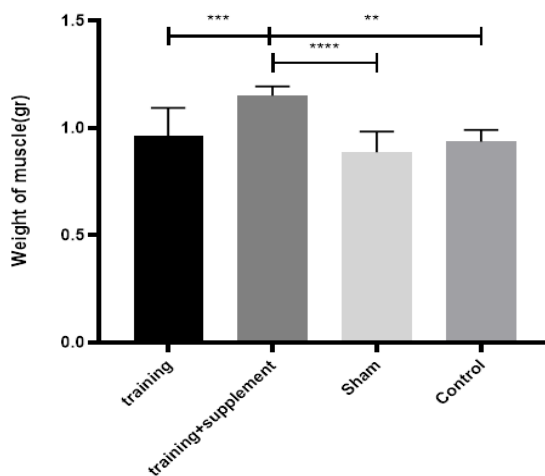
نمودار ۱: وزن عضله دو قلو بعد از تمرین

جدول شماره دو میانگین و انحراف معیار بیان ژن SIP در گروه‌های مختلف، پس از شش هفته تمرین مقاومتی با مکمل یاری پروتئین Whey را نشان می‌دهد. افزایش بیان ژن SIP در گروه تمرین-مکمل ( $2/38 \pm 0/34$ ) نسبت به گروه تمرین ( $1/56 \pm 0/22$ ) و شم تمرین-مکمل ( $-1/35 \pm 0/29$ ) نشان‌دهنده تاثیر بالای تمرین با مکمل یاری پروتئین WHEY است.

جدول ۲: میانگین و انحراف معیار بیان ژن SIP

گروه‌ها	تمرین-مکمل M $\pm$ SD	تمرین M $\pm$ SD	شم تمرین-مکمل M $\pm$ SD	متغیر
بیان ژن SIP	$0.34 \pm 0.28$	$1.56 \pm 0.22$	$-1.35 \pm 0.29$	

نتایج تحلیل واریانس یک راهه (One way) پژوهش حاضر نشان داد که بیان ژن SIP پس از تمرین با مکمل یاری پروتئین Whey در گروه تمرین-مکمل نسبت به گروه تمرین و گروه تمرین نسبت به شم تمرین-مکمل افزایش یافته است ( $P = 0/0001$ ) و ( $f = 249/7$ ) (نمودار ۲).



نمودار ۲: بیان ژن SIP

## بحث و نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد پس از شش هفته تمرین مقاومتی با مکمل یاری پروتئین WHEY به طور معناداری بیان ژن SIP در گروه تمرین-مکمل نسبت به دیگر گروه‌ها و وزن عضله دوقلو رت‌های گروه تمرین و تمرین-مکمل نسبت به گروه شم تمرین-مکمل و کنترل افزایش یافته است. لذا هایپرتروفی عضلات این رت‌ها در پژوهش مشهود است. همسو با تحقیق حاضر نتایج مشابه تاثیر تمرین مقاومتی در تحقیقات امانی و میردار (۱۴۰۰) با استفاده از یک برنامه تمرینی هشت هفته‌ای مقاومتی محمد نژاد و همکاران (۲۰۲۰) با بررسی تاثیر شش هفته تمرین مقاومتی بر روی رت‌های هشت هفته‌ای نر نژاد ویستار در مسیر رشد عضله مشخص شد که یک برنامه تمرینی با شدت و حجم تمرین موثر مشابه تعداد هفته‌های بالاتر از شش هفته خواهد بود (۲۱). قلی‌پور و همکاران (۱۳۹۸) همسو با این پژوهش در یک پروتکل تمرین مقاومتی مشابه پژوهش حاضر و تمرین استقامتی در هشت هفته تمرین بر روی ۲۴ رت هشت هفته‌ای دریافتند که پروتکل‌های ورزشی کنونی آثار کمابیش یکسانی بر تغییرات بیان ژن‌های درگیر مسیر سنتز و تجزیه پروتئین دارند (۲۲). نتایج بررسی‌های کامیلا و همکارانش (۲۰۱۹) بر روی ۲۰ سر رت با پروتکل تمرینی شش هفته‌ای نیز نشان می‌دهد که هر دو نوع تمرین مقاومتی با شدت بالا و شدت متوسط باعث ایجاد هایپرتروفی عضلانی و افزایش آن می‌شوند. به نظر می‌رسد که تمرین مقاومتی با شدت متوسط به دلیل افزایش حجم تمرین و مقایسه اندازه ۹۰٪-۳۰٪ 1 RM در این پژوهش و پژوهش دیگران، از هایپرتروفی تارهای کند انقباض حمایت می‌کند (۲۳). از آنجا که SIP به عنوان یک واسطه خارج سلولی در کنترل تحریک پذیری سلول با اتصال به G پروتئینها، گیرنده‌های موجود در غشا (که SIP1(EDG-1)، SIP2(EDG-5)، SIP3(EDG-3)، SIP4(EDG-6)، SIP5(EDG-8) نام دارند)، به صورت پیام رسان اولیه و پیام رسان ثانویه عمل می‌کند، موجب فعالیت آنها می‌شود (۲۴). آثار سیگنالی SIP از طریق فعال سازی فسفولیپاز C، تحریک  $Ca^{2+}$ ، فعال سازی ERK1/2، JNK، Akt، Rho، Rac و MAPK، PI3Kinase و دیگر واسطه‌های پایین‌رونده تعدیل شده و با افزایش جریان کلسیم درون سلولی موجب مهار تجمع cAMP می‌شود (۲۵). مسیر سیگنالی سنتز پروتئین JNK، PI3K/AKT در مسیر آبخاری وابسته به گیرنده فاکتورهای رشدی فعال بوده که ضمن غیرفعال کردن عوامل تجزیه پروتئین، در نهایت منجر به فعال شدن mTORC1 می‌شود (۲۶). این مولکول از طریق فسفریله کردن و فعال کردن P70S6K (Rps6kb1) باعث افزایش بیان پروتئین‌های تنظیمی سیکل سلولی می‌گردد. گرجیک و شوئنفلد (۲۰۱۸)، کوردیرو و همکاران (۲۰۱۸) در تحقیقاتی مروری بیان کردند که شواهدی وجود دارد مبنی بر اینکه تمرینات با زمان کم و بار زیاد ممکن است واقعاً اثرات هایپرتروفی تار عضلانی متفاوتی ایجاد کند (۲۷) و این اثر تحت تاثیر نقش SIP در کنترل اعمال حیاتی سلول در رشد و بقا قرار می‌گیرد. با توجه به نتایج تحقیقات ساسولی و همکاران (۲۰۱۹) همسو با پژوهش حاضر در بررسی نقش SIP عضله به عنوان یک عامل تغذیه‌ای و سیگنالینگ در ماهیچه اسکلتی نیز می‌توان گفت فعالیت ورزشی بخصوص تمرین مقاومتی با ایجاد تغییر در تعداد و عملکرد

پلاکت ها و فعالسازی مسیر آبشاری MAPK می تواند بر افزایش بیان ژن SIP عضلات موثر باشد و تحت تاثیر این فاکتور رشدی هایپرتروفی نیز اتفاق خواهد افتاد (۲۸). مطالعه‌ای یافت نشد که اثر همزمان تمرین مقاومتی و مکمل یاری پروتئین WHEY را بر بیان ژن SIP و هایپرتروفی عضله دوقلو بررسی کرده باشد؛ اما نتایج پژوهش حاضر مبنی بر اثرگذاری تمرین مقاومتی بر افزایش بیان ژن SIP عضله در گروه تمرین و تمرین-مکمل نسبت به گروه شم تمرین-مکمل نا همسو با تحقیق احمدی کانی و همکاران (۱۳۹۱) که نشان داده شده بود مکمل یاری پروتئین WHEY برای تغییرات ترکیب بدنی و قدرت ضروری نیست بوده که ممکن است به دلیل تفاوت در نوع آزمودنی‌ها که مردان جوان تمرین نکرده بوده و همچنین شدت تمرینات باشد (۲۹). تحقیقات بنی طالبی و همکاران (۱۳۹۰) در بررسی تاثیر تمرین مقاومتی بر SIP نشان داد که افزایش میزان سطح SIP پلاسمایی و بافتی عضلات تند و کند انقباض بیان می‌کند که پاسخ تمرین مقاومتی می‌تواند نسبت به نوع تار عضله ویژه باشد (۱۷)، پیروچی و همکاران (۲۰۱۸) نیز نشان دادند که افزایش میزان فسفوریلاسیون و تولید SIP و کاهش تجزیه این لیپید به عنوان یک واسطه خارج سلولی موجب افزایش رشد عضلات (هایپرتروفی)، کنترل و تعدیل عملکردهای سلولی می‌شوند است (۳۰) با توجه به این نتایج و یافته‌های پژوهش حاضر در بررسی همزمان تاثیر تمرین مقاومتی با مکمل یاری پروتئین WHEY دریافتیم که تمرین مقاومتی با مکمل یاری پروتئین WHEY منجر به افزایش سنتز پروتئین و فعالیت سلول از طریق مسیرهای سیگنالی وابسته به MAPK شده‌اند. SIP با تاثیر بر افزایش فعالیت کانال‌های کلسیمی انقباض و تحریک عضله، افزایش رو نویسی و سنتز پروتئین را به دنبال داشته که در تحلیل داده‌های بافت گروه تمرین و تمرین-مکمل نسبت به گروه شم تمرین-مکمل به طور واضح مشهود و افزایش هایپرتروفی در این گروه ها با توجه به نتایج داده‌های وزن عضله مورد تائید قرار گرفتند. به طور کلی افزایش معنادار بیان ژن SIP عضله گروه تمرین-مکمل نسبت به گروه تمرین و شم تمرین-مکمل بیانگر آن است که تمرین مقاومتی با مکمل یاری پروتئین WHEY اثر بیشتری نسبت به تمرین مقاومتی به تنهایی بر بیان ژن SIP عضله داشته است.

در پژوهش حاضر، بیان آنزیم‌ها و گیرنده‌های SIP بررسی نشده است؛ بنابراین، پیشنهاد می‌شود که پژوهش‌های آتی این موضوع را مدنظر قرار دهند و فعالیت آنزیم‌های SIP و بیان آنها را به صورت همزمان بررسی کنند.

**پیام مقاله:** با توجه به تاثیر تمرین مقاومتی با مکمل یاری پروتئین WHEY بر افزایش بیان ژن SIP در مسیر افزایش حجم و وزن عضله استفاده از تمرین مقاومتی به همراه مصرف مکمل پروتئین WHEY پیشنهاد می‌شود.

این مقاله پژوهشی از نتایج انجام کار پایان نامه است که به صورت گروهی انجام شد.

**ملاحظات اخلاقی:** پژوهش حاضر 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.

1. Mohammadnezhad G, Matin Homae 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.
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.
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;107.5۳-۱۴۵:(۲)
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.
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.
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.
7. Amiri N, Matinhomae H, Peeri M, Azarbaielani M. The effect of 6 weeks eccentric training and HMB supplement on p70s6k expression of the adult male rats. *Medical Journal of Mashhad University of Medical Sciences*. 2019;62.(۵)
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.
9. Naclerio F, Seijo M. Whey protein supplementation and muscle mass :current perspectives. *Nutrition and Dietary Supplements*. 2019;2019(11):37-48.
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.
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.
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*. 2010.۱۱-۱:(۱)۷;
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.
14. Zeidan YH, Hannun YA. Translational aspects of sphingolipid metabolism. *Trends in molecular medicine*. 2007;13(8):327-36.
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.
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.
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.
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.
19. Lahiri S, Futerman AH. The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2007;64(17):2270-84.
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.
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.

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.
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.
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.
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;9.۱۳-۱:(۱)
26. Kassouf T, Sumara G. Impact of conventional and atypical MAPKs on the development of metabolic diseases. *Biomolecules*. 2020;10(9):1256.
27. Schoenfeld BJ. Potential mechanisms for a role of metabolic stress in hypertrophic adaptations to resistance training. *Sports medicine*. 2013;43:179-94.
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.
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.
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.