



تأثیر محدودیت غذایی با یا بدون تمرين ورزشی بر بیان ژن های بتا-کاتنین و گلیکوژن سنتاز کیناز-۳- بتا در عضله اسکلتی موش های صحرایی نر

حسن پور رضی: استادیار فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه علوم اجتماعی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران (*نویسنده مسئول)
 pourrazi@soc.ikiu.ac.ir; purrazi.h@gmail.com
 مسعود اصغر پور ارشد: استادیار فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت بدنی، دانشگاه علوم انتظامی امین، تهران، ایران

چکیده

کلیدواژه ها

محدودیت غذایی،
تمرين ورزشی،
Wnt مسیر
عضله اسکلتی، رت نر

زمینه و هدف: محدودیت غذایی و تمرين ورزشی یکی از مداخلات کاربردی برای کاهش وزن و افزایش طول عمر می باشد. با این حال، ابهاماتی در رابطه با تأثیر محدودیت غذایی با یا بدون تمرين ورزشی بر توده و قدرت عضلانی وجود دارد و هنوز مسیر پیامرسانی و پروتئین های درگیر در این زمینه به طور دقیق مشخص نشده اند. بنابراین، مطالعه حاضر با هدف تعیین تأثیر محدودیت غذایی با یا بدون تمرين ورزشی بر بیان ژن های بتا-کاتنین و گلیکوژن سنتاز کیناز-۳- بتا در عضله نعلی موش های صحرایی نر انجام گردید.

روش کار: ۲۴ موش صحرایی نریه شکل تصادفی در سه گروه کنترل، محدودیت غذایی+تمرين ورزشی و محدودیت غذایی+تمرين ورزشی جایگزین شدند. طی سه ماه پژوهش، گروه کنترل به صورت آزادانه به آب و غذا دسترسی داشت، در حالی که غذای گروه های دارای محدودیت غذایی تا حد ۵۰ درصد گروه کنترل محدود شد. گروه محدودیت غذایی+تمرين ورزشی علاوه بر محدودیت غذایی، به مدت ۱۲ هفته در برنامه هی تمرين ورزشی شرکت کرد. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرين، عضله اسکلتی موش های صحرایی استخراج و میزان بیان ژن های بتا-کاتنین و گلیکوژن سنتاز کیناز-۳- بتا با استفاده از روش Real Time-PCR بررسی شد. داده های حاصله توسط آرمون تحلیل واریانس یک طرفه و تغییبی توکی تجزیه و تحلیل شدند ($p < 0.05$).

یافته ها: بیان ژن بتا-کاتنین در عضله نعلی گروه محدودیت غذایی و محدودیت غذایی+تمرين ورزشی به طوری غیر معنی داری کمتر از گروه کنترل بود (به ترتیب $\%38$ و $\%40$ ؛ $p < 0.05$). در حالی که بیان ژن گلیکوژن سنتاز کیناز-۳- بتا در گروه محدودیت غذایی به طور معنی داری بیشتر از گروه کنترل و محدودیت غذایی+تمرين ورزشی بود (به ترتیب $\%44$ و $\%40$ ؛ $p < 0.01$).

نتیجه گیری: در کل ۱۲ هفته محدودیت غذایی (50%)، موجب افزایش بیان ژن کلیدی گلیکوژن سنتاز کیناز-۳- بتا در مسیر پیامرسانی Wnt محدودیت غذایی شد و این ممکن است با کاهش توده و قدرت عضله اسکلتی همراه باشد. با این حال، اضافه شدن تمرين ورزشی به محدودیت غذایی ممکن است این روند را کند نماید.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: حامی مالی نداشته است.

شیوه استناد به این مقاله:

Pourrazi H, Asgharpour-arshad M. Effect of dietary restriction with or without exercise training on β -catenin and glycogen synthase kinase-3 β gene expression in skeletal muscle of male rats. Razi J Med Sci. 2019;26(1):78-88.

* منتشر این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 1.0 صورت گرفته است.



Original Article

Effect of dietary restriction with or without exercise training on β -catenin and glycogen synthase kinase-3 β gene expression in skeletal muscle of male rats

Hassan Pourrazi, Assistant Professor of Exercise Physiology, Department of Physical Education, Faculty of Social Sciences, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran (*Corresponding author) pourrazi@soc.ikiu.ac.ir; pourrazi.h@gmail.com

Masoud Asgharpour-arshad, Assistant Professor of Exercise Physiology, Department of Physical Education, Amin Police University, Tehran, Iran

Abstract

Background: Dietary restriction and exercise training are practical intervention for weight loss and increasing lifespan. However, the effect of dietary restriction with or without exercise training on muscle mass and strength remain unclear. In addition, signaling process and proteins involved in this field have not been clearly specified. Therefore, the purpose of this study was investigating the effect of dietary restriction with or without exercise training on β -catenin and glycogen synthase kinase-3 β gene expression in soleus muscle of male rats.

Methods: 24 male rats randomly divided into three groups: control (Con), dietary restriction (DR) and dietary restriction+ exercise training (DR+EX). Within three months of research, All animals in Con group were fed ad libitum, while animals of DR and DR+EX group had daily access to 50% of the intake of the ad libitum-fed Con animals. Rats in DR+EX group participated in the exercise training program for 12 weeks. 48 hours after the last training session, the skeletal muscle of rats were extracted and β -catenin and glycogen synthase kinase-3 β mRNA evaluated by Real Time-PCR. One-way ANOVA and post-hoc Tukey were applied for statistical analysis of the data ($p<0.05$).

Results: β -catenin gene expression of DR and DR+EX group was no-significantly lower than the Con group (38% and 8.8% respectively, $p>0.05$). However, glycogen synthase kinase-3 β gene expression of DR group was significantly higher than the Con and DR+EX group (449% and 177% respectively, $p<0.05$).

Conclusion: Overall, a 12-week dietary restriction (-50%) increased the glycogen synthase kinase-3 β gene expression in Wnt-signaling pathway of skeletal muscle. This may be associated with a decreased muscle mass and strength. However, it is likely that the addition of exercise training to dietary restriction alleviates loss of skeletal muscle.

Conflicts of interest: None

Funding: None

Keywords

Dietary restriction,
Exercise training,
Wnt pathway,
Skeletal muscle,
Male rat

Received: 09/12/2018

Accepted: 13/02/2019

Cite this article as:

Pourrazi H, Asgharpour-arshad M. Effect of dietary restriction with or without exercise training on β -catenin and glycogen synthase kinase-3 β gene expression in skeletal muscle of male rats. Razi J Med Sci. 2019;26(1):78-88.

This work is published under CC BY-NC-SA 1.0 licence.



کنار مسیرهایی مانند مسیر IGF-1/Akt/mTOR میتوانستین و میوزنیک‌ها یکی از مهمترین مسیرهای پیام رسانی در گیر در هایپرتروفی عضلات اسکلتی هستند (۱۵-۱۱). مسیر Wnt جزو مسیرهای پیام رسانی سلولی برای کنترل فعالیت ژنتیکی سلول محسوب می‌شود که از طریق اتصال لیگاند به گیرنده آن فعال شده و موجب فعال شدن عامل‌های رونویسی ویژه خود در سیتوزول می‌گردد. طبق مدل فعلی مسیر Wnt، بازیگر اصلی مسیر تبدیل پیام درون سلولی در مهره داران، بتا-کاتنین نام دارد. این پروتئین چند عملکردی هم به عنوان عامل رونویسی و هم به عنوان پروتئین رابط بین غشاء و اسکلت سلولی عمل می‌نماید. در غیاب پیام Wnt، بتا-کاتنین توسط مجموعه‌ای مشتمل از مولکول‌های زیر فسفریله می‌شود: گلیکوژن سنتاز کیناز-۳ (GSK3) یعنی همان پروتئین کینازی که گلوکز خون را تنظیم می‌نماید؛ پروتئین پولیپ آدنومایی کولون (APC)؛ و آکسین. سپس بتا-کاتنین فسفریله، یوبی‌کوئیتینه شده و در پروتئازوم‌ها تجزیه می‌گردد (۱۷-۱۵). با این حال و در حضور Wnt، آکسین به ناحیه سیتوزولی کمک-گیرنده متصل می‌شود. این اتصال، مجموعه حاوی GSK3 و بتا-کاتنین را متلاشی کرده، مانع از فسفریلاسیون بتا-کاتنین توسط GSK3 و موجب پایدار شدن بتا-کاتنین در سیتوزول می‌شود. در این بین، بتا-کاتنین رها شده به هسته منتقل می‌شود تا به کمک عامل‌های رونویسی مختلف، بیان ژن‌های هدف خاص را کنترل نماید (۱۵-۱۷). لذا تنظیم افزایشی مسیر Wnt در عضلات اسکلتی می‌تواند با افزایش بیان پروتئین گلیکوژن سنتاز کیناز-۳ همراه شود که نتیجه آن افزایش فعالیت فاکتورهای رونویسی میوزنیک و هایپرتروفی عضلانی است (۱۸-۲۰). همچنین، Verhees و همکاران در سال ۲۰۱۱ اشاره داشتند که گلیکوژن سنتاز کیناز-۳ به طور مستقل می‌تواند مسیرهای آتروفی و پروتئازی عضله اسکلتی را فعال کند (۲۱). با این حال، مطالعات بسیار اندکی در مورد تأثیر محدودیت غذایی با یا بدون

متداول برای کاهش وزن در افراد دارای اضافه وزن یا چاق می‌باشد. همچنین، بسیاری از افراد به دلیل اثرات مفید مرتبط با سلامتی محدودیت غذایی، اقدام به کاهش میزان دریافت مواد غذایی روزانه خود می‌کنند (۱، ۲). از طرفی، با توجه به اهمیت شکل و ظاهر بدن در بین نوجوانان و جوانان، استفاده از دوره‌های محدودیت غذایی طولانی مدت در بین این قشر مهم جامعه شیوع گستره‌های یافته است (۳). اغلب مطالعات اشاره دارند که توده بدتی کلدر پاسخ به محدودیت غذایی طولانی مدت و دوره‌های تعادل منفی انرژی کاهش می‌باشد. در این بین، سهم بافت آدیپوز از این کاهش توده بدنبی حدود ۷۵ درصد و سهم بافت بدون چربی حدود ۲۵ درصد است (۴، ۵). اگرچه تغییر عده در ترکیب بدن متعاقب محدودیت غذایی طولانی مدت، کاهش چربی بدن است که می‌تواند سودمند نیز باشد، اما کاهش توده عضلات اسکلتی ممکن است نتایج منفی بر فرآیندهای متابولیکی، عملکرد عضلانی و جسمانی داشته باشد. از طرفی، هر گونه آتروفی، کاهش توده و قدرت عضلانی ارتباط تنگاتنگی با افت عملکرد، افزایش خطر آسیب و نیز افزایش خطر ناتوانی‌های جسمانی و بیماری‌های عضلانی از جمله سارکوپنیا، دیستروفی‌های عضلانی و تخریب عضله دارد (۶-۸). در این بین، برخی از متخصصان حوزه تغذیه و فیزیولوژی ورزشی اشاره دارند که استفاده از تمرینات ورزشی همراه با محدودیت غذایی می‌تواند به روند کاهش وزن و حفظ توده بدون چربی کمک نماید (۵، ۹، ۱۰). تمرینات ورزشی هوایی و استقامتی از جمله رایج‌ترین فعالیت‌های ورزشی است که اغلب افراد و حتی ورزشکاران رشته‌های ورزشی مختلف با هدف کاهش یا کنترل وزن و چربی از آن‌ها استفاده می‌کنند. با این حال، هنوز فرآیندهای مولکولی و پروتئین‌های در گیر در این زمینه به طور دقیق مشخص نشده‌اند. در این راستا، برخی از شواهد و مدارک اخیر اشاره دارند که مسیر پیام رسانی Wnt و پروتئین‌های دخیل در آن، در

$12:12 \pm 5$ درصد) و چرخه‌ی روشنایی- تاریکی ($12:12 \pm 5$ ساعته - نگهداری شدند. در طی این دوره، تمامی آزمودنی‌های به صورت آزادانه از غذای استاندارد حیوانی (پلت) و آب استفاده می‌کردند و میزان غذای مصرفی روزانه آنها به صورت دقیق اندازه‌گیری و ثبت می‌شد. ترکیب غذای مصرفی عبارت بود از: ۴٪-۵٪ چربی، حدود ۲۰٪ پروتئین، ۵۵٪-۵۰٪ کربوهیدرات، ۸٪ فیبر و ۱۰٪-۱۲٪ رطوبت و خاکستر. موش‌ها پس از مطابقت وزنی به طور تصادفی به سه گروه کنترل ($n=8$)، محدودیت غذایی ($n=8$) و محدودیت غذایی+تمرین ورزشی ($n=8$) جایگزین شدند.

پروتکل محدودیت غذایی: آزمودنی‌های گروه کنترل به صورت آزادانه از غذای استاندارد و آب در طول سه ماه دوره‌ی پژوهش (فصل پائین) استفاده کردند. در طول این دوره، میزان غذای مصرفی آزمودنی‌های گروه کنترل برای تعیین مقدار غذای گروه محدودیت غذایی و گروه محدودیت غذایی+تمرین ورزشی، به صورت روزانه و دقیق اندازه‌گیری می‌شد. میانگین غذای مصرفی این آزمودنی‌ها در طول این دوره حدود 23 ± 2 گرم در روز بود. بدین ترتیب، دو گروه دارای محدودیت غذایی تنها 50 درصد مقدار غذای مصرفی گروه کنترل را دریافت می‌کردند (حدود 11.5 ± 1 گرم در روز) که این مقدار نیز به صورت دو وعده‌ای و طی دوره 12 ساعته تاریکی به موش‌های دارای محدودیت غذایی داده می‌شد.

پروتکل تمرین ورزشی: در ابتداء نمونه‌ها به مدت 14 روز تحت برنامه‌ی آشنایی با نحوه فعالیت روی نوارگردان قرار گرفتند. در طی این دوره، شبیب نوارگردان صفر درصد، سرعت $10-15$ متر بر دقیقه و مدت تمرین $10-5$ دقیقه در روز بود. آزمودنی‌های گروه محدودیت غذایی+تمرین ورزشی برای 5 روز در هفته (یکشنبه، دوشنبه، سه‌شنبه، پنجشنبه و جمعه) و به مدت 12 هفته در برنامه تمرین هوایی روی نوارگردان الکترونیکی هوشمند حیوانی شرکت کرد. شدت نسبی کار در سرتاسر برنامه‌ی تمرین معادل 25 درصد اکسیژن مصرفی بیشینه ($24-33$ متر/دقیقه) با شبیب (15%) حفظ شد. مدت زمان تمرین از 10 دقیقه در روز در هفته‌ی اول شروع و به 60 دقیقه در روز در هفته‌ی پنجم رسیده و تا انتهای دوره حفظ شد (24).

تمرینات ورزشی بر مسیر پیام رسانی Wnt و پروتئین‌های آن مانند بتا-کاتنین و گلیکوژن سنتاز کیناز-۳ وجود دارد و تأثیر واقعی محدودیت غذایی با یا بدون تمرین ورزشی بر این مسیر مهم پیام رسان سلولی به طور کامل روش نیست. در این راستا، Li و همکاران در سال 2012 با بررسی تغییرات مسیر Wnt/ β -catenin متعاقب محدودیت کالریکی 25 درصدی در موش‌های صحرایی عنوان داشتند که محدودیت کالریکی ملایم موجب ترمیم سطح پیام رسانی Wnt/ β -catenin و افزایش بیان بتا-کاتنین در موش‌های پیر می‌شود (22). با این حال و برخلاف نتایج مطالعه مذکور، Patel و همکاران در سال 2010 اشاره داشتند که محدودیت غذایی طولانی مدت می‌تواند موجب افزایش فعالیت پروتئازی در عضله اسکلتی Amyotrophic lateral (ALS) sclerosis شود (23). به هر حال، با توجه به محدودیت‌های غذایی طولانی مدت و غالباً شدیدی که بیشتر افراد با یا بدون تمرین ورزشی برای کاهش وزن یا پیشگیری از چاقی مورد استفاده قرار می‌دهند و با توجه به نقش حساس و کلیدی عضلات اسکلتی در سلامتی و عملکرد، این موضوع یکی از نگرانی‌ها و چالش‌های جدی است که می‌تواند ذهن پژوهشگران و حتی اغلب افراد جامعه را به خود جلب کند. به علاوه، هنوز فرآیندهای مولکولی و پروتئین‌های درگیر در مسیرهای مختلف منجر به هایپرتروفی یا آتروفی عضلانی متعاقب محدودیت‌های غذایی به طور دقیق و کامل مشخص نشده‌اند. از این‌رو، تحقیق حاضر با هدف بررسی تأثیر محدودیت غذایی با یا بدون تمرین ورزشی بر بیان ژن‌های بتا-کاتنین و گلیکوژن سنتاز کیناز-۳ بتا در عضله اسکلتی موش‌های صحرایی نز انجام شد.

روش کار

حیوانات آزمایشگاهی: این مطالعه در قالب یک طرح تجربی با گروه کنترل انجام شد. با توجه به شرایط مناسب مدل حیوانی برای مطالعه‌ی حاضر، 24 موش صحرایی نر دوماهه ویستار 14848 از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. جهت جلوگیری از استرس و تغییر شرایط فیزیولوژیکی، نمونه‌ها به مدت دو هفته تحت شرایط جدید - دما (22 ± 2 سانتی‌گراد)، رطوبت محیط

جدول ۱- برنامه ۱۲ هفته تمرین هوایی روی نوارگردان

هفتاهای تمرین											اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم	هفتم	نهم	دهم	یازدهم	دوازدهم
۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۴۵	۳۵	۲۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
۳۳	۳۲	۳۱	۳۰	۲۹	۲۸	۲۷	۲۶	۲۶	۲۵	۲۵	۲۵	۲۴	۲۴	۲۴	۲۴	۲۴	۲۴	۲۴	۲۴	۲۴	۲۴
۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵

سپس مجدداً در آب تیمار شده با دی اتیل پیروکربنات (DEPC) حل شد. پس از استخراج RNA، مقدار و خلوص آن توسط روش اسپکتروفوتومتری (Bio-Rad, CA, USA) بررسی شد. همچنین، RNA تام به وسیله الکتروفورز روی ژل آگاروز حاوی اتیدیوم بروماید و RNA مشاهده دو باند مشخص ۱۸S و ۲۸S مربوط به RNA استخراج شده برای ریبوزومی کنترل شد. RNA استخراج شده برای استفاده بعدی در دمای ۸۰- درجه نگهداری شد (۲۵). ساخت cDNA: از کیت (Fermentas., Canada) RevertAID™ First Standard cDNA synthesis طبق دستورالعمل شرکت سازنده بصورت زیر استفاده شد: یک میکرولیتر RNA و یک میکرولیتر از DNase I reaction buffer 10X میلی لیتری DEPC-treated eater ریخته شده و توسط میکرولیتر رسید. یک میکرولیتر DNase به تیوب اضافه (برای از بین بردن آلودگی احتمالی با DNA) و پس از افزودن یک میلی لیتر از اتانول مطلق، تیوب مربوطه به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر -۷۰ درجه قرار گرفت. تیوب مربوطه به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط چهار درجه و ۱۴۰۰g سانتریفیوژ شد و پس از آن، در زیر هود به دقت اتانول خالی شده و حدود ۱۰ دقیقه اجازه داده شد تا الكل تبخیر گردید. به تیوب مربوطه oligo میکرولیتر DEPC-treated water و یک میکرولیتر Random hexamer Primer (dt) یا Dry block reaction buffer 5X و دو میکرولیتر dNTP 10mM mix و یک میکرولیتر Ribolock Ribonuclease Inhibitor به تیوب افزوده شد و پس از سانتریفیوژ مختصراً، به مدت پنج دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه گردید. یک میکرولیتر RverertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase به تیوب قبل افزوده شد. در ادامه در صورت استفاده از پرایمر (dt) oligo، شش دقیقه در ۴۲ درجه و در

جراحی و استخراج نمونه: تمامی موش‌های صحرایی پس از اتمام سه ماه دوره پژوهش، توسط تزریق درون صفاقی کتمانی (۹۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) و زایلارین (۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) بی‌هوش و پس از آن بخش اعظم خون (حدود ۴-۵ سی سی) از قسمت سینوس چشمی و بوسیله لوله‌های مؤینه جمع‌آوری شد. سپس موش‌ها بلافضله توسط متخصصین کارآزموده جراحی و عضله نعلی آنها استخراج و وزن کشی شد. سپس نمونه در کرایوتیوب در نیتروژن مایع قرار داده شده و برای بررسی‌های بعدی در دمای ۸۰- درجه نگهداری شد.

استخراج RNA: برای استخراج RNA از نمونه‌ها، طبق روش پیشنهادی کیت (ThermoK0731., USA) و با اندکی تغییرات به شرح زیر عمل شد. حدود ۵۰ میلی گرم از بافت عضله نعلی در حضور یک میلی لیتر لایزر بافر هموژنه شده و سپس به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس به هر میکروتیوب ۰/۲ میلی لیتر کلروفروم افزوده شد و میکروتیوب به شدت با دست به مدت ۱۵ ثانیه تکان داده شده و پنج دقیقه در دمای چهار درجه انکوبه گردید و در ادامه به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط چهار درجه و ۱۳۷۰g سانتریفیوژ شد. سپس به دقت و بدون تکان دادن تیوب، فاز روئی که حاوی RNA بود، جداسازی گردید و به میکروتیوب دیگر منتقل شده و به محلول جداسده حجم مساوی از ایزوپروپانول سرد اضافه گردید و برای ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه انکوبه شد. بعد از آن میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه در شرایط چهار درجه و ۱۳۷۰g سانتریفیوژ شده، مایع روئی بیرون ریخته شده و سپس یک میلی لیتر اتانول ۸۰ درصد به میکروتیوب اضافه گردید. بلافضله میکروتیوب به مدت پنج دقیقه در شرایط چهار درجه و ۱۳۷۰g سانتریفیوژ شده، مایع روئی بیرون ریخته شد و به دقت اتانول خالی شد و حدود ۲۰ دقیقه اجازه داده شد تا الكل تبخیر گردد.

جدول ۲- توالی پرایمرهای بیان ژنی عضله علی موشهای صحرابی

Genes	Primer sequence Product	Length (bp)
β-catenin	F: 5'GTCAGTGCAGGAGGCCGAG 3' R: 5'GCAGCTTTCTGTCCGGCTC 3'	148
GSK3-β	F:5'CCTTGCGGAGAGCTGCAAG 3' R: 5' ACTGACTTCCTGTGGCCTGT 3'	140
β-actin	F: 5'CTCTGTGGATCGGTGGCT 3' R:5'GCAGCTCAGTAACAGTCCGC 3'	138

محاسبات آماری در سطح معنی داری ۰/۰۵ و با استفاده از نرم افزار SPSS19 انجام شد.

یافته‌ها

بر اساس نتایج حاصل از آزمون کلموگروف اسپیرنوف، اختلاف معنی داری بین نمونه‌ی در دسترس با جامعه‌ی مورد نظر مشاهده نشد؛ بنابراین داده‌های جمع‌آوری شده همگن بوده و منحنی مربوط به این نمونه طبیعی فرض شد. برخی از ویژگی‌های موشهای صحرابی مورد مطالعه در جدول ۳ نشان داده شده است. بر اساس نتایج پژوهش حاضر، تفاوت معنی داری بین گروه کنترل با دو گروه محدودیت غذایی و محدودیت غذایی+تمرین ورزشی در رابطه با وزن نهایی بدن و وزن عضله علی مشاهده شد ($p < 0.01$) به طوری که گروه کنترل دارای وزن بدنی و وزن عضله علی بزرگتری نسبت به دو گروه دارای محدودیت غذایی بود. با این حال تفاوت معنی داری بین دو گروه محدودیت غذایی و محدودیت غذایی+تمرین ورزشی در رابطه با وزن نهایی بدن و وزن عضله علی مشاهده نشد ($p > 0.05$).

در رابطه با شاخص‌های مربوط به مسیر پیامرسانی Wnt، نتایج نشان داد که تفاوت معنی داری بین سه گروه کنترل، محدودیت غذایی و محدودیت غذایی+تمرین ورزشی در بیان ژن بتا-کاتنین وجود ندارد ($p > 0.05$). با این حال، میزان بیان ژن بتا-کاتنین در گروه محدودیت غذایی و محدودیت غذایی+تمرین ورزشی نسبت به گروه کنترل به ترتیب حدود ۰.۳۸٪ و ۰.۸٪ کمتر بود (نمودار ۱). این در حالی است که تفاوت معنی داری بین سه گروه کنترل، محدودیت غذایی و محدودیت غذایی+تمرین ورزشی در بیان ژن گلیکوژن سنتاز کیناز-۳ بتا مشاهده شد ($p < 0.05$). در این راستا، میزان بیان ژن گلیکوژن سنتاز کیناز-۳ بتا در

صورت استفاده از Random hexamer primer، ابتدا پنج دقیقه در ۲۵ درجه و به دنبال آن ۹۰ دقیقه در ۴۲ درجه انکوباسیون صورت گرفت. واکنش با قراردادن تیوب به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه پایان پذیرفت و نمونه در فریزر -۷۰ درجه نگهداری شد.

Real-time PCR: برای اندازه گیری میزان بیان ژن پپروتئین‌های بتاکاتنین و گلیکوژن سنتاز کیناز-۳ بتا از دستگاه مربوطه (Corbett-Rotor gene-6000) استفاده شد. حفظ پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از نرم افزار 3 Primer (Bioneer-Germany) طراحی شده و توسط بایونیر (Bioneer-Germany) سنتز شده و برای کار با غلظت نهایی ۱۰۰ nm مورد استفاده قرار گرفتند.

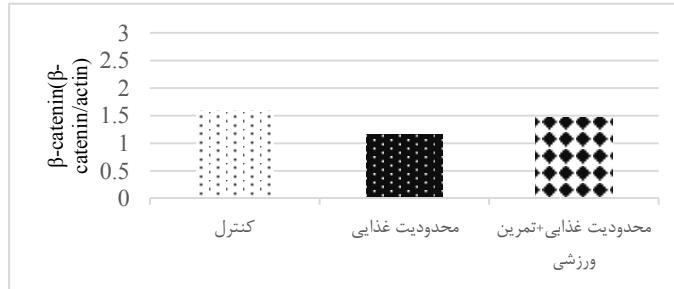
پرایمرهای واکنش‌ها بر مبنای استفاده از رنگ SYBR green I انجام شد. SYBR green I طی واکنش Real-time PCR به DNA دو رشته‌ای متصل شده و نور فلورسنت ساطع می‌کند. در جدول ۲ توالی پرایمرهای بیان ژنی برای موشهای صحرابی مشخص شده است. به عنوان بلانک از تیوبی که حاوی همه مواد موجود در واکنش به جز cDNA یود، استفاده شد و به جای cDNA، به تیوب مربوطه DEPC water افزوده شد. در پایان قبل از آنالیز داده‌ها، منحنی ذوب (Melting curve)، بدست آمده از هر واکنش Real-time PCR بررسی شد تا پیک مربوط به ژن مورد نظر و فقدان پرایمر دائم تایید شود. برای آنالیز داده‌ها ابتدا، ΔCt در هر نمونه از افتراق Ct ژن مربوطه و Ct ژن β -actin به عنوان مرجع محاسبه شد (۲۶).

تجزیه و تحلیل آماری: در بخش تجزیه و تحلیل داده‌ها، ابتدا توزیع توأم و بهنجار توسط آزمون کلموگروف - اسپیرنوف مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس داده‌های حاصله توسط آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و تعقیبی توکی مورد بررسی قرار گرفتند. تمامی

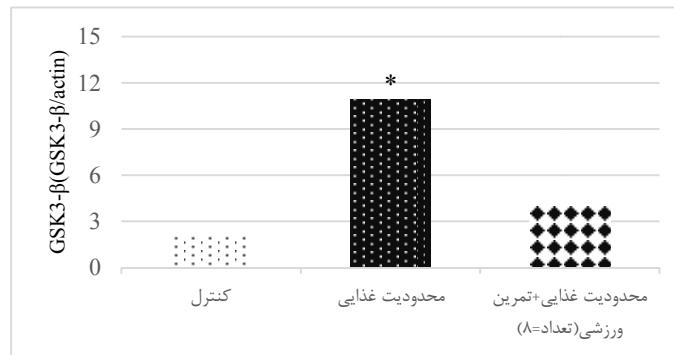
جدول ۳- مشخصات موش‌های صحرایی در گروه‌های مورد مطالعه

محدودیت غذایی+تمرين ورزشی (n=8)	محدودیت غذایی (n=8)	کنترل (n=8)	وزن ابتدایی بدن (گرم) وزن نهایی بدن (گرم) وزن عضله نعلی (گرم) دریافت غذا (گرم/روز)
۳۱۹/۳۴±۲۰/۳۱	۳۱۴±۲۲/۱۷	۳۲۲/۱۲±۲۱/۵۷	وزن ابتدایی بدن (گرم)
۲۳۳/۵±۲۷/۵	۲۳۱/۴۲±۲۱/۰۱	۳۸۵/۲۵±۲۹/۶*	وزن نهایی بدن (گرم)
۰/۰۶۱±۰/۰۲	۰/۰۵۴±۰/۰۱	۰/۰۷۲±۰/۰۱*	وزن عضله نعلی (گرم)
۱۱/۵±۱	۱۱/۵±۱	۲۳±۲	دریافت غذا (گرم/روز)

نسبت به دو گروه دیگر: *p<0/05



نمودار ۱- میزان بیان زن بتا-کاتینین در گروه‌های مورد مطالعه



نمودار ۲- میزان بیان زن گلیکوژن سنتاز کیناز-۳-بتا در گروه‌های مورد مطالعه؛ نسبت به دو گروه دیگر: *p<0/05

وزن عضله نعلی شد. با این حال، محدودیت غذایی همراه با تمرين ورزشی در کنترل اثرات کاهنده محدودیت غذایی بر وزن عضله نعلی موثر بود به طوری که وزن عضله نعلی در گروه محدودیت غذایی+تمرين ورزشی نسبت به گروه محدودیت غذایی به طور غیرمعنی‌دار و حدود ۱۱ درصد بیشتر بود. ب) محدودیت غذایی ۵۰ درصد چه با و چه بدون تمرين ورزشی تغییر معنی‌داری در بیان زن بتا-کاتینین در عضله نعلی ایجاد نکرد. با این حال، میزان بیان زن بتا-کاتینین در گروه محدودیت غذایی نسبت به گروه محدودیت غذایی+تمرين ورزشی حدود ۲۰ درصد کمتر بود. ج) محدودیت غذایی ۵۰ درصد موجب افزایش قابل توجه بیان زن گلیکوژن سنتاز کیناز-۳-بta در عضله

گروه محدودیت غذایی نسبت به گروه کنترل و محدودیت غذایی+تمرين ورزشی به طور معنی‌داری بیشتر بود (به ترتیب ۴۴٪ و ۱۷٪٪؛ p<0/05؛ p<0/05؛ اما تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل و گروه محدودیت غذایی+تمرين ورزشی وجود نداشت (p>0/05). اگرچه میزان بیان زن گلیکوژن سنتاز کیناز-۳-بta در گروه محدودیت غذایی+تمرين ورزشی نسبت به گروه کنترل حدود ۹۸٪ بیشتر بود (نمودار ۲).

بحث و نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر، یافته‌های اصلی می‌تواند به شکل زیر خلاصه شود: الف) محدودیت غذایی ۵۰ درصد چه با و چه بدون تمرين ورزشی موجب کاهش وزن بدن و

این وجود، بدون بررسی وضعیت ترکیب بدنی آزمودنی‌ها به ویژه تعیین تغییرات بافت چربی و بافت بدون چربی کل بدن متعاقب دوره‌های محدودیت غذایی با و بدون تمرین ورزشی، اظهار نظر در رابطه با آتروفی عضله اسکلتی در موش‌های دارای محدودیت غذایی دشوار است.

براساس یافته‌های مطالعه حاضر، اثر محدودیت غذایی به تنها‌یی و همراه با تمرین ورزشی بر بیان ژن بتا-کاتنین عضله نعلی موش‌های صحرایی قابل توجه نبود. با این حال، میزان بیان ژن بتا-کاتنین در گروه محدودیت غذایی و محدودیت غذایی+تمرین ورزشی نسبت به گروه کنترل به ترتیب حدود $38\text{~}\frac{8}{8}$ درصد کمتر بود. این احتمال وجود دارد که اضافه شدن تمرین ورزشی به محدودیت غذایی روند کاهش بیان تام و یا فسفوریلاسیون پروتئین بتا-کاتنین ناشی از محدودیت غذایی را کند کرده باشد. تغییرات بیان این ژن - بتا-کاتنین - اغلب در قالب وابسته به تغییرات ژن تنظیم‌گر آن یعنی ژن گلیکوژن سنتاز کیناز-۳ بتا مورد بحث قرار می‌گیرد. در این راستا، افزایش بیان و یا فعالیت ژن گلیکوژن سنتاز کیناز-۳ که با اتصال آن به بتا-کاتنین همراه است موجب فسفریله شدن بتا-کاتنین می‌شود. بتا-کاتنیفسفریله شده، یوبی‌کوئیتینه شده و در پروتازوم‌ها تجزیه می‌گردد (۱۵-۱۷). اگرچه در پژوهش حاضر تفاوت معنی‌داری بین دو گروه محدودیت غذایی و محدودیت غذایی+تمرین ورزشی مشاهده نشد، اما بیان ژن بتا-کاتنین در گروه محدودیت غذایی+تمرین ورزشی نسبت به گروه محدودیت غذایی حدود $30\text{~}\frac{3}{3}$ درصد بیشتر بود. در این راستا، آشناخ و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش کردند که دفسفریلاسیون بتا-کاتنین و فعال شدن آن رابطه مثبت و معنی‌داری با تخلیه گلیکوژن عضله طی فعالیت ورزشی دارد. به عبارتی، با افزایش شدت فعالیت و تخلیه هرچه بیشتر گلیکوژن عضله، میزان فسفریله شدن بتا-کاتنین کاهش یافته و موجب افزایش تام بتا-کاتنین و فعالیت آن می‌شود (۶). همچنین، در پژوهش حاضر میزان بیان ژن گلیکوژن سنتاز کیناز-۳ بتا در گروه محدودیت غذایی به طور قابل توجهی بیشتر از دو گروه کنترل و محدودیت غذایی+تمرین ورزشی بود. در این راستا، اگرچه میزان بیان ژن گلیکوژن سنتاز کیناز-

نعلی شد در حالی که محدودیت غذایی همراه با تمرین ورزشی در کاهش اثرات فزاینده محدودیت غذایی بر بیان ژن گلیکوژن سنتاز کیناز-۳ بتا عضله نعلی موثر بود به طوری که بیان ژن گلیکوژن سنتاز کیناز-۳ بتا در گروه محدودیت غذایی نسبت به گروه محدودیت غذایی+تمرین ورزشی به طور معنی‌دار و حدود ۱۷۷ درصد بیشتر بود.

با توجه به نتایج پژوهش حاضر، سه ماه محدودیت غذایی با و بدون تمرین ورزشی موجب کاهش معنی‌دار وزن بدن و وزن عضله نعلی در موش‌های صحرایی نر شد. در این راستا وزن بدن در گروه محدودیت غذایی حدود $40\text{~}\frac{4}{4}$ درصد و در گروه محدودیت غذایی+تمرین ورزشی حدود $39\text{~}\frac{3}{3}$ درصد کمتر از گروه کنترل بود. همچنین، وزن عضله نعلی در گروه محدودیت غذایی حدود $25\text{~}\frac{2}{2}$ درصد و در گروه محدودیت غذایی+تمرین ورزشی حدود $15\text{~}\frac{1}{1}$ درصد کمتر از گروه کنترل بود. این موضوع با توجه به کاهش دریافت مواد غذایی و انرژی در گروه‌های دارای محدودیت غذایی نسبت به گروه کنترل با دسترسی آزاد به غذا، آن هم برای مدت سه ماه دور از انتظار نبود چنانکه در تمام مطالعات قبلی نیز حتی با دوره‌های محدودیت غذایی کوتاه مدت نیز کاهش وزن بدن و عضله مشاهده شده است. Carbone و همکاران در سال ۲۰۱۲ عنوان داشتند که محدودیت غذایی و تعادل منفی انرژی موجب افزایش فرآیند پروتولیز کل بدن، اکسیداسیون اسیدهای آمینه و دفع نیتروژن می‌شود که می‌تواند موجب کاهش بازیابی و سنتز پروتئین عضلانی گردد (۴). آن چه که در بخش تغییرات ویژگی‌های فیزیکی آزمودنی‌های مورد مطالعه در تحقیق حاضر مهم جلوه می‌کند، تاثیر همراهی تمرین ورزشی با محدودیت غذایی در کنترل اثرات کاهنده محدودیت غذایی بر وزن عضله نعلی و حفظ این بافت سوماتیک مهم است، به طوری که آتروفی و کاهش وزن عضله نعلی در گروه محدودیت غذایی+تمرین ورزشی نسبت به گروه محدودیت غذایی کمتر بود. همراستا با نتایج مطالعه حاضر، Weinheimer و همکاران در سال ۲۰۱۰ در یک مقاله مروری اشاره داشتند که اضافه شدن تمرین ورزشی به محدودیت غذایی موجب کند شدن روند کاهش توده عضله اسکلتی در افراد سالخورده و جوان می‌شود (۵). با

حاضر برمی‌آید این است که تمرين ورزشی با این اثر فزاینده محدودیت غذایی بر بیان ژن β -GSK3 مقابله می‌کند. بر اساس برخی از شواهد و مدارک، کاهش و غیرفعال شدن GSK3- β طی تمرينات ورزشی احتمالاً بواسطه سازوکارهای مستقل از مسیر AKt باشد. در این راستا، Aschenbach و همکاران در سال ۲۰۰۶ عنوان داشتند که تنظیم GSK3- β در طی تمرينات و فعالیتهای ورزشی توسط Dvl (Dishvelled) protein (protein) صورت می‌گیرد که به عنوان یکی از اجزای اصلی مسیر پیام‌رسانی Wnt است. بر این اساس، رابطه بین β -GSK3 و Dvl در طی فعالیت ورزشی، وابسته به مدت و شدت فعالیت، قوی‌تر می‌شود به طوری که با افزایش فعالیت مسیر Wnt و پروتئین‌های Dvl، از میزان بیان تام و دفسفریله GSK3- β کاسته می‌شود (۶). اگرچه تا این لحظه و بر اساس بررسی‌های ما، مطالعه مشابهی با این چنین پروتکل‌های محدودیت غذایی و ورزشی به ندرت اجرا شده است، اما برخلاف نتایج مطالعه حاضر، Li و همکاران در سال ۲۰۱۲ با بررسی تغییرات مسیر Wnt/ β -catenin متعاقب محدودیت کالریکی در قلب موش‌های صحرایی عنوان داشتند که مسیر پیام‌رسانی Wnt/ β -catenin در قلب موش‌های پیر دچار تنظیم کاهشی (Down-regulated) می‌شود، ولی محدودیت کالریکی موجب ترمیم سطوح پیام‌رسانی Wnt/ β -catenin و افزایش بیان بتا-کاتنین در قلب موش‌های پیر می‌شود (۲۲). دلیل اصلی این تناقض را می‌توان به قرارداد محدودیت غذایی، نوع بافت مورد مطالعه و سن موش‌های صحرایی نسبت داد. به طوری که لی و همکاران در سال ۲۰۱۲ از یک محدودیت کالریکی ۲۵ درصدی و ملايم استفاده کرده بودند که براساس توضیحات بخش‌های قبلی، احتمالاً این محدودیت ملايم با کاهش پیام‌رسانی مسیر AKt آن هم در بافت قلبی همراه نبوده و شرایط را برای فعال شدن و دفسفریلاسیون بتا-کاتنین فراهم کرده است، ولی در مطالعه حاضر از یک محدودیت غذایی ۵۰ درصدی استفاده شد که موجب افزایش شدید بیان ژن GSK3- β و کاهش بیان ژن بتا-کاتنین در عضله اسکلتی موش‌های صحرایی شد. با این حال، با توجه به محدودیت‌های پژوهش حاضر مانند عدم اندازه‌گیری تغییرات مورفولوژیکی، ارزیابی بیان سایر ژن‌های درگیر

۳ بتا در گروه محدودیت غذایی+تمرين ورزشی نسبت به گروه کنترل حدود ۹۸ درصد بیشتر بود، اما همراهی تمرين ورزشی با محدودیت غذایی روند فزاینده بیان ژن گلیکوزن سنتاز کیناز-۳ بتا در عضله نعلی را کند کرد. چندین پژوهش اشاره داشتند که گلیکوزن سنتاز کیناز-۳ بتا به عنوان یک تنظیم کننده منفی (Negative regulator) هایپرتروفی در سلول‌های عضلانی C₂C₁₂ عمل می‌کند (۲۷، ۲۸)؛ در حالی که کاهش بیان گلیکوزن سنتاز کیناز-۳ بتا و فسفریله شدن آن با تجمع هسته‌ای بتاکاتنین همراه است. تجمع هسته‌ای بتاکاتنین منتج به افزایش شکل‌گیری کمپلکس‌هایی با خانواده فاکتورهای نسخه برداری T cell (Lymphoid enhancer factors) factor می‌شود (۲۹). این فرآیند با فعال سازی نسخه برداری ژن‌های هدف پرای تحریک سنتز، ترمیم و بازیابی سلول‌های عضلاتی همراه است (۳۰، ۲۹). اگر چه در مطالعه حاضر به دلیل محدودیت‌های موجود امکان ارزیابی شاخص‌های دیگر مانند قند خون، انسولین و مسیر پیام‌رسانی آنها ممکن نشد، ولی این احتمال نیز وجود دارد که در شرایطی مانند محدودیت غذایی یا گرسنگی طولانی مدت، مسیر پیام‌رسانی AKt دچار تنظیم کاهشی شود. در چنین شرایطی احتمال افزایش بیان تام پروتئین GSK3- β و دفسفریلاسیون آن وجود دارد (۳۱). بر خلاف محدودیت غذایی و هنگام افزایش ترشح انسولین، این هورمون با اتصال به گیرنده‌های خود موجب فعال شدن PI3K می‌شود. Fعال شدن PI3K با پیوتید فسفولیپیدهای آن به همراه می‌باشد که این وضعیت سبب جابه‌جایی AKt از سیتوپلاسم به سطح داخلی غشای پلاسمایی می‌شود. در سطح داخلی غشا، AKt توسط کینازهای پائین دستی مانند PDK-1، PDK-2 و ILK با فسفریله و فعال شدن AKt با فسفریله و غیرفعال شدن β -GSK3 مهراه است. با این حال، در غیاب پیام‌رسانی انسولین و محور PI3K/AKt، این فرآیند بر عکس می‌شود و مشابه با نتایج مطالعه حاضر، افزایش تام و فعال شدن پروتئین GSK3- β با فسفریله شدن بتا-کاتنین همراه است. سپس بتا-کاتنین فسفریله، یوبی کوئیتینه شده و در پروتئازوم‌ها تجزیه می‌گردد (۳۱). با این حال، آن چه از نتایج پژوهش

3. Ahern AL, Hetherington MM. The thin ideal and body image: An experimental study of implicit attitudes. *Psychol Addict Behav*; 2006;20(3):338.
4. Carbone JW, McClung JP, Pasiakos SM. Skeletal muscle responses to negative energy balance: effects of dietary protein. *Adv Nutr*; 2012;3(2):119-26.
5. Weinheimer EM, Sands LP, Campbell WW. A systematic review of the separate and combined effects of energy restriction and exercise on fat-free mass in middle-aged and older adults: implications for sarcopenic obesity. *Nutr Rev*; 2010;68(7):375-88.
6. Aschenbach WG, Ho RC, Sakamoto K, Fujii N, Li Y, Kim Y-B, et al. Regulation of Dishevelled and β -catenin in rat skeletal muscle: an alternative exercise-induced GSK-3 β signaling pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 2006;291(1):E152-E8.
7. Owens DJ. Nutritional Support to Counteract Muscle Atrophy. *Muscle Atrophy*: Springer; 2018. p. 483-95.
8. Yoshida S, Yamahara K, Kume S, Koya D, Yasuda-Yamahara M, Takeda N, et al. Role of dietary amino acid balance in diet restriction-mediated lifespan extension, renoprotection, and muscle weakness in aged mice. *Aging cell*; 2018;17(4):e12796.
9. Cheng CC, Hsu CY, Liu JF. Effects of dietary and exercise intervention on weight loss and body composition in obese postmenopausal women: a systematic review and meta-analysis. *Menopause*; 2018;25(7):772-82.
10. Miller T, Mull S, Aragon AA, Krieger J, Schoenfeld BJ. Resistance Training Combined With Diet Decreases Body Fat While Preserving Lean Mass Independent of Resting Metabolic Rate: A Randomized Trial. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*; 2018;28(1):46-54.
11. Girardi F, Le Grand F. Wnt Signaling in Skeletal Muscle Development and Regeneration. *Progress in molecular biology and translational science*. 153; Elsevier; 2018. p. 157-79.
12. Roberts MD, Haun CT, Mobley CB, Mumford PW, Romero MA, Roberson PA, et al. Physiological differences between low versus high skeletal muscle hypertrophic responders to resistance exercise training: current perspectives and future research directions. *Front Physiol*; 2018;9:834.
13. Leal ML, Lamas L, Aoki MS, Ugrinowitsch C, Ramos MSC, Tricoli V, et al. Effect of different resistance-training regimens on the WNT-signaling pathway. *Euro J Appli Physiol*; 2011;111(10):2535-45.
14. Spillane M, Schwarz N, Willoughby DS. Upper-body resistance exercise augments vastus lateralis androgen receptor-DNA binding and canonical Wnt/ β -catenin signaling compared to lower-body resistance exercise in resistance-trained men without an acute increase in serum testosterone. *Steroids*; 2015;98:63-71.

در مسیر پیام رسانی Wnt، بررسی سایر مسیرهای پیام رسانی مرتبط با آنزیم گلیکوژن سنتاز کیناز-۳ بتا و اندازه‌گیری محتوی پروتئین‌های موردنظر توسط روش وسترن بلات، اظهار نظر قطعی در مورد نحوه تأثیرپذیری شاخص‌های مربوط به مسیر پیام رسانی Wnt در عضله اسکلتی از محدودیت غذایی با یا بدون تمرینات ورزشی، منوط به انجام تحقیقات و مطالعات بیشتر در این زمینه می‌باشد.

در کل و براساس نتایج مطالعه حاضر می‌توان عنوان کرد که محدودیت غذایی طولانی مدت و بالای متوسط، با وجود تأثیرات عملکردی مثبت همچون کاهش وزن بدن، احتمالاً می‌تواند موجب کاهش وزن عضله اسکلتی و آتروفی آن نیز شود. همچنان، این روند با افزایش معنی دار بیان ژن گلیکوژن سنتاز کیناز-۳ بتا و کاهش غیرمعنی دار بتا-کاتین به عنوان پروتئین‌های کلیدی درگیر در مسیر پیام رسانی Wnt همراه است که نهایتاً می‌تواند باعث توقف سنتز پروتئین و هایپرآتروفی عضله اسکلتی شود. در این بین، اضافه شدن تمرین ورزشی هوازی به محدودیت غذایی می‌تواند تا حدودی این روند فراینده منجر به آتروفی عضلانی را کند نماید. با این حال، اظهار نظر قطعی در زمینه مسیرهای منجر به آتروفی یا هایپرآتروفی عضله اسکلتی متعاقب محدودیت غذایی با یا بدون تمرینات ورزشی مختلف، منوط به انجام تحقیقات و مطالعات بیشتر می‌باشد.

تقدیر و تشکر

نویسنده‌گان از جناب آقای دکتر فرزام شیخ زاده به خاطر زحمات و همکاری صمیمانه کمال تشکر را دارند. ضمناً تمامی هزینه‌های این پژوهش به صورت شخصی بوده و هیچ سازمانی حمایت مالی نکرده است.

References

1. Stiegler P, Cunliffe A. The role of diet and exercise for the maintenance of fat-free mass and resting metabolic rate during weight loss. *Sports Med*; 2006;36(3):239-62.
2. Barquissau V, Léger B, Beuzelin D, Martins F, Amri EZ, Pisani DF, et al. Caloric restriction and diet-induced weight loss do not induce browning of human subcutaneous white adipose tissue in women and men with obesity. *Cell Rep*; 2018;22(4):1079-89.

15. Willert K, Nusse R. Wnt proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*; 2012;4(9):a007864.
16. Li F, Chong Z, Maiese K. Winding through the WNT pathway during cellular development and demise. *Histol Histopathol*; 2006;21(1):103.
17. Sakamoto K, Arnolds DE, Ekberg I, Thorell A, Goodyear LJ. Exercise regulates Akt and glycogen synthase kinase-3 activities in human skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*; 2004;319(2):419-25.
18. Schakman O, Kalista S, Bertrand L, Lause P, Verniers J, Ketelslegers J-M, et al. Role of Akt/GSK-3 β /β-catenin transduction pathway in the muscle anti-atrophy action of insulin-like growth factor-I in glucocorticoid-treated rats. *Endocrinology*; 2008; 149(8):3900-8.
19. Ishido M, Uda M, Masuhara M, Kami K. Alterations of M-cadherin, neural cell adhesion molecule and β-catenin expression in satellite cells during overload-induced skeletal muscle hypertrophy. *Acta Physiol*; 2006;187(3):407-18.
20. Bashiri J, NourAzar A, Pourrazi H. [Effect of three months aerobic training on Wnt-signaling pathway in skeletal muscle of male rats]. *Razi J Med Sci*; 2017;24(160):7-16. (persian)
21. Verhees KJ, Schols AM, Kelders MC, Op den Kamp CM, van der Velden JL, Langen RC. Glycogen synthase kinase-3 β is required for the induction of skeletal muscle atrophy. *Amer J Physiol Cell Physiol*; 2011;301(5):C995-C1007.
22. Li Q, Hannah SS. Wnt/β-catenin signaling is downregulated but restored by nutrition interventions in the aged heart in mice. *Arch Gerontol Geriatr*; 2012;55(3):749-54.
23. Patel BP, Safdar A, Raha S, Tarnopolsky MA, Hamadeh MJ. Caloric restriction shortens lifespan through an increase in lipid peroxidation, inflammation and apoptosis in the G93A mouse, an animal model of ALS. *PLoS One*. 2010;5(2):e9386.
24. Naito H, Powers SK, Demirel HA, Aoki J. Exercise training increases heat shock protein in skeletal muscles of old rats. *Med Scie Sport Exerc*; 2001;33(5):729-34.
25. Nootash S, Sheikhzadeh N, Baradaran B, Oushani AK, Moghadam MRM, Nofouzi K, et al. Green tea (*Camellia sinensis*) administration induces expression of immune relevant genes and biochemical parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol*; 2013;35(6):1916-23.
26. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST $^{\circledR}$) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*; 2002;30(9):e36-e.
27. Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, et al. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI (3) K/Akt/mTOR and PI (3) K/Akt/GSK3 pathways. *Natu cell Biol*; 2001;3(11):1009.
28. Vyas DR, Spangenburg EE, Abraha TW, Childs TE, Booth FW. GSK-3 β negatively regulates skeletal myotube hypertrophy. *Amer J Physiol Cell Physiol*; 2002;283(2):C545-C51.
29. Petropoulos H, Skerjanc IS. β-Catenin is essential and sufficient for skeletal myogenesis in P19 cells. *J Biol Chem*; 2002;277(18):15393-9.
30. Fujimaki S, Hidaka R, Asashima M, Takemasa T, Kuwabara T. Wnt-mediated satellite cell conversion in adult and aged mice following voluntary wheel running. *J Biol Chem*; 2014; jbc.M113.539247.
31. Sharma M, Chuang WW, Sun Z. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt stimulates androgen pathway through GSK3 β inhibition and nuclear β-catenin accumulation. *J Biol Chem*; 2002;277(34):30935-41.