

## اثر NOX2 بر بیان ژن‌های ایتروکین ۱۵ و PGC-1 $\alpha$ در عضله اسکلتی موش به دنبال یک دوره تمرین تناوبی شدید

لیلا باقرصاد رنانی<sup>۱</sup>، دکتر علی اصغر رواسی<sup>۱</sup>، دکتر فاطمه شب خیز<sup>۱</sup>، دکتر توماس جنسن<sup>۲</sup>

۱) دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران، ۲) دانشکده تغذیه و ورزش، دانشگاه کپنهاگ، دانمارک  
نشانی مکاتبه‌ی نویسنده‌ی مسئول: تهران، خیابان کارگر شمالی، بالاتر از تقاطع جلال آل احمد، بین خیابان‌های پانزدهم و شانزدهم،  
دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، لیلا باقرصاد رنانی؛ e-mail: l.baghersad@gmail.com

### چکیده

**مقدمه:** گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، نقش مهمی را در تنظیم مسیرهای سیگنال‌دهی عضله اسکلتی و سازگاری‌های پس از تمرین از قبیل بیورژن میتوکندریایی و بهبود حساسیت به انسولین، ایفا می‌کنند. هم‌چنین، ROS ناشی از فعالیت جسمانی می‌تواند تولید مایوکاین‌ها را از عضله اسکلتی تحریک کند. بنابراین هدف از پژوهش حاضر، بررسی نقش NADPH Oxidase 2 (NOX2) به عنوان تولیدکننده اصلی ROS حین انقباض در عضله اسکلتی بر بیان ژن‌های ایتروکین ۱۵ (IL-15)، و نیز تغییرات بیان کوکتیواتور ۱-آلفای PPAR  $\gamma$  (PGC-1 $\alpha$ )، به عنوان تنظیم‌کننده کلیدی بیورژن میتوکندریایی، به دنبال یک دوره تمرین تناوبی شدید (HIIT) بود. مواد و روش‌ها: حیوانات به چهار گروه موش‌های وحشی شاهد (WTc) و آزمون (WTt)، و موش‌های ترانسژنیک با نقص در ژن NOX2 شاهد (NDC) و آزمون (NDt) تقسیم شدند. گروه‌های آزمون به مدت ۶ هفته HIIT را به صورت تناوب‌های دو دقیقه دویدن با ۱۰۰ درصد سرعت پیشینه و دو دقیقه استراحت با ۳۰ درصد این سرعت و در مدت زمان کلی ۶۰ دقیقه اجرا کردند. سرعت دویدن یک متر بر دقیقه به ازای هر هفته افزایش یافت. میزان بیان ژن‌های PGC-1 $\alpha$ ، IL-15 و NOX2 در عضله دوقلو به روش Real-time PCR اندازه‌گیری شد. یافته‌ها: سطوح پایه IL-15 mRNA عضله دوقلو در گروه NDC به طور معناداری ( $P \leq 0.001$ ) پائین‌تر از سایر گروه‌ها بود. بیان نسبی ژن‌ها در گروه‌های WTc، WTt، NDC و NDt برای IL-15 به ترتیب ۱، ۱/۱۵، ۰/۴۹ و ۰/۹۹ برابر و برای PGC-1 $\alpha$  ۱، ۱/۷۳، ۰/۷۶ و ۱/۴ برابر تغییر یافت. سطوح PGC-1 $\alpha$  mRNA پس از تمرین در گروه WTt به طور معناداری ( $P = 0.048$ ) افزایش یافت. نتیجه‌گیری: یافته‌های فوق نشان می‌دهند بیان ژن IL-15 در عضله اسکلتی موش وابسته به NOX2 است. هم‌چنین، به نظر می‌رسد نقص در ژن NOX2 منجر به تضعیف بیان PGC-1 $\alpha$  و در نتیجه تضعیف بیورژن میتوکندریایی می‌شود.

**واژگان کلیدی:** گونه‌های فعال اکسیژن، NOX2، IL-15، عضله اسکلتی، تمرین تناوبی شدید

دریافت مقاله: ۹۷/۷/۱۷ - دریافت اصلاحیه: ۹۷/۱۰/۴ - پذیرش مقاله: ۹۷/۱۰/۱۶

### مقدمه

گونه‌های فعال اکسیژن<sup>۱</sup> (ROS) که عموماً به عنوان فراورده‌های جانبی متابولیسم اکسیداتیو میتوکندریایی در نظر گرفته می‌شوند، قادر به فعال‌سازی مسیرهای سیگنال‌دهی متعددی در عضله اسکلتی هستند.<sup>۱</sup> تولید ROS

در بسیاری از بافت‌ها هنگام ورزش، افزایش می‌یابد.<sup>۲</sup> این رویداد به عنوان سیگنالی برای فعال‌سازی مسیرهای حساس به ردوکس<sup>۳</sup> (اکسایش - کاهش)، منجر به فعال‌سازی عوامل رونویسی و بیان ژن و در نتیجه بروز هر دو پاسخ حاد و سازگاری‌های طولانی‌مدت نسبت به تمرین می‌شود.<sup>۴</sup> محققان در گذشته بر این باور بودند که تولید ROS و عدم تعادل آن



با استفاده از فشار هوا، به مدت بیش از ۵ ثانیه بر روی قسمت شوکر تردمیل باقی می‌ماند. حداکثر ظرفیت دویدن، مرحله‌ای در نظر گرفته شد که در آن حیوان دست کم به مدت ۵۰ ثانیه قادر به دویدن بود.

HIIT شامل دویدن بر روی تردمیل برای ۳ روز در هفته و به مدت ۶ هفته بود. تمرین در هفته اول به صورت مراحل متناوب دو دقیقه‌ای دویدن با ۱۰۰ درصد سرعت بیشینه و دو دقیقه استراحت با ۳۰ درصد این سرعت در مدت زمان کلی ۶۰ دقیقه بود. سرعت دویدن به ازای هر هفته ۱ متر بر دقیقه افزایش یافت. جزئیات برنامه HIIT در طول ۶ هفته در جدول ۱ ارائه شده است.

WT با تمرین تناوبی شدید (WTt) ( $n=4$ )، گروه NOX2-deficient بدون تمرین (NDc) ( $n=4$ ) و گروه NOX2-deficient با تمرین تناوبی شدید (NDt) ( $n=4$ ).

به منظور ارزیابی حداکثر ظرفیت دویدن، تست ظرفیت دویدن تا رسیدن به واماندگی، پیش از شروع تمرینات و پس از هفته پنجم برای هر حیوان انجام شد؛ به این صورت که حیوانات گروه آزمون با سرعت ۹/۲ متر بر دقیقه و شیب ۱۰ درصد شروع به دویدن بر روی تردمیل کردند به طوری که هر یک دقیقه، ۱/۲ متر بر دقیقه سرعت تردمیل افزایش یافت. حیوانات با استفاده از یک شوک الکتریکی ضعیف و نیز با استفاده از فشار هوا، برای دویدن تحریک شدند. واماندگی نقطه‌ای تعریف شد که حیوان، علی‌رغم تشویق برای دویدن

جدول ۱- سرعت دویدن در هفته‌های تمرین (متر/دقیقه)

سرعت دویدن (متر/دقیقه)														
میانگین حداکثر سرعت دویدن پیش از شروع تمرینات	هفته اول		هفته دوم		هفته سوم		هفته چهارم		هفته پنجم		میانگین حداکثر سرعت دویدن		هفته ششم	
	استراحت	فعالیت	استراحت	فعالیت	استراحت	فعالیت	استراحت	فعالیت	استراحت	فعالیت	استراحت	فعالیت		
گروه WT	۲۹	۲۹	۹	۳۰	۹	۳۱	۹/۵	۳۲	۹/۵	۳۳	۱۰	۳۴/۵	۳۴/۵	۱۰/۵
گروه ND	۲۸	۲۸	۸/۵	۲۹	۸/۵	۳۰	۹	۳۱	۹/۵	۳۲	۹/۵	۳۴	۳۴	۱۰

استخراج RNA با استفاده از محلول تریزول (Invitrogen, Cat. 15596018 - آمریکا) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. نسبت جذبی ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر برای تمامی استخراج‌ها بین ۱/۸ تا ۲ بود. به منظور تهیه cDNA به RNA از کیت Invitrogen (ساخت شرکت Thermo Fisher کشور آمریکا) استفاده شد. برنامه استفاده شده بر اساس پروتکل کیت برای نسخه-برداری معکوس به صورت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد و به دنبال آن ۵۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و در آخر توقف واکنش در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، انجام گرفت. cDNA به دست

به منظور حذف آثار ناشی از آخرین جلسه تمرین، تمامی حیوانات ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین از طریق جابجایی سریع گردن<sup>i</sup> بیهوش شدند. بافت عضله دوقلو<sup>ii</sup> به عنوان یکی از عضلات اصلی درگیر در دویدن و نیز شامل ترکیبی از انواع تارهای عضلانی (عمدتا نوع II)،<sup>iii</sup> برای ارزیابی بیان ژن‌های NOX2, IL-15, PGC-1 $\alpha$  و GAPDH<sup>iii</sup> به عنوان ژن مرجع جدا و به سرعت در نیتروژن مایع منجمد و برای اندازه‌گیری‌های بعدی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

i -Rapid cervical dislocation

ii -Gastrocnemius

iii - Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase housekeeping

آمده تا زمان استفاده بعدی، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

واکنش Real-time PCR با استفاده از دستگاه واکنش Applied (7900HT Sequence Detection System Biosystems - آمریکا) و پروب‌های TaqMan از کمپانی Thermo Fisher و مطابق با دستورالعمل کیت انجام شد. مشخصات پروب‌های استفاده شده در جدول ۲ ارائه شده است. پروفایل دمایی PCR در مخلوط نهایی به حجم ۲۰ میکرولیتر به این صورت انجام شد: فعال‌سازی UNG در

دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه، در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و در ادامه تکرار ۴۵ چرخه شامل واسرشت<sup>i</sup> در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ثانیه و Annealing در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه. میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه نسبت به گروه WtC با تفریق  $\Delta\text{CT}$  ژن GAPDH و با استفاده از فرمول  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  محاسبه شد.

جدول ۲- مشخصات پروب و پرایمرهای TaqMan مورد استفاده در پژوهش

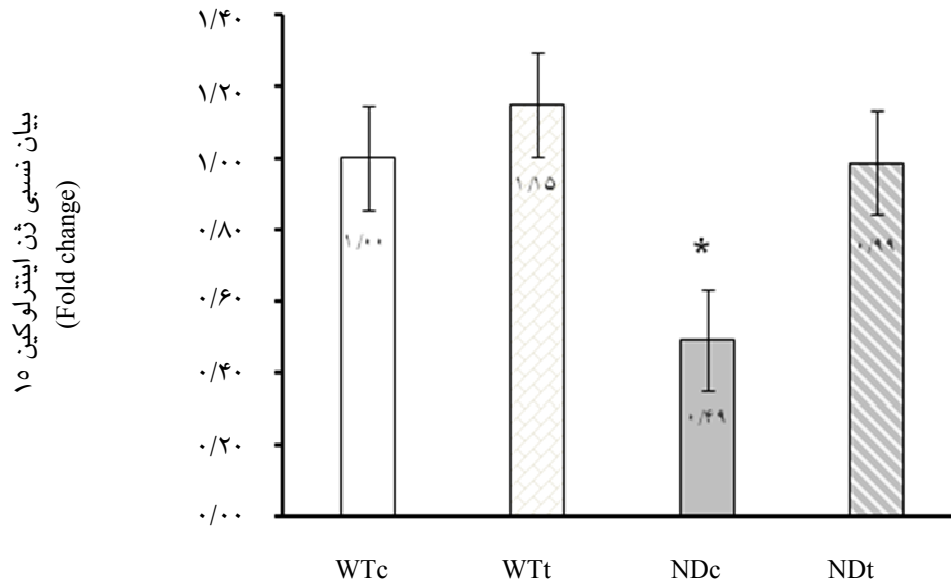
	Gene Symbol	Catalog #	Assay ID	Primer sequence	GeneBank Code
<b>GAPDH</b>	Gapdh	4331182	Mm99999915_g1	<b>F:</b> GGCAAATTC AACGGCACAGT <b>R:</b> TAGGGCCTCTCTTGCTCAGT	AK002273.1
<b>NOX2</b>	Cybb	4453320	Mm01287743_m1	<b>F:</b> TAGGGAGAGTCAGGCCATTCT <b>R:</b> GTGTGGTGCTTTCCTTCTGG	AK033570.1
<b>IL-15</b>	Il 15	4331182	Mm00434210_m1	<b>F:</b> AGAAGAACA CT TGGGAGCGAG <b>R:</b> GGTCCACACAAAGGGGGATT	AK085441.1
<b>PGC1<math>\alpha</math></b>	Ppargc1a	4448489	Mm01208835_m1	<b>F:</b> GCCATATCTTCCAGTGACCCC <b>R:</b> CAATGAATAGGGCTGCGTGC	AB061324.1
<b>TaqMan Fast Advanced Master Mix</b>		4444557	-	---	---

## یافته‌ها

بیان نسبی ژن‌های IL-15، PGC1- $\alpha$  و NOX2 در عضله دوقلو به ترتیب در نمودارهای ۱، ۲ و ۳ نشان داده شده است.

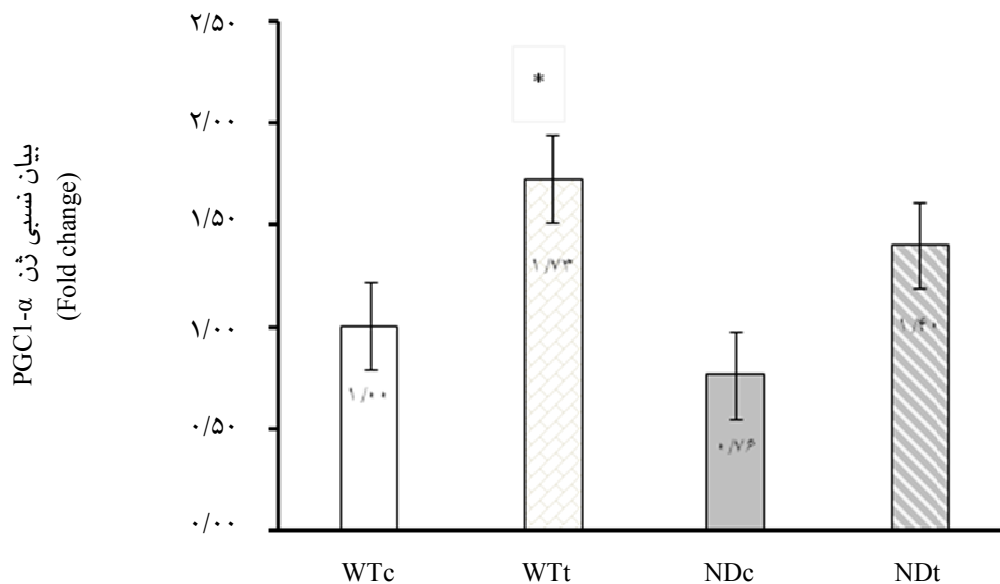
i- Denaturation  
ii- Kolmogorov-Smirnov  
iii- Leven  
iv- One-way ANOVA  
v- Tukey

کلیه اطلاعات به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شده است. از آزمون کولموگوروف - اسمیرنوف<sup>ii</sup> (K-S) برای بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها و آزمون لون<sup>iii</sup> برای بررسی همسان بودن واریانس‌ها استفاده شد. همچنین به منظور مقایسه تغییرات بین گروهی از آزمون آنوای یک طرفه<sup>iv</sup> و آزمون تعیقی توکی<sup>v</sup> استفاده گردید. تمامی این عملیات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ انجام و سطح معناداری  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد.



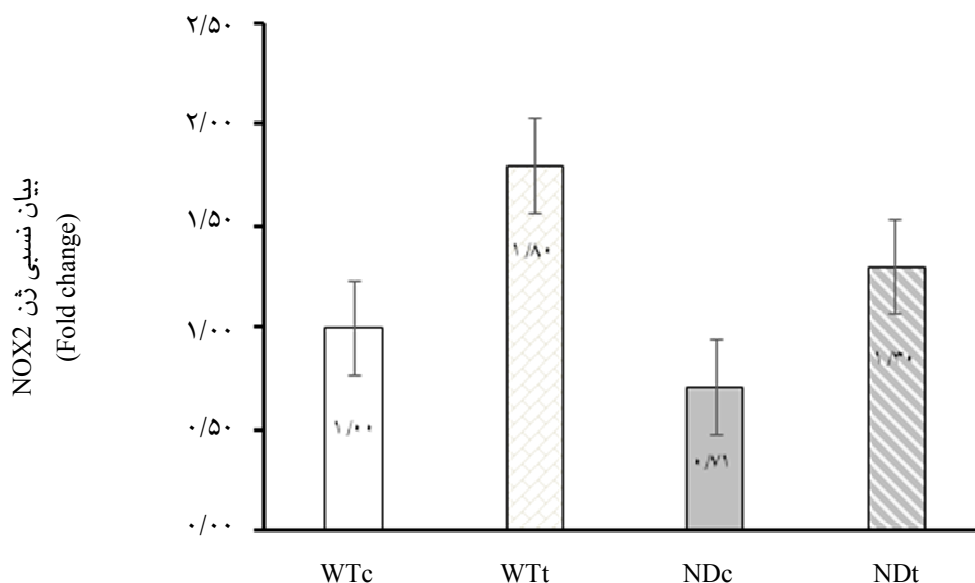
#### نمودار ۱- بیان نسبی ژن IL-15 mRNA عضله دوقلو در گروه‌های پژوهش پس از یک دوره HIIT

WTc: گروه وحشی بدون تمرین، WTt: گروه وحشی با تمرین تناوبی شدید، NDc: گروه Nox2-deficient بدون تمرین، NDt: گروه Nox2-deficient با تمرین تناوبی شدید. \*تفاوت معنادار با گروه‌های WTc، WTt و NDt ( $P < 0.001$ )



#### نمودار ۲- بیان نسبی ژن PGC1-α mRNA عضله دوقلو در گروه‌های پژوهش پس از یک دوره HIIT

WTc: گروه وحشی بدون تمرین، WTt: گروه وحشی با تمرین تناوبی شدید، NDc: گروه Nox2-deficient بدون تمرین، NDt: گروه Nox2-deficient با تمرین تناوبی شدید. \*تفاوت معنادار با گروه WTc ( $P < 0.001$ )



نمودار ۳- بیان نسبی ژن NOX2 mRNA عضله دوقلو در گروه‌های پژوهش پس از یک دوره HIIT

WTc: گروه وحشی بدون تمرین، WTt: گروه وحشی با تمرین تناوبی شدید، NDc: گروه Nox2-deficient بدون تمرین، NDt: گروه Nox2-deficient با تمرین تناوبی شدید

## بحث

در دیدگاه رایج، ROS تولید شده در حین فعالیت به عنوان عوامل آسیب‌زا به سلول‌های زنده در نظر گرفته شده و با بسیاری از فرآیندهای پاتولوژیک از جمله آسیب به عضله اسکلتی، پیری، افزایش مقاومت به انسولین، خستگی و به تاخیر انداختن ریکاوری مرتبط می‌شوند؛<sup>۲۰</sup> در حالی که اخیراً شواهدی مبنی بر آثار مثبت ROS در سیگنال‌دهی سلول، در حال انتشار بوده ولی سازوکارهای سلولی درگیر در بروز این آثار مثبت هنوز بسیار ناشناخته است. بنابراین این مطالعه با هدف بررسی نقش آنزیم NOX2، به عنوان منبع اصلی ROS تولیدی حین انقباض عضله، بر بیان ژن مایوکاین IL-15 و نیز بر تحریک بیوژنز میتوکندریایی به دنبال یک دوره HIIT انجام شد. از این رو، به منظور بررسی دقیق عملکرد این آنزیم، از حیوانات ترنسژنیک که ژن  $p47^{Phox}$  (زیرواحد تنظیمی NOX2) در آن‌ها حذف شده بود، استفاده گردید.

مهم‌ترین یافته پژوهش حاضر این بود که بیان ژن IL-15 وابسته به NOX2 است. سطوح پایه بیان نسبی این مایوکاین در حیوانات ترنسژنیک، نصف حیوانات معمولی

آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه تفاوت معنادار بیان ژن IL-15 عضله دوقلو گروه NDc را نسبت به سایر گروه‌های پژوهش نشان داد ( $P \leq 0.001$ ). سطوح پایه این ژن در این گروه به طور معناداری نسبت به WTc ( $P < 0.001$ ) پایین‌تر بود. همچنین، بیان ژن این مایوکاین در عضله دوقلو پس از ۶ هفته HIIT در هر دو گروه WTt و NDt نسبت به گروه‌های شاهد هر دو ژنوتیپ افزایش یافت. این افزایش در حیوانات WT غیرمعنادار ( $P = 0.396$ )، اما در گروه ترنسژنیک معنادار ( $P = 0.001$ ) بود.

با توجه به نمودار ۲، پس از ۶ هفته HIIT بیان نسبی PGC-1 $\alpha$  عضله دوقلو در هر دو گروه افزایش یافت. این افزایش تنها در گروه موش‌های WT معنادار ( $P = 0.048$ ) بود. ژنوتیپ تأثیر معناداری ( $P = 0.792$ ) بر سطوح پایه این ژن نداشت.

در پژوهش حاضر، بیان ژن NOX2 عضله دوقلو پس از ۶ هفته HIIT در گروه‌های آزمون افزایش یافت، گرچه این افزایش معنادار نبود. مقدار P بین گروه‌های WT و ND به ترتیب برابر با ۰/۱۰۵ و ۰/۲۰۲ بود. همچنین تفاوت معناداری بین سطوح پایه این ژن ( $P = 0.807$ ) و نیز سطوح پس از تمرین ( $P = 0.574$ ) آن بین دو ژنوتیپ وجود نداشت.

ROS تولیدی حین انقباض به عنوان محرکی برای القاء بیان IL-15، تمرین به کار گرفته شده توانست موجب جبران این نقص شود تا جایی که سطوح IL-15 mRNA در گروه NDT پس از ۶ هفته تمرین، تقریباً با سطوح پایه این مایوکاین در گروه WTC برابر شد.

به طور کلی، گزارشات مختلفی در رابطه با تغییر بیان ژن IL-15 پس از ورزش و تمرین وجود دارد. برخی مطالعات موفق به مشاهده تغییری در سطوح IL-15 mRNA عضله اسکلتی به دنبال یک دوره تمرین نشدند.<sup>۲۶،۲۷</sup> دیگران افزایش بیان این مایوکاین را به دنبال یک مرحله ورزش نشان دادند.<sup>۲۸،۲۹</sup> از سوی دیگر، پس از ۵ هفته تمرین مقاومتی، بیان ژن IL-15 در عضلات نعلی و FHL<sup>iv</sup> رت‌های سالم کاهش یافت، در حالی که سطوح عضلانی پروتئین این مایوکاین افزایش یافت.<sup>۳۰</sup> در مطالعه نیلسن و همکاران<sup>v</sup> (۲۰۰۷) محتوای IL-15 mRNA در عضله پهن جانبی<sup>vi</sup> ۲۴ ساعت پس از یک مرحله ورزش مقاومتی تنظیم مثبت شد، در حالی که آن‌ها ۶ و ۴۸ ساعت پس از آن تغییری مشاهده نکردند.<sup>۳۱</sup> مطالعات دیگری نیز عدم همبستگی بین سطوح پروتئین و IL-15 mRNA را نشان داده‌اند<sup>۳۲،۳۳</sup> که عمدتاً ناشی از مهارکننده‌های رونویسی و ترجمه‌ای موجود در توالی ژن IL-15 است. به طور کلی به نظر می‌رسد فاصله بین جلسات تمرین و زمان نمونه‌برداری از بافت عضله از عوامل تاثیرگذار بر این یافته‌های متفاوت است. اگرچه در مطالعه حاضر بیان این مایوکاین به دنبال یک دوره HIIT افزایش یافت، با این حال IL-15 mRNA عضله نمی‌تواند به عنوان شاخصی از آثار روش‌های تمرینی مختلف بر سطوح پروتئین IL-15 درون عضلانی باشد.<sup>۳۱</sup> بنابراین، بررسی دقیق‌تر اثر یک دوره HIIT بر IL-15 نیازمند اندازه‌گیری سطوح پروتئین این مایوکاین است.

افزایش محتوای میتوکندری (تعداد و حجم) یکی از سازگاری‌های ثابت شده ناشی از HIIT در عضله اسکلتی است که در رابطه با بهبود ظرفیت اکسیداتیو شناخته می‌شود.<sup>۳۰</sup> PGC-1 $\alpha$  یک هم‌فعال‌کننده رونویسی ژن‌های درگیر در تنفس و بیوژنز میتوکندریایی است<sup>۳۰</sup> که به دنبال ورزش شدید<sup>۳۲</sup> و نیز پس از یک دوره تمرین استقامتی<sup>۳۳</sup> افزایش می‌یابد.

بود. به بیان دیگر، ایجاد نقص در عملکرد آنزیم NOX2 موجب تضعیف بیان IL-15 شد. مایوکاین‌ها نقش مهمی را در متابولیسم کل بدن حین ورزش‌های استقامتی و مقاومتی، ایفا می‌کنند.<sup>۲۱،۲۲</sup> ارتباط نزدیکی بین تولید ROS و مایوکاین‌ها حین ورزش پیشنهاد شده‌است.<sup>۱۰</sup> ROS می‌تواند باعث القاء بیان فاکتورهای رونویسی حساس به ردوکس، و در نتیجه فعال‌سازی سایتوکاین‌های التهابی شوند. مطالعات انسانی موید این نظریه هستند که ROS می‌تواند محرک تولید مایوکاین‌ها در عضله اسکلتی در پاسخ به ورزش باشند.<sup>۱۱،۳۲</sup> در همین راستا، سطوح پلاسمایی سایتوکاین‌های IL-6، IL-1 $\beta$  و TNF- $\alpha$  پس از یک مرحله دوچرخه‌سواری به دنبال ۶۰ روز مصرف مکمل حاوی ویتامین‌های A، C و E در افراد سالم غیرورزشکار، به شدت کاهش یافت.<sup>۱۱</sup> در مطالعه مشابه دیگری، فیشر و همکاران<sup>iii</sup> (۲۰۰۴) نشان دادند ترشح IL-6 از عضله اسکلتی مردان پس از ۲۸ روز مصرف ویتامین‌های C و E و نیز سه ساعت ورزش مقاومتی، به طور کامل متوقف شد که نشان‌دهنده القاء IL-6 وابسته به ROS در پاسخ به ورزش است.<sup>۳۳</sup> همچنین، بیان IL-6 در بافت چربی موش‌های با نقص در ژن NOX، مهار شد.<sup>۲۴</sup> هنری کوئز-اولگوین و همکاران<sup>iii</sup> (۲۰۱۶) دریافتند پس از مهار NOX2، به عنوان منبع اصلی ROS تولیدی حین انقباض عضلانی، بیان IL-6 در عضله اسکلتی موش، کاهش یافت.<sup>۲۵</sup> آن‌ها پیشنهاد کردند که تولید ROS ناشی از NOX2 برای بیان IL-6 و ترشح آن از عضله اسکلتی هنگام ورزش، ضروری است. در مجموع این یافته‌ها نقش ROS را به عنوان القاکننده تولید مایوکاین‌ها و نیز واسطه سیگنال‌دهی سلول در عضله اسکلتی، نشان می‌دهند. یافته‌های مطالعه‌ی حاضر نیز نشان می‌دهند که فعال‌سازی NOX2 لازمه القاء بیان IL-15 از عضله اسکلتی است.

پس از ۶ هفته HIIT، سطوح IL-15 mRNA در عضله دوقلو در هر دو گروه مورد مطالعه نسبت به حیوانات گروه شاهد افزایش یافت. این افزایش اگرچه در گروه WT ناچیز بود، اما در گروه حیوانات ترنسژنیک حدود دو برابر و معنادار بود. همچنین، تفاوت معناداری بین دو گروه Wt و NDT در میزان بیان این ژن مشاهده نشد. بنابراین به نظر می‌رسد، با وجود نقص در ژن NOX2 و در نتیجه کاهش

iv -Flexor hallucis longus

v -Nielsen AR, et al. 2007

vi -Vastus lateralis

i - Tumor necrosis factor-alpha

ii -Fischer CP, et al. 2004

iii -Henríquez-Olguín C, et al. 2016

افزایش نیاز به انرژی و ترنور<sup>i</sup> کلسیم که در حین فعالیت ایجاد می‌شود، توسط برخی از پروتئین‌ها شامل AMPK، mTOR، CaMKs<sup>iii</sup> و MAPKs<sup>iv</sup> احساس می‌شود.<sup>۴۴</sup> این رویداد متعاقباً موجب فعال‌سازی PGC-1 $\alpha$  می‌شود که نهایتاً بیورژنز میتوکندریایی را تنظیم می‌کند. در حال حاضر شواهد محکمی وجود دارد که نقش ROS در بیورژنز میتوکندریایی تأیید می‌کند. نشان داده شده است تحریک برون‌زاد و درون‌زاد با ROS، موجب تنظیم مثبت PGC-1 $\alpha$  می‌شود.<sup>۴۵</sup> همچنین دوز بالای آنتی‌اکسیدان‌ها در رژیم غذایی، بیورژنز میتوکندریایی را متوقف کرد.<sup>۴۶</sup> در مطالعات دیگری، درمان موش‌ها با آنتی‌اکسیدان‌ها موجب سرکوب برخی فاکتورهای بیورژنز میتوکندریایی ناشی از ورزش حاد و تمرین گردید<sup>۳۶،۳۷</sup> که نشان‌دهنده نقش ROS در ایجاد این سازگاری در عضله اسکلتی است. در مطالعه حاضر، ۶ هفته HIIT موجب افزایش معنادار بیان ژن PGC-1 $\alpha$  در عضله دوقلو گروه WT شد. این یافته، هم‌راستا با یافته‌های پیشین و تأییدی بر تاثیرگذاری این روش تمرینی برای تحریک بیورژنز میتوکندریایی است. اگرچه تمرین باعث تغییر مشابهی در گروه موش‌های NDt شد، با این حال این افزایش بر خلاف گروه WT، معنادار نبود. تفاوت بین این دو گروه، نشان‌دهنده این است که با ایجاد نقص در ژن NOX2 به عنوان منبع اصلی ROS تولیدی هنگام فعالیت جسمانی، بیان ژن PGC-1 $\alpha$  و در نتیجه بیورژنز میتوکندریایی تضعیف می‌شود.

بر اساس یافته‌های حاضر، بیان ژن NOX2 در سطوح پایه بین گروه‌های WTc و Ndc تفاوت معناداری نداشت. NOX2 یک کمپلکس پروتئینی شامل زیرواحدهای تنظیمی (p47<sup>phox</sup>، p67<sup>phox</sup>، p40<sup>phox</sup> و Rac1<sup>v</sup>) و کاتالیزی (gp91<sup>phox</sup> و p22<sup>phox</sup>) است.<sup>۱</sup> زیر واحدهای تنظیمی در سیتوپلاسم و زیر واحدهای کاتالیزی عمدتاً در سارکولما (غشای پلاسمایی فیبرهای عضلانی) و توپول‌های عرضی قرار گرفته‌اند.<sup>۳۸</sup> به مجرد ایجاد تحریک، زیرواحدهای سیتوزولی به غشا منتقل می‌شوند و مونتاژ کامل آنزیم صورت می‌گیرد که با فعال‌سازی آنزیم و تولید ROS همراه است.<sup>۱</sup> در انواع مختلف سلول‌ها، فسفریلاسیون p47<sup>phox</sup>

و p67<sup>phox</sup> و فعال‌سازی Rac1، تولید سوپراکساید (O<sub>2</sub>) توسط NOX2 را تنظیم می‌کنند.<sup>۳۹</sup> در عضله اسکلتی تنها فسفریلاسیون p47<sup>phox</sup> و Rac1 گزارش شده است.<sup>۴۰،۴۱</sup> این رویدادهای پس از ترجمه‌ای منجر به انتقال و اتصال زیرواحدهای سیتوزولی به غشاء سلول و تشکیل یک کمپلکس فعال عملکردی می‌شود.

در یک دیدگاه سنتی در رابطه با تنظیم NOX2، p47<sup>phox</sup> عامل تنظیم‌کننده در نظر گرفته می‌شود که یک کمپلکس با همه زیرواحدهای سیتوزولی را ایجاد می‌کند و مسئول انتقال آن‌ها به غشای سلول است.<sup>۴۲</sup> با توجه به موقعیت p47<sup>phox</sup> در سلول‌های عضله اسکلتی که به جای سیتوزول در غشا قرار دارد، مشخص نیست که چگونه این پروتئین به عنوان تنظیم‌کننده زیرواحدهای سیتوزولی عمل می‌کند. وجود این تفاوت‌های آشکار بین عضله اسکلتی و انواع سلول‌ها نشان‌دهنده لزوم مطالعات بیشتر برای درک بهتری از تنظیم NOX2 در عضله اسکلتی است. بنابراین، اگرچه زیرواحد p47<sup>phox</sup> لازمه فعال‌سازی NOX2 است،<sup>۴۳</sup> با این حال، خاموش‌سازی این ژن به غیرفعال‌سازی کامل کمپلکس NOX2 منجر نمی‌شود؛ به بیان دیگر، حذف این زیرواحد، موجب بروز نقص در ژن NOX2 می‌شود. بیان این ژن گرچه پس از یک دوره HIIT در گروه‌های WTt و NDt افزایش یافت، اما این افزایش در هیچ‌یک از دو گروه معنادار نبود.

به طور خلاصه، یافته‌های مطالعه حاضر بار دیگر باور پیشین در رابطه با آثار زیانبار ROS بر روی سلول‌ها را به چالش کشید. در پژوهش حاضر با تمرکز بر آنزیم NOX2، به عنوان منبع اصلی ROS تولیدی حین انقباض در عضله اسکلتی، برای اولین بار نشان داده شد که (۱) بیان ژن IL-15 در عضله اسکلتی موش وابسته به NOX2 است. (۲) تمرین HIIT محرک مناسبی برای افزایش بیان عضلانی IL-15 است؛ به طوری که علی‌رغم ایجاد نقص در ژن NOX2، سطوح پس از تمرین این مایوکاین تقریباً برابر با سطوح پایه آن در حیوانات وحشی، افزایش یافت. اندازه‌گیری سطوح پروتئین IL-15 در بافت عضله اسکلتی به دنبال تمرین HIIT، به بررسی دقیق‌تری از آثار متابولیک این مایوکاین و ارتباط آن با NOX2 منجر خواهد شد. (۳) نقص در ژن NOX2 منجر به تضعیف بیان PGC-1 $\alpha$  به عنوان تنظیم‌کننده اصلی بیورژنز میتوکندریایی، می‌شود. به بیان دیگر، به نظر می‌رسد تولید ROS ناشی از NOX2 در عضله

i - Turnover

ii - Mechanistic target of rapamycin

iii - Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinases

iv - Sirtuins and mitogen-activated protein kinases

v - Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1

استاد دانشگاه خوارزمی، که از ابتدای کار راهنمایی و مشاوره ایشان راهگشای این مطالعه بود، اعلام می‌دارند.

ضمناً، این مقاله برگرفته از بخشی از رساله دکتری لیلا باقرصاد رزانی، دانشجوی دکتری بیوشیمی و متابولیسم ورزشی دانشگاه تهران، می‌باشد.

**تضاد منافع:** نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

در حال فعالیت، القاءکننده یکی از مسیرهای سیگنال‌دهی بیورنز میتوکندریایی به دنبال فعالیت ورزشی باشد. شناسایی این مسیرها و عوامل درگیر در آن نیازمند مطالعات بیشتری است.

**سپاسگزاری:** این مطالعه در دانشگاه کپنهاگ دانمارک و با حمایت مالی جناب آقای دکتر Thomas Elbenhardt Jensen عضو هیات علمی این دانشگاه، انجام شد. بدین‌وسیله نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از ایشان و نیز جناب آقای دکتر حمید رجبی،

## References

- Espinosa A, Henríquez-Olguín C, Jaimovich E. Reactive oxygen species and calcium signals in skeletal muscle: A crosstalk involved in both normal signaling and disease. *Cell Calcium* 2016; 60: 172-9.
- Jackson MJ. Control of reactive oxygen species production in contracting skeletal muscle. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15: 2477-86.
- Strobel NA, Peake JM, Matsumoto A, Marsh SA, Coombes JS, Wadley GD. Antioxidant supplementation reduces skeletal muscle mitochondrial biogenesis. *Med Sci Sports Exerc* 2011; 43: 1017-24.
- Jackson MJ. Redox regulation of muscle adaptations to contractile activity and aging. *J Appl Physiol* (1985) 2015; 119: 163-71.
- Paulsen G, Hamarsland H, Cumming KT, Johansen RE, Hulmi JJ, Børsheim E, et al. Vitamin C and E supplementation alters protein signaling after a strength training session, but not muscle growth during 10 weeks of training. *J Physiol* 2014; 592: 5391-408.
- Qi Z, He Q, Ji L, Ding S. Antioxidant supplement inhibits skeletal muscle constitutive autophagy rather than fasting-induced autophagy in mice. *Oxid Med Cell Longev* 2014; 2014: 315896.
- Sakellariou GK, Jackson MJ, Vasilaki A. Redefining the major contributors to superoxide production in contracting skeletal muscle. The role of NAD (P)H oxidases. *Free Radic Res* 2014; 48: 12-29.
- Sakellariou GK, Vasilaki A, Palomero J, Kayani A, Zibrik L, McArdle A, et al. Studies of mitochondrial and nonmitochondrial sources implicate nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase(s) in the increased skeletal muscle superoxide generation that occurs during contractile activity. *Antioxid Redox Signal* 2013; 18: 603-21.
- Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 181-9.
- Scheele C, Nielsen S, Pedersen BK. ROS and myokines promote muscle adaptation to exercise. *Trends Endocrinol Metab* 2009; 20: 95-9.
- Vassilakopoulos T, Karatza MH, Katsaounou P, Kollintza A, Zakyntinos S, Roussos C. Antioxidants attenuate the plasma cytokine response to exercise in humans. *J Appl Physiol* (1985) 2003; 94: 1025-32.
- Pedersen BK, Febbraio MA. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol* 2012; 8: 457-65.
- Pistilli EE, Quinn LS. From anabolic to oxidative: reconsidering the roles of IL-15 and IL-15R $\alpha$  in skeletal muscle. *Exerc Sport Sci Rev* 2013; 41: 100-6.
- Pistilli EE, Bogdanovich S, Garton F, Yang N, Gulbin JP, Conner JD, et al. Loss of IL-15 receptor  $\alpha$  alters the endurance, fatigability, and metabolic characteristics of mouse fast skeletal muscles. *J Clin Invest* 2011; 121: 3120-32.
- Crane JD, MacNeil LG, Lally JS, Ford RJ, Bujak AL, Brar IK, et al. Exercise-stimulated interleukin-15 is controlled by AMPK and regulates skin metabolism and aging. *Aging Cell* 2015; 14: 625-34.
- Krolopp JE, Thornton SM, Abbott MJ. IL-15 Activates the Jak3/STAT3 Signaling Pathway to Mediate Glucose Uptake in Skeletal Muscle Cells. *Front Physiol* 2016; 7: 626.
- Cochran AJ, Percival ME, Tricarico S, Little JP, Cermak N, Gillen JB, et al. Intermittent and continuous high-intensity exercise training induce similar acute but different chronic muscle adaptations. *Exp Physiol* 2014; 9: 782-91.
- Hoshino D, Yoshida Y, Kitaoka Y, Hatta H, Bonen A. High-intensity interval training increases intrinsic rates of mitochondrial fatty acid oxidation in rat red and white skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab* 2013; 38: 326-33.
- Mänttari S, Järvillehto M. Comparative analysis of mouse skeletal muscle fibre type composition and contractile responses to calcium channel blocker. *BMC Physiol* 2005; 5: 4.
- Merry TL, Ristow M. Do antioxidant supplements interfere with skeletal muscle adaptation to exercise training? *J Physiol* 2016; 594: 5135-47.
- Steensberg A, van Hall G, Osada T, Sacchetti M, Saltin B, Klarlund Pedersen B. Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. *J Physiol* 2000; 529 Pt 1: 237-42.
- Glund S, Deshmukh A, Long YC, Moller T, Koistinen HA, Caidahl K, et al. Interleukin-6 directly increases glucose metabolism in resting human skeletal muscle. *Diabetes* 2007; 56: 1630-7.
- Fischer CP, Hiscock NJ, Penkowa M, Basu S, Vessby B, Kallner A, et al. Supplementation with vitamins C and E inhibits the release of interleukin-6 from contracting human skeletal muscle. *J Physiol* 2004; 558: 633-45.
- Costford SR, Castro-Alves J, Chan KL, Bailey LJ, Woo M, Belsham DD, et al. Mice lacking NOX2 are hyperphagic and store fat preferentially in the liver. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2014; 306: E1341-53.

25. Henríquez-Olguín C, Díaz-Vegas A, Utreras-Mendoza Y, Campos C, Arias-Calderón M, Llanos P, et al. NOX2 Inhibition Impairs Early Muscle Gene Expression Induced by a Single Exercise Bout. *Front Physiol* 2016; 7: 282.
26. Rinnov A, Yfanti C, Nielsen S, Akerström TC, Peijs L, Zankari A, et al. Endurance training enhances skeletal muscle interleukin-15 in human male subjects. *Endocrine* 2014; 45: 271-8.
27. Zanchi NE, Lira FS, de Siqueira Filho MA, Rosa JC, de Oliveira Carvalho CR, Seelaender M, et al. Chronic low frequency/low volume resistance training reduces pro-inflammatory cytokine protein levels and TLR4 mRNA in rat skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol* 2010; 109: 1095-102.
28. Nielsen AR, Mounier R, Plomgaard P, Mortensen OH, Penkowa M, Speerschneider T, et al. Expression of interleukin-15 in human skeletal muscle effect of exercise and muscle fibre type composition. *J Physiol* 2007; 584: 305-12.
29. Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, et al. A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* 2012; 481:463-8.
30. Molanouri Shamsi M, Hassan ZH, Gharakhanlou R, Quinn LS, Azadmanesh K, Baghersad L, et al. Expression of interleukin-15 and inflammatory cytokines in skeletal muscles of STZ-induced diabetic rats: effect of resistance exercise training. *Endocrine* 2014; 46: 60-9.
31. Molanouri Shamsi M, Hassan ZM, Quinn LS, Gharakhanlou R, Baghersad L, Mahdavi M. Time course of IL-15 expression after acute resistance exercise in trained rats: effect of diabetes and skeletal muscle phenotype. *Endocrine* 2015; 49: 396-403.
32. Pilegaard H, Saltin B, Neufer PD. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1 $\alpha$  gene in human skeletal muscle. *J Physiol* 2003; 546: 851-8.
33. Russell AP, Feilchenfeldt J, Schreiber S, Praz M, Crettenand A, Gobelet C, et al. Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in skeletal muscle. *Diabetes* 2003; 52: 2874-81.
34. Bassel-Duby R, Olson EN. Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. *Annu Rev Biochem* 2006; 75: 19-37. Review.
35. Kang C, O'Moore KM, Dickman JR, Ji LL. Exercise activation of muscle peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 $\alpha$  signaling is redox sensitive. *Free Radic Biol Med* 2009; 47: 1394-400.
36. Abadi A, Crane JD, Ogborn D, Hettinga B, Akhtar M, Stokl A, et al. Supplementation with  $\alpha$ -lipoic acid, Co-Q10, and vitamin E augments running performance and mitochondrial function in female mice. *PLoS One* 2013; 8: e60722.
37. Meier P, Renga M, Hoppeler H, Baum O. The impact of antioxidant supplements and endurance exercise on genes of the carbohydrate and lipid metabolism in skeletal muscle of mice. *Cell Biochem Funct* 2013; 31: 51-9.
38. Hidalgo C, Sánchez G, Barrientos G, Aracena-Parks P. A transverse tubule NADPH oxidase activity stimulates calcium release from isolated triads via ryanodine receptor type 1 S -glutathionylation. *J Biol Chem* 2006; 281: 26473-82.
39. Pick E. Role of the Rho GTPase Rac in the activation of the phagocyte NADPH oxidase: outsourcing a key task. *Small GTPases* 2014; 5: e27952.
40. Pal R, Palmieri M, Loehr JA, Li S, Abo-Zahrah R, Monroe TO, et al. Src-dependent impairment of autophagy by oxidative stress in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun* 2014; 5: 4425.
41. Bost ER, Frye GS, Ahn B, Ferreira LF. Diaphragm dysfunction caused by sphingomyelinase requires the p47 (phox) subunit of NADPH oxidase. *Respir Physiol Neurobiol* 2015; 205: 47-52.
42. Lassègue B, San Martín A, Griendling KK. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circ Res* 2012; 110: 1364-90.
43. Jackson SH, Gallin JI, Holland SM. The p47phox mouse knock-out model of chronic granulomatous disease. *J Exp Med* 1995; 182: 751-8.

Original Article

# The Role of NADPH Oxidase 2 in Regulating IL-15 and PGC-1 $\alpha$ Gene Expressions Following a Period of High Intensity Interval Training

Baghersad Renani L<sup>1</sup>, Ravasi AA<sup>1</sup>, Shabkhiz F<sup>1</sup>, Jensen T.E.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Physical Education and Sport Sciences, University of Tehran, I.R. Iran, <sup>2</sup>Section of Molecular Physiology, Department of Nutrition, Exercise and Sports, University of Copenhagen, Denmark

e-mail: L.baghersad@gmail.com

Received: 09/10/2018 Accepted: 06/01/2019

## Abstract

**Introduction:** Following training, Reactive Oxygen Species (ROS) play a crucial role in the regulation of signaling pathways and adaptations in skeletal muscle, including mitochondrial biogenesis and improvement in insulin sensitivity a ROS-induced physical activity can also stimulate myokine production in skeletal muscle. The aim of this work was hence to investigate the role of NADPH Oxidase-2 (NOX2), the main source of ROS generation, in contracting muscle in IL-15 gene expression, as well as any changes in PGC-1 $\alpha$ , as a key regulator of mitochondrial biogenesis, following a period of High-intensity Interval Training (HIIT). **Materials and Methods:** Mice were divided into four groups: Wild type (WT) control (WTc) and training (WTt), NOX-2 deficient (ND) control (NDc) and training (NDt). Training groups performed 6-week HIIT, including 2-min running intervals with 100% of their maximum running speed and 2-min rest with 30% of this speed for a total of 60 min; speed was increased 1m/min each week. IL-15, PGC-1 $\alpha$  and NOX2 mRNA levels in gastrocnemius muscle were analyzed using Real time. **Results:** Basal levels of IL-15 mRNA in NDc group were significantly lower than the other groups. Relative gene expression in WTc, WTt, NDc and NDt changed for IL-15 1, 1.15, 0.49 and 0.99 and for PGC-1 $\alpha$  1, 1.73, 0.76 and 1.4 times, respectively in WTt. Post-training muscle PGC-1 $\alpha$  mRNA levels increased significantly. **Conclusion:** Results indicate that IL-15 gene expression in mouse skeletal muscle is dependent on NOX2. And apparently NOX2 deficiency may result in impaired PGC-1 $\alpha$  expression and subsequently diminished mitochondrial biogenesis.

**Keywords:** Reactive oxygen species, NADPH Oxidase 2, IL-15, skeletal muscle, High intensity interval training