

بررسی تاثیر تمرینات ورزشی هوازی بر افراد دارای اضافه وزن نوجوان با مطالعه‌ی شبکه‌ی برهم کنش پروتئین - پروتئین

پوران مروتی^۱، وحید منصوری^۲، اسماء محمدی^۳، دکتر مصطفی رضایی طاویرانی^۴، اکرم صفائی^۵، سعید حسامی تکلو^۶، مونا زمانیان عضدی^۷

۱) کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده علوم پزشکی آبادان، آبادان، ایران، ۲) مرکز تحقیقات فیزیوتراپی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، ۳) دانشکده علوم پزشکی آبادان، آبادان، ایران، ۴) مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، ۵) دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، تهران، ایران، نشانی مکاتبه‌ی نویسنده‌ی مسئول: تهران، خیابان دربند، دانشکده‌ی پیراپزشکی، مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دکتر مصطفی رضایی طاویرانی؛ e-mail: tavirany@yahoo.com

چکیده

مقدمه: با افزایش وزن احتمال ابتلا به بیماری‌های قلبی مختلف افزایش می‌یابد. ورزش در مهار چاقی موثر است، اما مکانیسم مولکولی این اثر به خوبی شناخته نشده است. در این مطالعه، تغییر بیان پروتئین‌های کلیدی در افراد دارای اضافه وزن بعد از انجام تمرینات ورزشی هوازی، شناسایی و رتبه‌بندی و تحلیل شد. مواد و روش‌ها: پروتئین‌های تغییر بیان یافته در عضله اسکلتی نوجوانان دارای اضافه وزن (گزارش شده در سال ۲۰۱۴)، در شبکه‌ی برهم‌کنش پروتئینی با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape تحلیل شدند. عناصر کلیدی معرفی و فرایندهای زیستی مرتبط با خوشه‌های پروتئینی شناسایی و تحلیل شدند. یافته‌ها: بیان هفت ژن کلیدی پس از انجام تمرینات ورزشی تغییر یافت. دو خوشه‌ی ژنی مهم و فرایند زیستی NAD Metabolic process وابسته به این دو خوشه معرفی شدند. عناصر خوشه‌ی اول به ۳۰ فرایند مهم زیستی مرتبط هستند که متابولیسم قندها و نوکلئوتیدها را کنترل می‌کنند. نتیجه‌گیری: تعداد هفت ژن کلیدی با ضریب تاثیر متفاوت، در نوجوان مبتلا به چاقی تغییر بیان می‌یابند. ژن PKM به عنوان کلیدی‌ترین ژن نقش مهمی در فعال‌سازی پیرووات ایفا می‌کند. PKG1 از طریق تحلیل شبکه شناسایی و معرفی شد. با توجه به این که اهمیت هر کدام از این ژن‌ها مشخص و رتبه معینی دریافت کرده‌اند و فرایندهای مرتبط نیز شناسایی شده‌اند، امکان انجام مطالعات دارویی به منظور معرفی اهداف دارویی احتمالی در معالجه‌ی چاقی فراهم آمده است.

واژگان کلیدی: اضافه وزن، فعالیت ورزشی، شبکه تعامل پروتئینی

دریافت مقاله: ۹۶/۲/۳ - دریافت اصلاحیه: ۹۶/۵/۳۱ - پذیرش مقاله: ۹۶/۶/۶

مقدمه

شیوه‌ی زندگی و کاهش فعالیت بدنی منجر به افزایش وزن می‌شود. ماهیچه‌های اسکلتی افراد چاق انعطاف‌پذیری کمی دارند و با افزایش توده‌ی چربی در بدن، احتمال مقاومت به انسولین بالا می‌رود.^۱ غنی کردن مواد غذایی با عوامل چاق‌کننده از عوامل اصلی شیوع بالای چاقی است.^۲ این اختلال تغذیه‌ای، زمینه‌ساز بیماری‌های قلبی و عروقی،^۳ دیابت نوع دوم^۴ و انواع مشخصی از سرطان‌ها^{۵،۶} است. عواملی که می‌توانند سبب بروز این عارضه شوند، شامل

رژیم غذایی نامناسب سرشار از مواد قندی و چربی، کم‌ترکی و عوامل ژنتیکی هستند.^{۷،۸} با انجام تمرینات ورزشی، مواد قندی و چربی در میتوکندری سلول‌های ماهیچه‌های اسکلتی مصرف می‌شوند. انجام تمرینات ورزشی، روی تنظیم متابولیسم بدن و کاهش وزن موثر است و در نتیجه می‌تواند موجب بهبودی در بیماران مبتلا به دیابت، افراد دچار چاقی مفرط^۹ و کودکان با مقاومت به انسولین^{۱۰} شود. نتایج مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که تغییرات بیوشیمیایی در این دسته از افراد اتفاق می‌افتند.^{۱۱،۱۲} انجام پژوهش‌های تکمیلی، از طریق شناخت مسیرهای زیستی و

تاکنون ورزشی منطبق بر توانمندی افراد چاق در انجام فعالیت‌های ورزشی ارائه نشده و استقبال افراد چاق از ورزش جایگاه خود را پیدا نکرده است. رفع این نقیصه، مستلزم درک مکانیسم‌های مولکولی فرایند جهت تبیین پروتکل‌های مناسب ورزشی است. در این مطالعه، تعدادی پروتئین پیشنهاد شده‌اند که مرتبط با فعالیت ورزشی در افراد دارای اضافه وزن نوجوان هستند. با استفاده از شبکه‌ی تعامل پروتئینی، ارتباطات پروتئین‌های تغییر یافته در افراد دارای اضافه وزن نوجوان بعد از ورزش، ارزشیابی و به ترتیب اهمیت نقش، غربالگری شدند تا مهم‌ترین آن‌ها تعیین و برای بررسی‌های بیشتر معرفی شوند.

مواد و روش‌ها

طی مطالعه‌ی پروتئومیکی ماسیاس سروانتهⁱ که روی نمونه (تقریباً ۲۰۰ میلی‌گرم) بافت عضلانی افراد دارای اضافه وزن نوجوان بعد از تمرینات ورزشی هوازی انجام شد، پروتئین‌های تغییر بیان یافته مشخص شدند (جدول ۱).^{۲۱} با استفاده از نرم‌افزار سایتواسکیپⁱⁱ، شبکه برهم کنش پروتئین-پروتئین برای این پروتئین‌ها رسم شد.^{۲۲}

جدول ۱- پروتئین‌های تغییر بیان یافته در بافت ماهیچه‌ی افراد دارای اضافه وزن، بعد از انجام تمرینات ورزشی براساس مطالعه‌ی ماسیاس سروانته^{۲۱}

| نام پروتئین | ردیف |
|--|------|
| Adenylate kinase isoenzyme 1 | ۱ |
| Triosephosphate isomerase 1 | ۲ |
| Carbonic anhydrase 3 | ۳ |
| L-lactate dehydrogenase A chain | ۴ |
| Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | ۵ |
| Fructose-bisphosphate aldolase A | ۶ |
| Creatine kinase M-type | ۷ |
| Beta-enolase | ۸ |
| Pyruvate kinase muscle isozyme | ۹ |
| ATP synthase subunit beta, mitochondrial | ۱۰ |

بررسی قرار گرفتند. دو شاخص مرکزی مهم که در این مطالعه برای شناسایی عناصر کلیدی شبکه مورد استفاده قرار گرفتند، درجه و بینابینی (betweenness) بودند. توزیع درجه و بینابینی برای گره‌های مختلف شبکه، امکان تشخیص عناصر کلیدی شبکه را فراهم کرد.^{۲۳} MCODE یکی دیگر از الگوریتم‌های سایتواسکیپ است که روش مفیدی برای شناسایی مناطق پرتراکم و متعامل شبکه (موسوم به خوشه) است.^{۲۴} با استفاده از این الگوریتم، خوشه‌های معتبر شبکه

بیوماکرهای مرتبط برای درک بهتر مکانیسم تغییرات سیستماتیک بیماری ضروری است.^{۱۶-۱۳} بررسی تعاملات ژنی منجر به شناخت بهتری از رفتار و تعامل مولکول‌های درگیر در فرایندهای مختلف و سلسله مراتب تاثیرگذاری ژن‌ها می‌شود. ژن‌های مرتبط در ساختار یک شبکه سازمان‌دهی و با بررسی اهمیت هرکدام از ژن‌ها در تشکیل و حفظ شبکه، ژن‌ها رتبه‌بندی می‌شوند. شاخص‌های مورد نیاز برای این رتبه‌بندی می‌توانند شاخص‌های مرکزی شبکه باشند.^{۱۹-۱۶، ۱۴} اخیراً تجزیه و تحلیل شبکه‌ی حاصل از مجموعه‌ی داده‌های ژنومیک، ترانسکریپتومیک و پروتئومیک به عنوان روش قدرتمندی در بررسی بیماری‌های مختلف، توجه بسیاری از محققین را به خود جلب کرده است.^{۲۰} مولکول‌هایی که از نظر خصوصیات مرکزی شبکه، رتبه بالاتری نسبت به سایر مولکول‌ها دارا هستند، می‌توانند اهمیت بیشتری در تغییر فنوتیپ انواع شرایط خاص و انواع بیماری‌ها داشته باشند. همان‌طور که اشاره شد، چاقی منشا بسیاری از بیماری‌ها، مانند دیابت، بیماری‌های قلبی و عروقی و سرطان شناخته شده است و ورزش در درمان چاقی می‌تواند موثر باشد؛ به هر حال، علی‌رغم مطالعات گسترده

پروتئین مورد نظر وارد نرم‌افزار سایتواسکیپ شد و با انتخاب بانک‌های اطلاعاتی از قبیل راکتومⁱⁱⁱ و مینت ژن‌های مرتبط با این ژن‌ها جستجو و شبکه‌ی نهایی رسم شد. این نرم‌افزار، اطلاعات برهم کنش مرتبط با پروتئین‌های مورد پژوهش را استخراج می‌کند و در قالب یک شبکه‌ی برهم کنش پروتئینی معرفی می‌کند. توسط نتورک آنالیزر که یکی از زیر مجموعه‌های نرم‌افزار سایتواسکیپ است توپولوژی شبکه تحلیل شد و گره‌ها براساس شاخص‌های مرکزی مورد

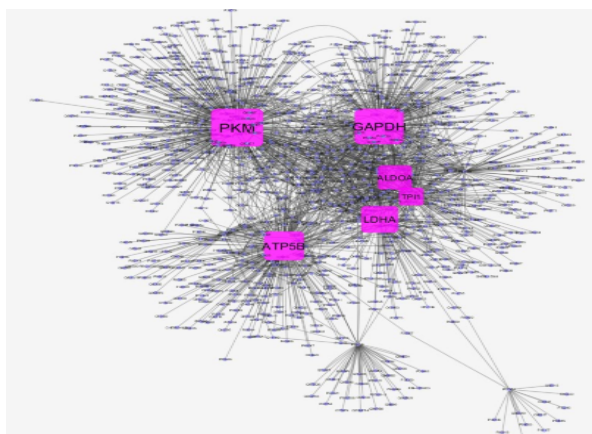
i- Macias Cervante

ii- Cytoscape(<http://cytoscape.org>)

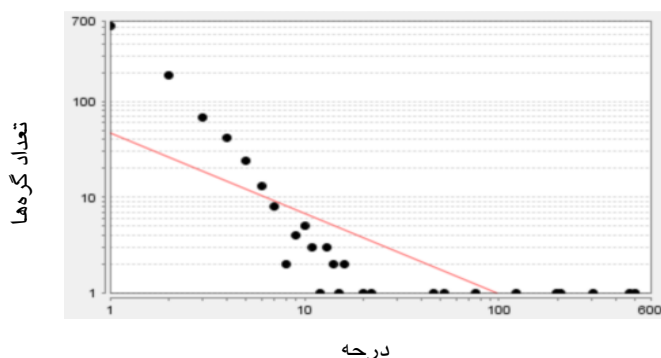
iii- Reactome

iv- MINT

v. Network Analyzer



شکل ۱- شبکه‌ی برهمکنش پروتئین-پروتئین برای پروتئین‌های تغییر بیان یافته در بافت ماهیچه نوجوانان دارای اضافه وزن بعد از انجام تمرینات ورزشی نشان داده شده است. این شبکه شامل ۹۹۹ گره و ۱۹۳۵ یال است. در تصویر، PKM, GAPDH, ATP5B, LDHA, ALDOA, TPI1 که به دنبال تجزیه و تحلیل‌های بعدی به عنوان پروتئین‌های کلیدی شبکه معرفی شدند، با رنگ بنفش نشان داده شده‌اند. پروتئین‌هایی که درجه بالاتری دارند، با مربع بزرگ‌تری مشخص شده‌اند.



شکل ۲- توزیع درجه برای گره‌های شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین نمایش داده شده در شکل ۱.

در یک نمودار $G(V, E)$ با n رأس، بینایی $C_B(v)$ رأس v به شکل زیر تعریف می‌شود:

$$C_B(v) = \sum_{s \neq v, t \in V} \frac{\sigma_{st}(v)}{\sigma_{st}}$$

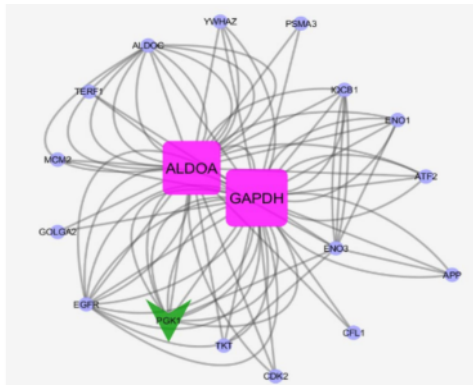
که σ_{st} تعداد کوتاه‌ترین مسیرها از s تا t است و $\sigma_{st}(v)$ تعداد کوتاه‌ترین مسیرها از s تا t است که از رأس v می‌گذرند. گره‌های دارای بینایی بالاتر، روی کوتاه‌ترین مسیرهای داخل شبکه قرار می‌گیرند. در شکل ۲ توزیع بینایی برای گره‌های شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین در شکل ۱ نمایش داده شده است.

شناسایی شدند. پارامترهای در نظر گرفته برای MCODE شامل Degree Cutoff: 2, Node Score Cutoff: 0.2 و Max Depth: 100 بودند. برای شناسایی فرایندهای زیستی مرتبط با پروتئین‌های مورد نظر (هستی‌شناسی ژنی)، از الگوریتم CLUGO استفاده شد.^{۲۶} با لحاظ $P < 0.05$ ، حضور حداقل شش ژن در فرایند مورد نظر و نیز حداقل ۳ درصد مشارکت این ژن‌ها در فرایند مورد نظر، فرایندهای زیستی انتخاب شدند. در یکی از موارد که فرایندهای محدودی معرفی شدند، حضور حداقل سه ژن در یک فرایند اعمال شد. از آزمون بنفرونی برای تصحیح P-Value استفاده شد.

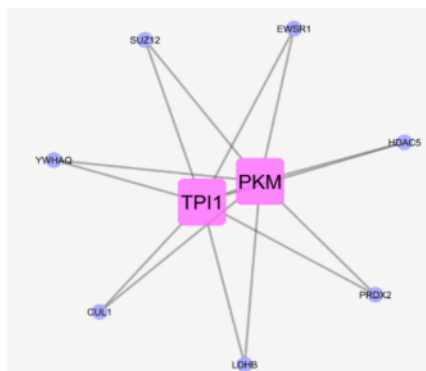
یافته‌ها

شبکه‌ی برهمکنش پروتئین-پروتئین برای پروتئین‌های تغییر بیان یافته در بافت ماهیچه نوجوانان دارای اضافه وزن بعد از انجام تمرینات ورزشی در شکل ۱ نشان داده شده است. این شبکه شامل ۹۹۹ گره و ۱۹۳۵ یال است که توسط نرم‌افزار سیتواسکیپ برای تجسم شبکه‌های تعامل مولکولی رسم شد. این ابزار در ارتباط با پایگاه‌های داده‌ی بزرگ داده‌های تظاهر ژن و تعاملات پروتئین-پروتئین، پروتئین-DNA و تعاملات ژنتیکی که به شکل فزاینده برای انسان و ارگانیسم‌های مدل در دسترس هستند، بیشترین کاربرد را دارد. سیتواسکیپ از چندین الگوریتم برای طرح‌های شبکه، پشتیبانی می‌کند. چندین پلاگین (plug-in) برای سیتواسکیپ جهت گسترش قابلیت‌های آن وجود دارد. مثال برجسته آن، پلاگین نتورک آنالایزر است که از آن می‌توان برای محاسبه‌ی پارامترهای مختلف شبکه استفاده کرد. توزیع درجه و بینایی، پارامترهای مهمی است که توسط نتورک آنالایزر برای هر پروتئین در این مطالعه محاسبه شدند. توزیع درجه و بینایی برای گره‌های شبکه به ترتیب در شکل‌های ۲ و ۳ ارائه شده است. با توجه به خطوط ترسیم شده در این شکل‌ها شش گره دارای بیشترین مقدار درجه و بینایی، به عنوان عناصر کلیدی شبکه معرفی شدند (جدول ۲ و شکل ۱).

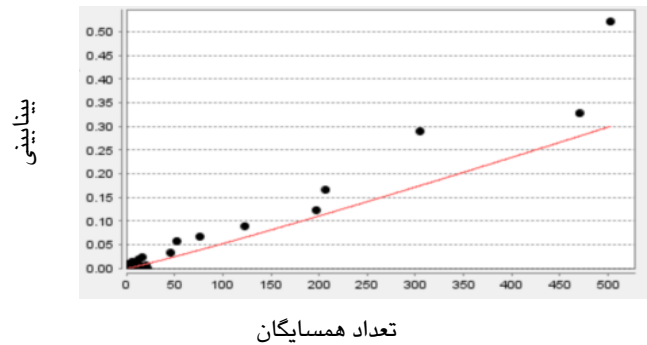
شده‌اند. تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی (GO) برای ژن‌های خوشه و ۱، ۲، براساس فرایندهای زیستی با لحاظ $P < 0.05$ انجام شد. حضور حداقل شش ژن در فرایند مورد نظر و نیز حداقل ۳ درصد مشارکت این ژن‌ها در فرایند مربوط، فرایندهای زیستی انتخاب شدند. از آزمون بنفرونی برای تصحیح P-Value استفاده شد.



شکل ۴- خوشه ۱، پروتئین‌های کلیدی در این خوشه با مربع بنفش نشان داده شده‌اند. پروتئین فسفولیسرات کیناز-۱ کد شده توسط PKG1 که در خوشه ۱، seed است، با رنگ سبز نمایش داده شده است.



شکل ۵- خوشه ۲، پروتئین‌های کلیدی در این خوشه با مربع بنفش نشان داده شده‌اند. این خوشه فاقد seed است.



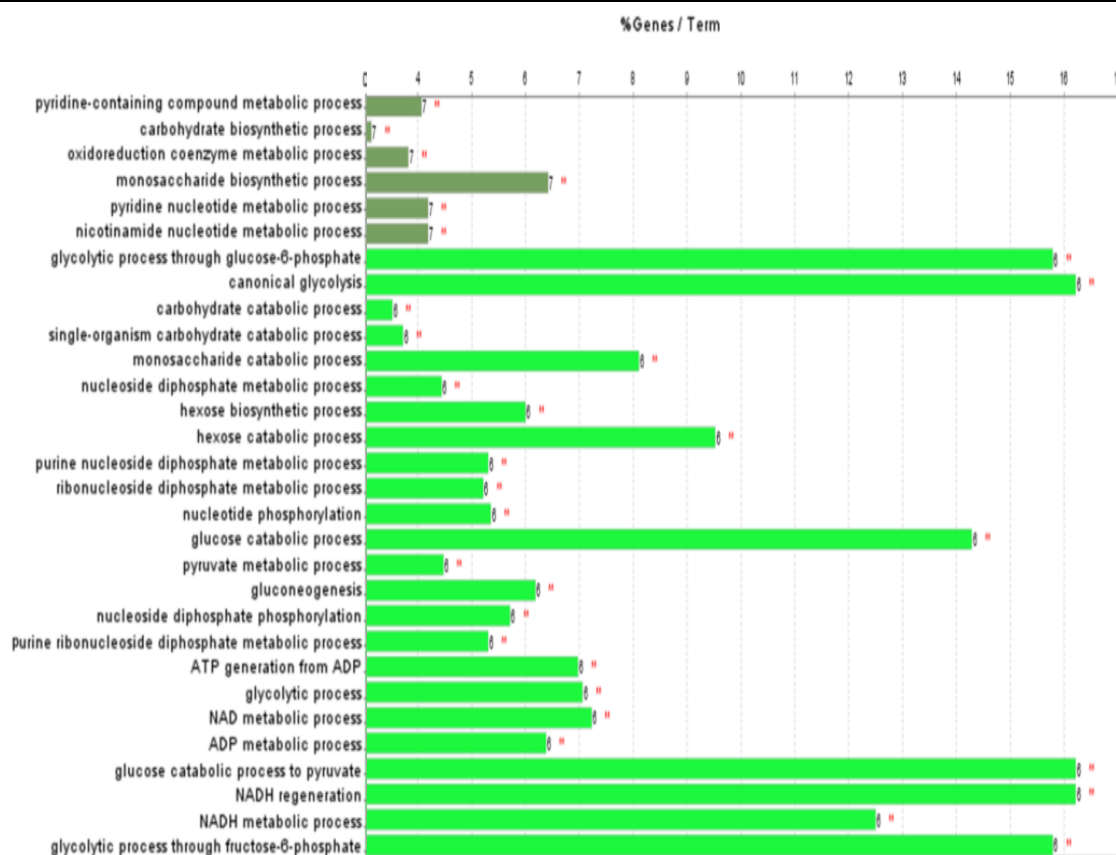
شکل ۳- توزیع بینابینی برای گره‌های شبکه برهمکنش پروتئین- پروتئین نمایش داده شده در شکل ۱.

توزیع بینابینی برای پروتئین‌های کلیدی در شبکه‌ی پروتئین‌های TPI1 به عنوان پروتئین‌های کلیدی در شبکه‌ی پروتئین‌های تغییر بیان یافته در بافت ماهیچه نوجوانان دارای اضافه وزن بعد از انجام تمرینات ورزشی، معرفی شدند (جدول ۲).

جدول ۲- پروتئین‌های کلیدی برای شبکه‌ی برهمکنش پروتئین- پروتئین

| نام ژن | درجه | بینابینی |
|--------|------|----------|
| PKM | ۵۰۲ | ۰/۵۲۱۲۲۹ |
| GAPDH | ۴۷۰ | ۰/۳۲۷۶۹۳ |
| ATP5B | ۲۰۵ | ۰/۲۹۰۳۴۰ |
| LDHA | ۲۰۷ | ۰/۱۶۵۸۱۸ |
| ALDOA | ۱۹۷ | ۰/۱۲۳۹۵۷ |
| TPI1 | ۱۲۳ | ۰/۰۹۲۳۱۴ |

برای شناسایی مناطق پرتراکم شبکه (موسوم به خوشه) از MCODE استفاده شد. دو خوشه (module 1 و module 2) برای شبکه برهمکنش پروتئین- پروتئین شناسایی شدند (شکل‌های ۴ و ۵). پروتئین seed، پروتئینی است که بیشترین امتیاز تعاملی را در هر خوشه دارد که با مثلث سبز رنگ نشان داده شده است. پروتئین فسفولیسرات کیناز-۱ در خوشه‌ی ۱ به عنوان seed معرفی شده است. خوشه ۲ فاقد seed است. فرایندهای زیستی برای خوشه‌های ۱ و ۲ به ترتیب در شکل‌های ۶ تا ۷ نشان داده



شکل ۶- تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی (GO) برای ژن‌های خوشه ۱، براساس فرایندهای زیستی. با لحاظ $P < 0.05$ حضور حداقل شش ژن در فرایند مورد نظر و نیز حداقل ۳ درصد مشارکت این ژن‌ها در فرایند مربوط. فرایندهای زیستی انتخاب شدند. از آزمون بنفرونی برای تصحیح P-Value برای گروه‌بندی فرایندها استفاده شد.



شکل ۷- تجزیه و تحلیل آنالیز هستی‌شناسی (GO) برای ژن‌های خوشه ۲، براساس فرایندهای زیستی. با لحاظ $P < 0.05$ حضور حداقل سه ژن در فرایند مورد نظر و نیز حداقل ۳ درصد مشارکت این ژن‌ها در فرایند مورد نظر.

بحث

ومصرفی مرتبط است.^{۲۷} اگر همه عوامل مرتبط با چاقی در جهت تنظیم تعادل انرژی مورد بررسی قرار گیرند، مدیریت بیماری آسان‌تر می‌شود.^{۲۸} بررسی شبکه‌ی پروتئینی و الگوریتم‌های کاربردی تجزیه و تحلیل شبکه می‌تواند بینش نوینی را در ارتباط با مبانی مولکولی بیماری‌های پیچیده‌ای نظیر اختلالات اضافه وزن مطرح کند.^{۲۹} بررسی پروتئومیک اطلاعات مفیدی را در ارتباط با تغییرات ژنوم در سطح بیان پروتئینی فراهم می‌کند. پروتئین‌هایی که در شرایط خاص، تغییر بیان محسوسی پیدا می‌کنند، می‌توانند از نظر الگوی تعامل در یک سیستم ارتباطی مولکولی مورد بررسی قرار گیرند.^{۱۵} در این راستا، بررسی وضعیت پروتئین‌های تغییر

چاقی به عنوان یکی از اختلالات شایع در دنیا در قرن ۲۱ مطرح شده است و در حال حاضر روند رو به پیشرفت آن در شرایط هشدار قرار دارد.^{۲۷} چاقی احتمال ابتلا به بیماری‌های گوناگون، به خصوص بیماری‌های قلبی،^۳ دیابت نوع دوم^۴ و انواع مشخصی از سرطان‌ها^{۵،۶} را افزایش می‌دهد؛ در نتیجه یافتن مسیرهایی در جهت مهار و درمان این سندرم می‌تواند خطر ابتلا به بسیاری از بیماری‌ها را کاهش دهد. چاقی بیماری پیچیده‌ای است که با افزایش توده‌ی چربی بدن ناشی از عدم تعادل بین انرژی دریافتی

ورزشی افزایش یافته است.^{۲۱} تغییر بیان این ژن و ژن‌های دیگر دخیل در گلیکولیز، نشان‌دهنده‌ی مصرف بالای کربوهیدرات‌ها طی گلیکولیز در اثر انجام تمرینات ورزشی است. دیگر ژن تغییر بیان یافته و شاخص در شبکه بر هم کنش پروتئینی (حائز رتبه سوم در جدول ۲)، ATP5B است که زیرواحد بتای ATP سنتاز را کد می‌کند. این آنزیم در واقع یک آنزیم میتوکندریایی است و در ساخت ATP و تامین انرژی سلول در حضور یک شیب پروتون در سراسر غشاء توسط انتقال الکترون از زنجیره تنفسی نقش دارد.^{۲۷،۲۸} ارتباط افزایش بیان این پروتئین در موش‌های تحت ورزش استقامتی در جهت تامین انرژی بیشتر سلول‌های ماهیچه‌ای اثبات شده است.^{۲۹} LDHA چهارمین ژن حائز اهمیت در شبکه پروتئینی افراد چاق بعد از ورزش است که کدکننده لاکتات دهیدروژناز A است. این آنزیم در تبدیل پیرووات به لاکتات نقش دارد. در اثر افزایش بیان LDHA، ترشح انسولین و جذب گلوکز افزایش می‌یابد.^۴ و از آنجایی که ورزش باعث مصرف بیشتر گلوکز در عضلات بدن می‌شود،^{۴۱} ارتباط این ژن با تغییرات اعمال شده بعد از ورزش در بدن دور از انتظار نیست. یکی از ژن‌های مهم، آلدولاز A است که در رتبه‌ی پنجم است. این ژن در گلیکولیز دخالت دارد و کدکننده‌ی فروکتوز-بیس فسفات آلدولاز است. این آنزیم، تبدیل ۱ و ۶ فروکتوز بیس فسفات را به گلیسر آلدئید ۳- فسفات و دی‌هیدروکسی استون فسفات را بر عهده دارد. به علاوه، این پروتئین در تنظیم شکل سلول و تنظیم تقسیم سلولی دخیل است.^{۴۲-۴۴} لازم به ذکر است که تاثیر ورزش استقامتی بر گلیکولیز در سلول‌های ماهیچه‌ای نیز اثبات شده است.^{۴۵} دیگر ژن مهم شبکه، TP11 است که کدکننده‌ی تریوز فسفات ایزومراز است. این پروتئین علاوه بر گلیکولیز در گلوکونئورنز نیز نقش دارد.^{۴۶} خوشه‌های پروتئینی مهم شبکه در شکل‌های ۴ و ۵ نشان داده شده‌اند. چهار پروتئین از مجموع شش پروتئین کلیدی شبکه، در این دو خوشه سازماندهی شده‌اند. در خوشه ۱، ژن PGK1 به عنوان seed (پروتئینی که بیشترین امتیاز تعاملی را در یک خوشه دارد) معرفی شده است. این ژن کدکننده‌ی فسفوگلیسرات کیناز ۱ است که آنزیم گلیکولیتیکی است که در ساخت پیرووات از گلیسر آلدئید ۳ فسفات فعالیت دارد. این پروتئین، در کنار آنزیم ژن‌هایی هم‌چون GAPDH و PKM (که در این مطالعه به عنوان پروتئین‌های کلیدی معرفی شدند)، در گلیکولیز و تجزیه‌ی کربوهیدرات‌ها نقش

بیان یافته در شرایط بعد از ورزش در افراد دارای اضافه وزن، جهت شناخت بهتر مسیرهای زیستی مرتبط، حائز اهمیت است. از طرفی، مسیرهای شناخته شده‌ی بیوشیمیایی می‌توانند تحت تاثیر عوامل مختلفی تنظیم شوند؛ بنابراین درک عناصر مهم و کلیدی در این چرخه‌ها حائز اهمیت است. در مطالعات مشابهی، برای بررسی تغییر بیان ژنی در بیمی‌هایی مانند دیابت، مالتیپل اسکروزیس، سرطان‌های دستگاه گوارش و بیماری‌های دهان و دندان از تحلیل شبکه تعاملی ژنی استفاده شده است. در این تحقیقات، پانل‌های بیومارکری متنوعی برای این بیماری‌ها پیشنهاد شده‌اند.^{۳۰-۳۲} در این مطالعه، شبکه تعاملی پروتئین‌های تغییر بیان یافته عضله‌ی افراد دارای اضافه وزن نوجوان که تمرینات ورزشی انجام داده‌اند و از طریق پروتئومیکس تعیین شده‌اند،^{۳۱} تجزیه و تحلیل شده است. با توجه به جدول ۱، تعداد ۱۰ پروتئین در این افراد تغییر بیان داشتند. تعیین پروتئین‌هایی که نقش برجسته‌تری در کنترل فرایندهای مرتبط دارند، دشوار است. بدین‌منظور این پروتئین‌ها در شبکه تعاملی (شکل ۱) قرار گرفتند. یکی از محدودیت‌های انجام این تحقیق تعداد پروتئین‌های معرفی شده بود. در بسیاری از تحقیقات پروتئومیکی، تعداد بیشتری پروتئین معرفی می‌شوند که امکان انتخاب از بین آن‌ها را فراهم می‌کند. با این وجود، چون تغییر بیان این پروتئین‌ها معنی‌دار است، انتخاب آن‌ها برای انجام آنالیز بلامانع است. با توجه به شکل‌های ۱ تا ۳ و جداول ۱ و ۲، شش مورد از این پروتئین‌ها به عنوان پروتئین‌های کلیدی معرفی شدند. با استناد به جدول ۲، رتبه‌ی درجه و بینابینی برای پروتئین‌های کلیدی یکسان است. به طور مثال، در این جدول، رتبه PKM برای هر دو شاخص مرکزی درجه و بینابینی یک بود؛ بنابراین، بالاترین نمره‌ی ژن‌های کلیدی، متعلق به PKM است که کدکننده ایزوفرم پیرووات کیناز (آخرین آنزیم درگیر در گلیکولیز) است. طی این فرایند، گلوکز به دو مولکول ATP و پیرووات تبدیل می‌شود. استتسبی^۱ و همکارانش نشان دادند که ورزش شدید باعث افزایش قابل توجهی در فعالیت پیرووات کیناز پلازما می‌شود.^{۳۶} از دیگر ژن‌های کلیدی که در مسیر گلیکولیز نقش دارد، GAPDH است. رتبه‌ی این ژن در جدول ۲، دوم است. بیان این ژن در بافت ماهیچه‌ی افراد دارای اضافه وزن بعد از انجام تمرینات

ارتباط هستند، زیرا هر کدام از این فرایندها خود به نحوی تعداد بیشتری آنزیم و مسیر بیوشیمیایی دیگر را متأثر می‌سازند. پاسخ رد به یک رژیم غذایی خاص، اطلاعات ارزشمندی در رابطه با عملکرد مسیرهای متابولیکی فراهم می‌کند. به عنوان مثال، افزایش در تری‌گلیسیرید پس از صرف غذا، عامل خطری برای بیماری‌های قلبی عروقی در نظر گرفته می‌شود، در حالی‌که سطح بالای غیرمتعارف گلوکز و انسولین بعد از غذا، خطر ابتلا به دیابت نوع ۲ را نشان می‌دهد.^{۴۸} بنابراین، ارزیابی پاسخ‌های متابولیک پس از ورزش، در کنار وعده غذایی استاندارد، می‌تواند درک بهتری از ارتباط بین ورزش و سوخت و ساز بدن فراهم آورد. این مطالعه نشان داد که انجام تمرینات ورزشی در افراد با اضافه وزن می‌تواند موجب تنظیم مجموعه‌ای از مسیرهای زیستی مرتبط با متابولیسم از جمله گلیکولیز بشود.

اهمیت یافته‌های این مطالعه از این جهت است که در این مطالعه، عناصر کلیدی کنترل‌کننده‌ی تغییرات ارتباطات پروتئینی بعد از ورزش در نوجوانان چاق رتبه‌بندی شدند. در این تحقیق، یک مورد ژن جدید و موثر نیز شناسایی و ارائه شد. طیف گسترده‌ای از مسیرهای زیستی مرتبط شناسایی و معرفی شده‌اند. از نقاط قوت این تحقیق می‌توان به اعطای رتبه یا ضریب تاثیر به عناصر کلیدی دخیل در فرایند و نیز معرفی یک ژن جدید دیگر به مجموعه‌ی ژنی معرفی شده، اشاره کرد. پیشنهاد می‌شود با لحاظ این عناصر کلیدی، تحقیقات جدیدی در حوزه داروشناسی انجام شود تا شاید با بررسی اهداف دارویی احتمالی بتوان در جهت مهار چاقی اقدامات موثری را انجام داد.

سپاسگزاری: این مقاله برگرفته از طرح مصوب دانشکده علوم پزشکی آبادان (کمیتة تحقیقات دانشجویی) با کد اخلاق IR.ABADANUMS.REC.1395-145 است.

i- Metabolic process

دارد.^{۴۷} با توجه به اهمیت seedها در تمامیت خوشه‌ها این پروتئین نیز به مجموع پروتئین‌های کلیدی افزوده می‌شود که پروتئین جدید معرفی شده در فرایند تاثیر ورزش بر عضله‌ی افراد چاق نوجوان در این مطالعه است. فرایندهای زیستی مرتبط با خوشه‌های ۱ و ۲ در شکل‌های ۶ تا ۷ نشان داده شده‌اند. همان‌طور که نتایج مطالعه‌ی مسیرهای زیستی نشان می‌دهد، NAD⁺ مسیر زیستی مشترک بین دو خوشه‌ی ۱ و ۲ است. این موضوع اهمیت تنظیم مسیرهای متابولیکی و به خصوص گلیکولیز را در ایجاد تعادل انرژی در افراد دارای اضافه وزن بعد از انجام تمرینات ورزشی نشان می‌دهد. نتایج حاصل از هستی‌شناسی ژنی نشان می‌دهد که خوشه ۱ در فرایندهای زیستی متنوعی دخیل است (شکل ۶). این خوشه با شرط مشارکت حداقل شش ژن در فرایند مرتبط، با ۳۰ فرایند زیستی مختلف ارتباط دارد. دسته‌بندی این فرایندها نشان می‌دهد که دو دسته شش و ۲۴ تایی از فرایندها به این خوشه مرتبط هستند. در دسته‌ی شش تایی، متابولیسم و ساخت قندها و نوکلئوتیدها مشاهده می‌شود. نکته‌ی بارز این دسته از فرایندها، حضور هفت ژن از خوشه‌ی ۱ در هر فرایند است. با توجه به تعداد ۱۸ ژن تشکیل‌دهنده‌ی این خوشه، حدود ۴۰ درصد از اعضای این خوشه در هر فرایند دخیل هستند که مشارکت بالایی محسوب می‌شود. در دسته‌ی ۲۴ تایی، تنوع فرایندهای زیستی بیشتر است. با توجه به حضور شش ژن در هر فرایند، ۳۳ درصد از عناصر این خوشه در هر فرایند زیستی مداخله داشته‌اند. در هفت فرایند، میزان مشارکت ژن‌های خوشه ۱، بیش از ۱۰ درصد است و کلیه‌ی این مسیرها به متابولیسم قند مربوط می‌شوند. فسفریلاسیون نوکلئوتیدها و دی‌فسفونوکلئوتیدها از فرایندهای زیستی مهمی هستند که با ژن‌های دسته ۲۴ تایی در خوشه ۱ مرتبط هستند. به نظر می‌رسد، عمده‌ی فعالیت‌های متابولیکی به نحوی با ژن‌های مورد بحث در

References

- Civitaresse AE, Ravussin E. Minireview: mitochondrial energetics and insulin resistance. *Endocrinology* 2008; 149: 950-4.
- Winder W, Hardie D. AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am J Physiol* 1999; 277: E1-E10.
- Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX, et al. Obesity and cardiovascular disease pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 968-76.
- Maggio CA, Pi-Sunyer FX. Obesity and type 2 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2003; 32: 805-22.
- Nimptsch K, Pischon T. Obesity Biomarkers, Metabolism and Risk of Cancer: An Epidemiological Perspective. *Recent Results Cancer Res* 2016; 208: 199-217.
- Fader AN, Arriba LN, Frasure HE, von Gruenigen VE. Endometrial cancer and obesity: epidemiology, biomarkers, prevention and survivorship. *Gynecol Oncol* 2009; 114: 121-7.
- Amer P. Obesity a genetic disease of adipose tissue? *Brit J Nut* 2000; 83: S9-S16.
- Lee JS. The effects of gender, obesity rate, nutrition knowledge and dietary attitude on the dietary self-efficacy

- of adolescents. *Korean J Community Nutr* 2003; 8: 652-7.
9. Ferguson M, Gutin B, Le N, Karp W, Litaker M, Humphries M, et al. Effects of exercise training and its cessation on components of the insulin resistance syndrome in obese children. *Inter J Obes* 1999; 23: 889-95.
 10. Macias-Cervantes MH, Malacara JM, Garay-Sevilla ME, Díaz-Cisneros FJ. Effect of recreational physical activity on insulin levels in Mexican/Hispanic children. *Eur J Pediatr* 2009; 168: 1195-202.
 11. LeBlanc PJ, Peters SJ, Tunstall RJ, Cameron-Smith D, Heigenhauser GJ. Effects of aerobic training on pyruvate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinase in human skeletal muscle. *J Physiol* 2004; 557: 559-70.
 12. Green H, Bombardier EB, Duhamel T, Holloway GP, Tupling AR, Ouyang J. Acute responses in muscle mitochondrial and cytosolic enzyme activities during heavy intermittent exercise. *J App Physiol* 2008; 104: 931-7.
 13. Safari-Alighiarloo N, Taghizadeh M, Rezaei-Tavirani M, Goliaei B, Peyvandi AA. Protein-protein interaction networks (PPI) and complex diseases. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2014; 7: 17-31.
 14. Safaei A, Tavirani MR, Oskouei AA, Azodi MZ, Mohabbati SR, Nikzamir AR. Protein-protein interaction network analysis of cirrhosis liver disease. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2016; 9: 114-21.
 15. Zamanian-Azodi M, Rezaei-Tavirani M, Rahmati-Rad S, Hasanzadeh H, Tavirani MR, Seyyedi SS. Protein-Protein Interaction Network could reveal the relationship between the breast and colon cancer. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2015; 8: 215-24.
 16. Rezaei-Tavirani M, Zamanian-Azodi M, Rajabi S, Masoudi-Nejad A, Rostami-Nejad M, Rahmatirad S. Protein Clustering and Interactome Analysis in Parkinson and Alzheimer's Diseases. *Arch Iran Med* 2016; 19: 21-31.
 17. Re M, Mesiti M, Valentini G. A fast ranking algorithm for predicting gene functions in biomolecular networks. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform* 2012; 9: 1812-8.
 18. Mostafavi S, Ray D, Warde-Farley D, Grouios C, Morris Q. GeneMANIA: a real-time multiple association network integration algorithm for predicting gene function. *Genome Biol* 2008; 9: S4.
 19. Tavirani MR. Meningioma protein-protein interaction network. *Arch Iran Med* 2014; 17: 262-7.
 20. Song J, Singh M. How and when should interactome-derived clusters be used to predict functional modules and protein function? *Bioinformatics* 2009; 25: 3143-50.
 21. Macias-Cervantes MH, Guzmán-Flores JM, Vargas-Ortiz K, Díaz-Cisneros FJ, Ramírez-Emiliano J, Pérez-Vázquez V. Effect of aerobic exercise on protein expression in muscle of obese mexican adolescents: A proteomic and bioinformatic analysis. *Nat Sci* 2014; 6: 641-9.
 22. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 2003; 13: 2498-504.
 23. Barabasi A-L, Oltvai ZN. Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nat Rev Genet* 2004; 5: 101-13.
 24. Bader GD, Hogue CW. An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. *BMC Bioinformatics* 2003; 4: 2.
 25. Liu H, Hu Z-Z, Wu CH. DynGO: a tool for visualizing and mining of Gene Ontology and its associations. *BMC Bioinformatics* 2005; 6: 201-10.
 26. Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, Charoentong P, Tosolini M, Kirilovsky A, et al. ClueGO: a Cytoscapeplug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics* 2009; 25: 1091-3.
 27. Barceló-Batlloiri S, Gomis R. Proteomics in obesity research. *Proteomics Clin Appl* 2009; 3: 263-78.
 28. Zamanian-Azodi M, Vafaei R, Azodi T, Omidi R, Gilanchi S, Azizi-Jalilian F, et al. Molecular approaches in obesity studies. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2013; 6: 23-31.
 29. Safari-Alighiarloo N, Taghizadeh M, Rezaei-Tavirani M, Goliaei B, Peyvandi AA. Protein-protein interaction networks (PPI) and complex diseases. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2014; 7: 17-31.
 30. Safari-Alighiarloo N, Taghizadeh M, Tabatabaei SM, Shahsavari S, Namaki S, Khodakarim S, et al. Identification of new keygenes for type 1 diabetes through construction and analysis of protein-protein interaction networks based on blood and pancreatic islet transcriptomes. *J Diabetes* 2017; 9: 764-77.
 31. Safari-Alighiarloo N, Rezaei-Tavirani M, Taghizadeh M, Tabatabaei SM, Namaki S. Network-based analysis of differentially expressed genes in cerebrospinal fluid (CSF) and blood reveals new candidate genes for multiple sclerosis. *Peer J* 2016; 4: e2775.
 32. Abbaszadeh H-A, Peyvandi AA, Sadeghi Y, Safaei A, Zamanian-Azodi M, Khoramgah MS, et al. Er: YAG Laser and Cyclosporin A Effect on Cell Cycle Regulation of Human Gingival Fibroblast Cells. *J Lasers Med Sci* 2017; 8: 143-9.
 33. Khayyer N, Azodi MZ, Mansouri V, Ghssemi-Broumand M, Rezaei-Tavirani M, Heidari MH, et al. Oral Squamous Cell Cancer protein-protein interaction network interpretation in comparison to esophagus adenocarcinoma. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2017; 10: 118-24.
 34. Asadzadeh-Aghdaee H, Shahrokh S, Norouzinia M, Hosseini M, Keramatinia A, Jamalani M, et al. Introduction of inflammatory bowel disease biomarkers panel using protein-protein interaction (PPI) network analysis. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2016; 9: S8-13.
 35. Asadzadeh-Aghdaee H, Mansouri V, Peyvandi AA, Moztarzadeh F, Okhovatian F, Lahmi F, et al. Topological and functional analysis of nonalcoholic steatohepatitis through protein interaction mapping. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2016; 9: S23-8.
 36. Stansbie D, Aston JP, Dallimore NS, Williams HM, Willis N. Effect of exercise on plasma pyruvate kinase and creatine kinase activity. *Clin Chim Acta* 1983; 132: 127-32.
 37. Wallace DC, Ye J, Neckelmann SN, Singh G, Webster KA, Greenberg BD. Sequence analysis of cDNAs for the human and bovine ATP synthase β subunit: mitochondrial DNA genes sustain seventeen times more mutations. *Curr Genet* 1987; 12: 81-90.
 38. Kataoka H, Chitra B. Nucleotide sequence of a cDNA for the α subunit of human mitochondrial ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1991; 1089: 393-5.
 39. González B, Hernando R, Manso R. Stress proteins of 70 kDa in chronically exercised skeletal muscle. *Pflügers Arch* 2000; 440: 42-9.
 40. Hellman B, Idahl L-Å, Sehlin J, Täljedal I-B. Influence of anoxia on glucose metabolism in pancreatic islets: lack of correlation between fructose-1, 6-diphosphate and apparent glycolytic flux. *Diabetologia* 1975; 11: 495-500.
 41. Björntorp P. The effects of exercise on plasma insulin. *Int J Sports Med* 1981; 2: 125-9.

42. Du S, Guan Z, Hao L, Song Y, Wang L, Gong L, et al. Fructose-bisphosphate aldolase a is a potential metastasis-associated marker of lung squamous cell carcinoma and promotes lung cell tumorigenesis and migration. *PloS One* 2014; 9: e85804.
43. Mamezur P, Gamian A, Kolodziej J, Dziegiel P, Rakus D. Nuclear localization of aldolase A correlates with cell proliferation. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1833: 2812-22.
44. Merkulova M, Hurtado-Lorenzo A, Hosokawa H, Zhuang Z, Brown D, Ausiello DA, et al. Aldolase directly interacts with ARNO and modulates cell morphology and acidic vesicle distribution. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011; 300: C1442-C55.
45. Duan C, Winder W. Effect of endurance training on activators of glycolysis in muscle during exercise. *J App Physiol* 1994; 76: 846-52.
46. Davenport RC, Bash PA, Seaton BA, Karplus M, Petsko GA, Ringe D. Structure of the triosephosphate isomerase-phosphoglycolohydroxamate complex: an analogue of the intermediate on the reaction pathway. *Biochemistry* 1991; 30: 5821-6.
47. Jindal HK, Vishwanatha JK. Functional identity of a primer recognition protein as phosphoglycerate kinase. *J Biol Chem* 1990; 265: 6540-3.
48. Badoud F, Lam KP, Perreault M, Zulyniak MA, Britz-McKibbin P, Mutch DM. Metabolomics reveals metabolically healthy and unhealthy obese individuals differ in their response to a caloric challenge. *PLoS One* 2015; 10: e0134613.

Original Article

Investigation of Effect of Exercises on Overweight Adolescents via Protein-protein Interaction Network Study

Morovati P¹, Mansouri V², Mohammadi A³, Rezaei Tavirani M⁴, Safaei A⁴, Hesami Takalou S⁵, Zamanian Azodi M⁴

¹Student Research Committee, Abadan University of Medical Sciences, Abadan, Iran, ²Physiotherapy Research Center, Department of Anatomy and Cell Biology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran, ³Abadan University of Medical Sciences, Abadan, Iran, ⁴Proteomics Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran, ⁵Islamic Azad University, Central Tehran Branch, Tehran, I.R. Iran

e-mail: tavirany@yahoo.com

Received: 23/04/2017 Accepted: 28/08/2017

Abstract

Introduction: With increasing weight, the risk of developing various heart diseases increases. Although exercise is effective in controlling obesity, and the molecular mechanism of this effect is not well known. This study aims to identify, rank and analyse changes in the expression of key proteins in overweight individuals after aerobic exercise training. **Materials and Methods:** Transformed proteins expressed in skeletal muscle of overweight adolescents were analyzed in a protein-protein interaction network, using Cytoscape software. Key elements of the interactome and the biological processes associated with protein clusters were identified and analyzed. **Results:** Seven key genes and two important gene clusters related to the network were introduced. The elements of the first cluster were related to 30 important biological processes that control sugar and nucleotide metabolism. The NAD metabolic process was introduced as the most important biological process. **Conclusion:** Expression of seven key genes with various impacts is altered in overweight adolescents. The PKM gene, as the key gene, plays an important role in the activation of pyruvate. PGK1 was identified and introduced via the network analysis. Considering the importance of each of the seven genes identified and the related processes, the feasibility and ground work for possible drug treatment can be facilitated.

Keywords: Overweight, Exercises, Protein- protein interaction