



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

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

### چکیده

#### کلیدواژه‌ها

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

**زمینه و هدف:** محدودیت غذایی و تمرین ورزشی یکی از مداخلات کاربردی برای کاهش وزن و افزایش طول عمر می‌باشد. با این حال، ابهاماتی در رابطه با تأثیر محدودیت غذایی با یا بدون تمرین ورزشی بر توده و قدرت عضلانی وجود دارد و هنوز مسیر پیام‌رسانی و پروتئین‌های درگیر در این زمینه به طور دقیق مشخص نشده‌اند. بنابراین، مطالعه حاضر با هدف تعیین تأثیر محدودیت غذایی با یا بدون تمرین ورزشی بر بیان ژن‌های بتا-کاتنین و گلیکوژن سنتاز کیناز ۳-بتا در عضله نعلی موش‌های صحرایی نر انجام گردید.

**روش کار:** ۲۴ موش صحرایی نر به شکل تصادفی در سه گروه کنترل، محدودیت غذایی و محدودیت غذایی+تمرین ورزشی جایگزین شدند. طی سه ماه پژوهش، گروه کنترل به صورت آزادانه به آب و غذا دسترسی داشت، در حالی که غذای گروه‌های دارای محدودیت غذایی تا حد ۵۰ درصد گروه کنترل محدود شد. گروه محدودیت غذایی+تمرین ورزشی علاوه بر محدودیت غذایی، به مدت ۱۲ هفته در برنامه‌ی تمرین ورزشی شرکت کرد. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، عضله اسکلتی موش‌های صحرایی استخراج و میزان بیان ژن‌های بتا-کاتنین و گلیکوژن سنتاز کیناز ۳-بتا با استفاده از روش Real Time-PCR بررسی شد. داده‌های حاصله توسط آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند ( $p < 0.05$ ).

**یافته‌ها:** بیان ژن بتا-کاتنین در عضله نعلی گروه محدودیت غذایی و محدودیت غذایی+تمرین ورزشی به طوری غیر معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود (به ترتیب ۳۸٪ و ۸٪/۰۵؛  $p > 0.05$ ). در حالی که بیان ژن گلیکوژن سنتاز کیناز ۳-بتا در گروه محدودیت غذایی به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل و محدودیت غذایی+تمرین ورزشی بود (به ترتیب ۴۹٪ و ۱۷۷٪/۰۱؛  $p < 0.01$ ).

**نتیجه‌گیری:** در کل، ۱۲ هفته محدودیت غذایی (۵۰٪)، موجب افزایش بیان ژن کلیدی گلیکوژن سنتاز کیناز ۳-بتا در مسیر پیام‌رسانی Wnt عضله نعلی شد و این ممکن است با کاهش توده و قدرت عضله اسکلتی همراه باشد. با این حال، اضافه شدن تمرین ورزشی به محدودیت غذایی ممکن است این روند را کند نماید.

**تعارض منافع:** گزارش نشده است.

**منبع حمایت‌کننده:** حامی مالی نداشته است.

شیوه استناد به این مقاله:

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

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

## Effect of dietary restriction with or without exercise training on $\beta$ -catenin and glycogen synthase kinase-3 $\beta$ 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](mailto:pourrazi@soc.ikiu.ac.ir); [purrazi.h@gmail.com](mailto:purrazi.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  $\beta$ -catenin and glycogen synthase kinase-3 $\beta$  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  $\beta$ -catenin and glycogen synthase kinase-3 $\beta$  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:**  $\beta$ -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 $\beta$  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 $\beta$  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  $\beta$ -catenin and glycogen synthase kinase-3 $\beta$  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](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).



کنار مسیرهایی مانند مسیر IGF-1/Akt/mTOR، میواستاتین و میوژنیک‌ها یکی از مهمترین مسیره‌های پیام‌رسانی درگیر در هایپرتروفی عضلات اسکلتی هستند (۱۱-۱۵). مسیر Wnt جزو مسیره‌های پیام‌رسانی 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 Wnt در مهره‌داران، 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 متشکل 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، یوبی کوئیتینه شده و در پروتئازوم‌ها تجزیه می‌گردد (۱۵-۱۷). 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 بتا-کاتنین و به تبع آن با کاهش بیان و فعالیت پروتئین گلیکوژن سنتاز کیناز-۳ همراه شود که نتیجه آن افزایش فعالیت فاکتورهای رونویسی میوژنیک و هایپرتروفی عضلانی است (۱۸-۲۰). همچنین، Verhees و همکاران در سال ۲۰۱۱ اشاره داشتند که گلیکوژن سنتاز کیناز-۳ به طور مستقل می‌تواند مسیره‌های آتروفی و پروتئازومی عضله اسکلتی را فعال کند (۲۱). با این حال، مطالعات بسیار اندکی در مورد تأثیر محدودیت غذایی با یا بدون

محدودیت غذایی یا کالریکی یکی از روش‌های متداول برای کاهش وزن در افراد دارای اضافه وزن یا چاقی 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 گسترده‌ای یافته است (۳). اغلب مطالعات اشاره دارند که توده بدنی کلدی پاسخ به محدودیت غذایی طولانی مدت و دوره‌های تعادل منفی انرژی کاهش می‌یابد. در این بین، سهم بافت آدیپوز از این کاهش توده بدنی حدود ۷۵ درصد و سهم بافت بدون چربی حدود ۲۵ درصد است (۴، ۵). اگرچه تغییر عمده در ترکیب بدن متعاقب محدودیت غذایی طولانی مدت، کاهش چربی بدن است که می‌تواند سودمند نیز باشد، اما کاهش توأم 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 هوازی 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 پروتئینی‌های درگیر در این زمینه به طور دقیق مشخص نشده‌اند. در این راستا، برخی از شواهد و مدارک اخیر اشاره دارند که مسیر پیام‌رسانی Wnt و پروتئین‌های دخیل در آن، در

( $50 \pm 5$  درصد) و چرخه‌ی روشنایی- تاریکی ۱۲:۱۲ 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 اندازه گیری و ثبت می‌شد. ترکیب غذای مصرفی عبارت بود از: ۵-۴٪ چربی، حدود ۲۰٪ پروتئین، ۵۵-۵۰٪ کربوهیدرات، ۸-۵٪ فیبر و ۱۲-۱۰٪ 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 پائیز) 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  $23 \pm 2$  گرم در روز بود. بدین ترتیب، دو گروه دارای محدودیت غذایی تنها ۵۰ درصد مقدار غذای مصرفی گروه کنترل را دریافت می‌کردند (حدود  $11/5 \pm 1$  گرم در روز) که این مقدار نیز به صورت دو وعده‌ای و طی دوره ۱۲ ساعته تاریکی به موش‌های دارای محدودیت غذایی داده می‌شد.

پروتکل تمرین ورزشی: در ابتدا نمونه‌ها به مدت ۱۴ روز تحت برنامه‌ی آشنایی با نحوه‌ی فعالیت روی نوارگردان قرار گرفتند. در طی این دوره، شیب نوارگردان صفر درصد، سرعت ۱۵-۱۰ متر بر دقیقه و مدت تمرین ۱۰-۵ دقیقه در روز بود. آزمودنی‌های گروه محدودیت غذایی+تمرین ورزشی برای ۵ روز در هفته (یکشنبه، دوشنبه، سه‌شنبه، پنج‌شنبه و جمعه) و به مدت ۱۲ هفته در برنامه تمرین هوازی روی نوارگردان الکترونیکی هوشمند حیوانی شرکت کرد. شدت نسبی کار در سرتاسر برنامه‌ی تمرین معادل ۷۵ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه (۳۳-۲۴ متر/دقیقه با شیب ۱۵٪) حفظ شد. مدت زمان تمرین از ۱۰ دقیقه در روز در هفته‌ی اول شروع و به ۶۰ دقیقه در روز در هفته‌ی پنجم رسیده و تا انتهای دوره حفظ شد (۲۴).

تمرینات ورزشی بر مسیر پیام‌رسانی 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 پیام‌رسان سلولی به طور کامل روشن نیست. در این راستا، Li و همکاران در سال ۲۰۱۲ با بررسی تغییرات مسیر Wnt/ $\beta$ -catenin متعاقب محدودیت کالریکی ۲۵ درصدی در موش‌های صحرایی عنوان داشتند که محدودیت کالریکی ملایم موجب ترمیم سطوح پیام‌رسانی Wnt/ $\beta$ -catenin و افزایش بیان بتا-کاتنین در موش‌های پیر می‌شود (۲۲). با این حال و برخلاف نتایج مطالعه مذکور، Patel و همکاران در سال ۲۰۱۰ اشاره داشتند که محدودیت غذایی طولانی مدت می‌تواند موجب افزایش فعالیت پروتئاز در عضله اسکلتی موش‌های مبتلا به (Amyotrophic lateral sclerosis) ALS شود (۲۳). 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 این رو، 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 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، ۲۴ موش صحرایی نر دوماهه و ۱۴۸۴۸ از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. جهت جلوگیری از استرس و تغییر شرایط فیزیولوژیکی، نمونه‌ها به مدت دو هفته تحت شرایط جدید - دما ( $22 \pm 2$  سانتی‌گراد)، رطوبت محیط

جدول ۱- برنامه ۱۲ هفته تمرین هوازی روی نوارگردان

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

مدت تمرین (دقیقه در روز)

سرعت نوارگردان (متر بر دقیقه)

شیب نوارگردان (درصد)

سپس مجدداً در آب تیمار شده با دی اتیل پیروکربنات (DEPC) حل شد. پس از استخراج RNA، مقدار و خلوص آن توسط روش اسپکتروفتومتری (Bio-Rad, CA, USA) بررسی شد. همچنین، RNA تام به وسیله الکتروفورز روی ژل آگاروز حاوی اتیدیوم بروماید و مشاهده دو باند مشخص ۱۸s و ۲۸s مربوط به RNA 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 در یک تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شده و توسط DEPC-treated eater به حجم نه میکرولیتر رسید. یک میکرولیتر DNase به تیوب اضافه (برای از بین بردن آلودگی احتمالی با DNA) و پس از افزودن یک میلی‌لیتر 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 ۱۴۰۰۰g سانتیفریوژ شد و پس از آن، در زیر هود به دقت اتانول خالی شده و حدود ۱۰ دقیقه اجازه داده شد تا الکل تبخیر گردید. به تیوب مربوطه ۱۱ میکرولیتر DEPC-treated water و یک میکرولیتر oligo (dt) Primer یا Random hexamer Primer افزوده شد و پنج دقیقه در دمای ۷۰ درجه بر روی Dry block انکوبه گردید. چهار میکرولیتر 5X reaction buffer و دو میکرولیتر 10mM mix dNTP و یک میکرولیتر Ribolock Ribonuclease Transcription Inhibitor به تیوب افزوده شد و پس از سانتیفریوژ مختصر، به مدت پنج دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه گردید. یک میکرولیتر RverertAid™ H Minus M-MuLV Reverse آنزیم به تیوب قبل افزوده شد. در ادامه در صورت استفاده از پرایمر oligo (dt)، 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 کتامین (۹۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) بی‌هوش و پس از آن بخش اعظم خون (حدود ۵-۴ سی سی) از قسمت سینوس چشمی و بوسیله لوله‌های موئینه جمع‌آوری شد. سپس موش‌ها بلافاصله 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 میلی‌گرم از بافت عضله نعلی در حضور یک میلی‌لیتر لایز بافر هموژنه شده و سپس به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس به هر میکروتیوب ۰/۲ میلی‌لیتر کلروفورم افزوده شد و میکروتیوب به شدت با دست به مدت ۱۵ ثانیه تکان داده شده و پنج دقیقه در دمای چهاردرجه انکوبه گردید و در ادامه به مدت ۱۵ دقیقه در شرایط چهار درجه و ۱۳۷۰۰g سانتیفریوژ 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 جداشده 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 چهاردرجه و ۱۳۷۰۰g سانتیفریوژ شده، مایع روئی بیرون ریخته شده و سپس یک میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد به میکروتیوب اضافه گردید. بلافاصله میکروتیوب به مدت پنج دقیقه در شرایط چهاردرجه و ۱۳۷۰۰g سانتیفریوژ شده، مایع روئی بیرون ریخته شد و به دقت اتانول خالی شد و حدود ۲۰ دقیقه اجازه داده شد تا الکل تبخیر گردد.

جدول ۲- توالی پرایمرهای بیان ژنی عضله نعلی موش‌های صحرایی

Genes	Primer sequence	Product	Length (bp)
$\beta$ -catenin	F: 5'GTCAGTGCAGGAGGCCGAG 3' R: 5'GCAGCTTTTCTGTCCGGCTC 3'		148
GSK3- $\beta$	F:5'CCTTTGCGGAGAGCTGCAAG 3' R: 5' ACTGACTTCCTGTGGCCTGT 3'		140
$\beta$ -actin	F: 5'CTCTGTGTGGATCGGTGGCT 3' R:5'GCAGCTCAGTAACAGTCCGC 3'		138

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

### یافته‌ها

بر اساس نتایج حاصل از آزمون کلموگروف اسمیرنوف، اختلاف معنی‌داری 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 صحرایی مورد مطالعه در جدول ۳ نشان داده شده است. بر اساس نتایج پژوهش حاضر، تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل با دو گروه محدودیت غذایی و محدودیت غذایی+تمرین ورزشی در رابطه با وزن نهایی بدن و وزن عضله نعلی مشاهده شد ( $p < 0/01$ ) به طوری که گروه کنترل دارای وزن بدنی و وزن عضله نعلی بزرگتری نسبت به دو گروه دارای محدودیت غذایی بود. با این حال تفاوت معنی‌داری بین دو گروه محدودیت غذایی و محدودیت غذایی+تمرین ورزشی در رابطه با وزن نهایی بدن و وزن عضله نعلی مشاهده نشد ( $p > 0/05$ ).

در رابطه با شاخص‌های مربوط به مسیر پیام‌رسانی Wnt، نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری 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 ۳۸٪ و ۸/۸٪ کمتر بود (نمودار ۱). این در حالی است که تفاوت معنی‌داری 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 قرار دادن تیوب به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه پایان پذیرفت و نمونه در فریزر ۷۰- درجه نگهداری شد.

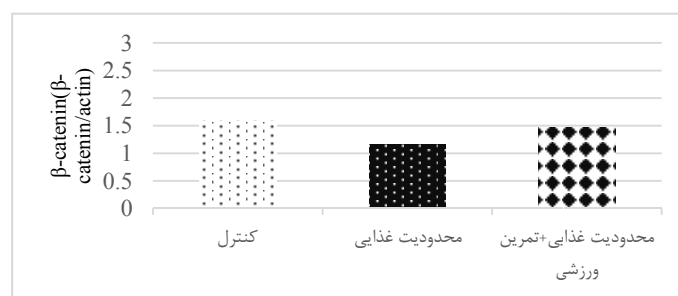
Real-time PCR: برای اندازه‌گیری میزان بیان ژن پیروئتین‌های بتا کاتنین و گلیکوژن سنتاز کیناز ۳-بتا از دستگاه مربوطه (Corbett-Rotor gene-6000 (Corbett., ResearchAustralia) استفاده شد. جفت پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از نرم افزار 3 Primer طراحی شده و توسط بایونیر (Bioneer-Germany) سنتز شده و برای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

پرایمرها: واکنش‌ها بر مبنای استفاده از رنگ SYBR green I انجام شد. SYBR green 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 صحرایی 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 دایمر تایید شود. برای آنالیز داده‌ها ابتدا،  $\Delta Ct$  ژن در هر نمونه از افتراق Ct ژن مربوطه و Ct ژن  $\beta$ -actin به عنوان مرجع محاسبه شد (۲۶).

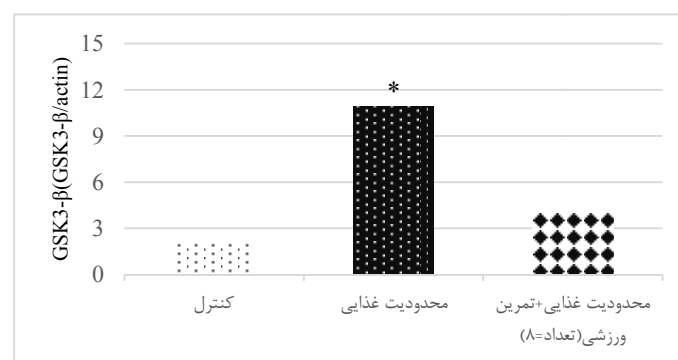
تجزیه و تحلیل آماری: در بخش تجزیه و تحلیل داده‌ها، ابتدا توزیع توأم و بهنجار توسط آزمون کلموگروف - اسمیرنوف مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس داده‌های حاصله توسط آزمون تحلیل واریانس یک-طرفه و تعقیبی توکی مورد بررسی قرار گرفتند. تمامی

جدول ۳- مشخصات موش‌های صحرایی در گروه‌های مورد مطالعه

محدودیت غذایی+تمرین ورزشی (n=8)	محدودیت غذایی (n=8)	کنترل (n=8)	
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 ژن بتا-کاتنین در گروه‌های مورد مطالعه

نمودار ۲- میزان بیان ژن 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 تمرین ورزشی در کنترل اثرات کاهنده محدودیت غذایی بر وزن عضله نعلی موثر بود به طوری که وزن عضله نعلی در گروه محدودیت غذایی+تمرین 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 تمرین ورزشی تغییر معنی‌داری در بیان ژن بتا-کاتنین در عضله نعلی ایجاد نکرد. با این حال، میزان بیان ژن بتا-کاتنین در گروه محدودیت غذایی نسبت به گروه محدودیت غذایی+تمرین ورزشی حدود ۲۰ درصد کمتر بود. ج) محدودیت غذایی ۵۰ درصد موجب افزایش قابل توجه بیان ژن گلیکوژن سنتاز کیناز-۳ بتا در عضله

گروه محدودیت غذایی نسبت به گروه کنترل و محدودیت غذایی+تمرین ورزشی به طور معنی‌داری بیشتر بود (به ترتیب ۴۴۹٪ و ۱۷۷٪؛  $p < 0.05$ ) اما تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل و گروه محدودیت غذایی+تمرین ورزشی وجود نداشت ( $p > 0.05$ ). اگرچه میزان بیان ژن گلیکوژن سنتاز کیناز ۳-بتا در گروه محدودیت غذایی+تمرین 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 تمرین 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 ۳۸ و ۸/۸ 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 بتاکاتنین-اغلب در قالب و 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، یوبی کوئیتینه شده و در پروتئازوم‌ها تجزیه می‌گردد (۱۷-۱۵). 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 ۳۰ درصد بیشتر بود. در این راستا، آشنباخ و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش کردند که دفسفوریلاسیون 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 ۴۰ درصد و در گروه محدودیت غذایی+تمرین ورزشی حدود ۳۹ درصد کمتر از گروه کنترل بود. همچنین، وزن عضله نعلی در گروه محدودیت غذایی حدود ۲۵ درصد و در گروه محدودیت غذایی+تمرین ورزشی حدود ۱۵ 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 پروتئولیز کل بدن، اکسیداسیون اسیدهای آمینه و دفع نیترژن 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 تمرین ورزشی با این اثر فزاینده محدودیت غذایی بر بیان ژن  $GSK3-\beta$  مقابله می‌کند. بر اساس برخی از شواهد و مدارک، کاهش و غیرفعال شدن  $GSK3-\beta$  طی تمرینات ورزشی احتمالاً بواسطه سازوکارهای مستقل از مسیر AKt باشد. در این راستا، Aschenbach و همکاران در سال ۲۰۰۶ عنوان داشتند که تنظیم  $GSK3-\beta$  در طی تمرینات و فعالیت‌های ورزشی توسط Dvl (Dishevelled protein) صورت می‌گیرد که به عنوان یکی از اجزای اصلی مسیر پیام‌رسانی Wnt است. بر این اساس، رابطه بین  $GSK3-\beta$  و Dvl در طی فعالیت ورزشی، وابسته به مدت و شدت فعالیت، قوی‌تر می‌شد به طوری که با افزایش فعالیت مسیر Wnt و پروتئین‌های Dvl، از میزان بیان تام و دفسفریله  $GSK3-\beta$  کاسته می‌شد (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/ $\beta$ -catenin متعاقب محدودیت کالریکی در قلب موش‌های صحرایی عنوان داشتند که مسیر پیام‌رسانی Wnt/ $\beta$ -catenin در قلب موش‌های پیر دچار تنظیم کاهشی (Down-regulated) می‌شود، ولی محدودیت کالریکی موجب ترمیم سطوح پیام‌رسانی Wnt/ $\beta$ -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 ملایم استفاده کرده بودند که براساس توضیحات بخش‌های قبلی، احتمالاً این محدودیت ملایم 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  $GSK3-\beta$  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+تمرین ورزشی نسبت به گروه کنترل حدود ۹۸ درصد بیشتر بود، اما همراهی تمرین ورزشی با محدودیت غذایی روند فزاینده بیان ژن گلیکوژن سنتاز کیناز-۳ بتا در عضله نعلی را کند کرد. چندین پژوهش اشاره داشتند که گلیکوژن سنتاز کیناز-۳ بتا به عنوان یک تنظیم کننده منفی (Negative regulator) هایپرتروفی در سلول‌های عضلانی  $C_2C_{12}$  عمل می‌کند (۲۷، ۲۸)؛ در حالی که کاهش بیان گلیکوژن 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 LEF (Lymphoid enhancer factors) و TCF (T cell factor) می‌شود (۲۹). این فرآیند با فعال سازی نسخه برداری ژن‌های هدف برای تحریک سنتز، ترمیم و باززایی سلول‌های عضلانی همراه است (۲۹، ۳۰). 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  $GSK3-\beta$  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. فعال شدن PI3K با پیوند فسفولیپیدهای آن به AKt 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 فسفریله و فعال می‌شود (۶، ۳۱). فعال شدن AKt با فسفریله و غیرفعال شدن  $GSK3-\beta$  همراه است. با این حال، در غیاب پیام‌رسانی انسولین و محور PI3K/Akt، این فرآیند برعکس می‌شود و مشابه با نتایج مطالعه حاضر، افزایش تام و فعال شدن پروتئین  $GSK3-\beta$  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  $\beta$ -catenin in rat skeletal muscle: an alternative exercise-induced GSK-3 $\beta$  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. *Fronti 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 Appl 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/ $\beta$ -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 سنتازکیناز-3 بتا و اندازه گیری محتوی پروتئین های موردنظر توسط روش وسترن بلات، اظهار نظر قطعی در مورد نحوه تأثیرپذیری شاخص های 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 می باشد.

در کل و براساس نتایج مطالعه حاضر می توان عنوان کرد که محدودیت غذایی طولانی مدت و بالای متوسط، با وجود تاثیرات عملکردی مثبت همچون کاهش وزن بدن، احتمالاً می تواند موجب کاهش وزن عضله اسکلتی و آتروفی آن نیز شود. همچنین، این روند با افزایش معنی دار بیان ژن گلیکوژن سنتازکیناز-3 بتا و کاهش غیرمعنی دار بتا-کاتنین به عنوان پروتئین های کلیدی درگیر در مسیر پیام رسانی Wnt همراه است که نهایتاً می تواند باعث توقف سنتز پروتئین و هایپرتروفی عضله اسکلتی شود. در این بین، اضافه شدن تمرین ورزشی هوازی به محدودیت غذایی می تواند تا حدودی این روند فزاینده منجر به آتروفی عضلانی را کند نماید. با این حال، اظهار نظر قطعی در زمینه مسیرهای منجر به آتروفی یا هایپرتروفی عضله اسکلتی متعاقب محدودیت غذایی با یا بدون تمرینات ورزشی مختلف، منوط به انجام تحقیقات و مطالعات بیشتر می باشد.

### تقدیر و تشکر

نویسندگان از جناب آقای دکتر فرزام شیخ زاده به خاطر زحمات و همکاری صمیمانه کمال تشکر را دارند. ضمناً تمامی هزینه های 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 $\beta$ / $\beta$ -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  $\beta$ -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 $\beta$  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/ $\beta$ -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 $\text{C}$ ) 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 $\beta$  negatively regulates skeletal myotube hypertrophy. *Amer J Physiol Cell Physiol*; 2002.283(2):C545-C51.
29. Petropoulos H, Skerjanc IS.  $\beta$ -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 $\beta$  inhibition and nuclear  $\beta$ -catenin accumulation. *J Biol Chem*; 2002.277(34):30935-41.