مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۹، شماره ۱۰، دی ۱۴۰۱ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

پاسخ پروتئین‌های mTOR، AKT عضلانی به تمرینات مقاومتی مجزا در افراد سالم

سعید علی اعظم: گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

فرشاد غزالیان: دانشیار، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (* نویسنده مسئول) phdghazalian@gmail.com

شهرام سهیلی: استادیار، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

حسین عابد نطنزی: استادیار، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

ماندانا غلامی: استادیار، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: تغییر ساختار عضله اسکلتی به‌عنوان یکی از تغییرات اصلی عضله درنتیجه تمرینات ورزشی شناخته شده است؛ بنابراین هدف از پژوهش حاضر بررسی پاسخ پروتئین‌های AKT،mTOR به تمرینات مقاومتی اکسنتریک و کانسنتریک مجزا در افراد سالم بود.

روش کار: ۱۰ مرد سالم به صورت تصادفی در دو گروه (گروه کانسنتریک ۵ نفرگروه اکسنتریک ۵ نفر) تقسیم شدند. انقباض آیزوکینتیک شامل اکسنتریک و کانسنتریک اکستنشن زانو با حداکثر قدرت و سرعت بود. به منظور همسان‌سازی بارکاری در هر دو پروتکل یکسان در نظر گرفته شد و سرعت رفت‌وبرگشت ۶۰ درجه بر ثانیه بود. انقباض‌ها شامل ۱۲ ست ۱۰ تکراری برای پای راست، زمان استراحت بین هر ست ۳۰ ثانیه در نظر گرفته شد. در ابتدا و انتهای مطالعه بایوپسی انجام شد. بایوپسی در دو جهت دیستال و پروگزیمال عضله پهن جانبی انجام شد. برای بررسی بیان پروتئین‌های mTOR و AKT در هر گروه بررسی بافت ها با تکنیک ایمونو سیتو شیمی استفاده شد. برای تجزیه‌وتحلیل داده‌های از روش آماری تی وابسته و آزمون کوواریانس استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد، تغییرات درون گروهی پروتئین‌های mTOR و AKT بعد از یک جلسه فعالیت، در گروه برونگرا و درونگرا معنادار بود ($p\leq ۰/۰۵$). با این حال تغییرات بین گروهی پروتئین‌های mTOR و AKT نشان دهنده عدم تفاوت بین دو گروه بود.

نتیجه‌گیری: در مجموع مطالعه حاضر نشان داد یک جلسه فعالیت برونگرا و درونگرا منجر به تغییر فاکتورهای درگیر در قدرت و هایپرتروفی عضلات اسکلتی می‌شود. علاوه بر این، این تغییرات در مجموع در انقباض برونگرا بیش از درونگرا است.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت‌کننده: حامی مالی ندارد.

کلیدواژه‌ها

انقباض برونگرا،

انقباض درونگرا،

mTOR،

AKT

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۱۴

تاریخ چاپ: ۱۴۰۱/۱۰/۱۲

شیوه استناد به این مقاله:

Aliazam S, Ghazalian F, Soheili S, Abed Natanzi H, Gholami M. Evaluation of AKT and mTOR Protein Changes in Response to Eccentric and Concentric Physical Activity in Healthy Young Men. Razi J Med Sci. 2023;29(10):403-413.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-10-06]

Razi Journal of Medical Sciences. 2023;29(10):403-413. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

Evaluation of AKT and mTOR Protein Changes in Response to Eccentric and Concentric Physical Activity in Healthy Young Men

Saeed Aliazam: PhD Candidate, Department of Sport Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
Farshad Ghazalian: Associate Professor, Department of Sport Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran (* Corresponding Author) phdghazalian@gmail.com
Shahram Soheili: Assistant Professor, Department of Sport Sciences, Faculty of Sport Sciences, University of Guilan, Guilan, Rasht, Iran
Hossein Abed Natanzi: Assistant Professor, Department of Sport Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
Mandana Gholami: Assistant Professor, Department of Sport Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Background & Aims: The target of Rapamycin is a 290 kDa protein that was created in the 1970s from the isolation of a yeast resistant to cell growth inhibitory properties. Each complex is phosphorylated by a different substrate and is known as the main controller of cell growth. MTOR exists in mammals in the form of Rapamycin, which is divided into two groups, MTORC1 and MTORC2. Each complex performs different tasks according to its location in the cell. This pathway is involved in the regulation of Lipogenesis, glucose metabolism, cytoskeletal activity, and apoptosis (programmed cell death). MTOR creates conditions in the human body that are very suitable for positive cell growth; For example, it is involved in gene expression and translation of various cell proteins (enzymes and contractile proteins), ribosome biogenesis, activation of the protein kinase C (PKC) synthesis pathway that causes muscle growth, and also the strength of the cell skeleton. To be On the other hand, it prevents apoptosis, protein burning (autophagy), and excessive turnover of nutrient carriers, including glucose and amino acids. Inhibition of FoxO proteins by AKT through transcriptional mechanisms increases cell survival. AKT stimulates cell growth and proliferation through mTORC1. It also increases VEGF secretion and eNOS phosphorylation mediates vasodilation and angiogenesis. AKT increases cellular metabolism through downstream targets such as GLUT4 and GSK3. One of the main drivers of mTOR pathway activation is the pressure and mechanical load applied to the muscle. Growth factors, nutrients, hormones, and cytokines are other stimuli of the mTOR pathway. After this stage, AKT improves the activity of two pathways, mTOR and glycogen synthase kinase 3 beta; which play a key role in skeletal muscle hypertrophy in response to strength training. After mTOR is phosphorylated, PV0s6k, which stimulates protein synthesis, is phosphorylated, on the other hand, muscle growth inhibitory factors such as 4e-bpi and eif2 are inhibited. Another importance of the AKT/mTOR pathway is the inhibition and inactivation of the FOXO or FKHR factor. FOXO is the main factor in the activation of the ubiquitin-protease system, which causes the breakdown of contractile proteins. In fact, the AKT/mTOR pathway prevents atrophy and breakdown of skeletal muscle proteins with its activity. Research shows that strength training inhibits FOXO and Atrogenin by activating the AKT/mTOR pathway and thus prevents muscle atrophy. Based on the research conducted on the relationship between mTOR/AKT pathway and sports activity, it can be said that this pathway is activated especially in strength training and for hypertrophy. Of course, it should be said that this route has other duties as well. But in

Keywords
Extrinsic Contraction,
Inward Contraction,
mTOR,
AKT

Received: 05/11/2022
Published: 02/01/2023

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-10-06]

general, it is an anabolic pathway; but how the duration, intensity, and type of exercise affect mTOR/AKT levels in humans is still unanswered. The activity of the mTOR/AKT pathway depends on the age, sex, type, and intensity of the performed activity, the type and rate of contraction speed (introverted-extroverted), and also the type of tar. Therefore, in the present study, the researcher intends to evaluate the expression of mTOR/AKT proteins by comparing a single eccentric and concentric session.

Methods: 10 healthy men were randomly divided into two groups (concentric group of 5 people, eccentric group of 5 people). Isokinetic contraction included eccentric and concentric knee extension with maximal strength and speed. In order to equalize the workload in both protocols, it was considered the same and the round trip speed was 60°/s. The contractions included 12 sets of 10 repetitions for the right leg, the rest time between each set was 30 seconds. A biopsy was performed at the beginning and end of the study. Biopsy was performed in both distal and proximal directions of the vastus lateralis muscle. In order to check the expression of mTOR and AKT proteins in each group, the tissues were examined by immunocytochemistry technique. The dependent t statistical method and covariance test were used to analyze the data.

Results: The results showed that the intragroup changes of mTOR and AKT proteins after one activity session were significant in the extrovert and introvert groups ($p \leq 0.05$). However, the inter-group changes of mTOR and AKT proteins showed no difference between the two groups.

Conclusion: Many adaptations, such as increasing strength and lean mass, are caused by repeated resistance training, and this is due to the high degree of plasticity of skeletal muscle in response to training pressure. Different training stimuli in resistance sports can create different molecular responses related to the special adaptations of skeletal muscle to the type of resistance training. Prescribing a resistance program should be done according to the manipulations done in the variables. Exercise variables include intensity, volume, and time under tension. Manipulation of each of these variables can affect the final result. Of course, it should be kept in mind that manipulating only one variable can make it impossible to study the effect of other variables in molecular responses. In total, the present study showed that a session of eccentric and concentric activity leads to changes in the factors involved in strength and hypertrophy. In addition, these changes are generally greater in eccentric than concentric contractions.

Conflicts of interest: None
Funding: None

Cite this article as:

Aliazam S, Ghazalian F, Soheili S, Abed Natanzi H, Gholami M. Evaluation of AKT and mTOR Protein Changes in Response to Eccentric and Concentric Physical Activity in Healthy Young Men. Razi J Med Sci. 2023;29(10):403-413.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-10-06]

مقدمه

راپامایسین هدف یک پروتئین ۲۹۰ کیلو دالتونی است که در دهۀ ۱۹۷۰ از جداسازی یک مخمر مقاوم در برابر ویژگی‌های مهاری رشد سلول به وجود آمده است (۱). راپامایسین می‌تواند یک عامل ضد سرطانی، ضد قارچ و همچنین ضد سرکوب‌کنندۀ سیستم ایمنی بدن از طریق یک ترکیب تولیدشده از نوعی باکتری به نام را پانوئی باشد (۲). اختلال آن منجر به بروز بیماری‌هایی از قبیل سرطان (سینه، پروستات، تخمدان)، هایپرتروفی قلب و آتروفی عضلانی می‌شود. راپامایسین هدف به دو شکل وجود دارد: مجموعه راپامایسین هدف ۱ (TORC1) و مجموعه راپامایسین هدف ۲ (TORC2) (۳). هر مجموعه با سوبسترای متفاوتی فسفریله می شودوبه‌عنوان کنترل‌کنندۀ اصلی دررشد سلول شناخته می‌شوند (۴). MTOR در پستانداران به‌صورت راپامایسین هدف پستانداران وجود دارد که خود به دو مجموعۀ MTORC1 و MTORC2 تقسیم می‌شود. هر کمپلکس با توجه به محل قرارگیری‌اش در سلول وظایف مختلفی را انجام می‌دهد (۵). MTORC1 ترکیبی از MTOR، S6K، RAPTOR و GβL می‌باشد که رشد سلول را از طریق هماهنگ کردن سنتز پروتئین تنظیم کرده و باعث تجمع توده‌ای از سلول‌ها می‌شود (هایپرتروفی). همچنین در بایوژنز هسته، لیپوژنز، گلیکولیز و آتوفاژیا (خودخوری) نقش دارد (۶). از طرفی MTORC2 از MTOR، RICTOR، SIN1 و GβL تشکیل‌شده است (۷). این مسیر در تنظیم لیپوژنز، متابولیسم گلوکز، فعالیت اسکلت سلولی و آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول) نقش دارد. MTOR در بدن انسان شرایطی را به وجود می‌آورد که برای رشد مثبت سلول بسیار مناسب می‌باشد؛ مثلاً در بیان ژن و ترجمۀ پروتئین‌های مختلف سلول (آنزیم‌ها و پروتئین‌های انقباضی)، بایوژنز ریبوزومی، فعال کردن مسیر سنتزی پروتئین کیناز C (PKC) که باعث رشد عضله می‌شود و همچنین استحکام اسکلت سلولی درگیر می شود (۸). از طرفی باعث جلوگیری از آپوپتوز، پروتئین سوزی (آتوفاژیا) و ترناور بیش‌ازاندازۀ ناقل‌های مواد مغذی ازجمله ناقل گلوکز و اسیدهای آمینه می‌شود (۹). محرک‌های تحریک‌کنندۀ مسیر سیگنالینگ MTOR1-2، مواد مغذی (اسیدهای آمینه و گلوکز)، عوامل رشدی (IGF-1 و انسولین)، فشارمکانیکی، سایتوکین‌ها (IL6) و هورمون‌های استروئیدی می‌باشند. مهارکننده‌های این مسیر خود مخمر راپامایسین، استرس، التهاب و رادیکال‌های آزاد هستند و نشان‌دهندۀ این موضوع است که رشد سلول فقط در شرایط مطلوب اتفاق می‌افتد (۱۰). پروتئین کیناز B که به نام AKT نیز شناخته می‌شود، کیناز پروتئینی است که در انواع مختلف سلولی در بدن یافت می‌شود و نقش حیاتی را در مسیرهای سیگنالی متعددی ایفا می‌کند (۱۱). برای مثال به تنظیم رشد سلولی و تقسیم سلولی، تمایز و بقای سلول کمک می‌کند (۷). فعالیت AKT روی اهداف پایین‌دست، عملکرد آن را در روندهای قلبی عروقی مثل بقای سلولی، رشد، تکثیر، رگزایی، اتساع عروق و متابولیسم سلولی مشخص می‌کند. پروتئین کیناز B (AKT) بقای سلولی را از طریق فعالیت‌های، کاسپاز ۹، YAP، Bcl-2 و Bcl-X پیش می‌برد (۷, ۱۲). مهار پروتئین‌های FoxO به‌وسیله AKT از طریق مکانیسم‌های نسخه‌برداری، سبب افزایش بقای سلولی می‌شود. AKT رشد و تکثیر سلولی را از طریق mTORC1 تحریک می‌کند. همچنین ترشح VEGF افزایش داده و فسفریلاسیون eNOS، اتساع عروق و رگزایی را میانجیگری می‌کند. AKT متابولیسم سلولی را از طریق اهداف پایین‌دست مثل GLUT4 و GSK3 افزایش می‌دهد (۱۳). یکی از محرک‌های اصلی فعال‌سازی مسیر mTOR، فشار و بار مکانیکی وارد شده به عضله است. عوامل رشدی، مواد مغذی، هورمون‌ها و سایتوکین‌ها از دیگر محرک‌های مسیر mTOR هستند (۱۴). تمرین ورزشی از نوع مقاومتی-قدرتی با تحریک مکانیکی همراه است که این تحریک یک عامل بسیار قوی برای افزایش تودۀ عضلۀ اسکلتی است. این افزایش به دلیل ترشح IGF-1 یا MGF (فاکتور رشد مکانیکی) در عضله می‌باشد؛ که متعاقباً منجر به فعال شدن یک آبشار سیگنالینگ در سلول می‌شود که به ترتیب شامل PI3K، PDK1، PDK2 و AKT می‌باشد (۱۵). بعد از این مرحله AKT باعث بهبود فعالیت دو مسیر mTOR و گلیکوژن سنتاز کیناز ۳ بتا می شود؛ که نقش کلیدی در مسیر هایپرتروفی عضله اسکلتی در پاسخ به تمرینات قدرتی دارند. بعد از فسفریله شدن mTOR، PV0s6k

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-10-06]

که محرک سنتز پروتئین است، فسفریله می‌شود از طرف دیگر عامل‌های مهاری رشد عضله یعنی 4e-bpi و eif2 مهار می‌شوند (۱۶). یکی دیگر از اهمیت‌های مسیر AKT/mTOR، مهار و غیر فعال‌سازی عامل FOXO یا FKHR می‌باشد. FOXO عامل اصلی در فعال‌سازی سیستم یوبی کوئیتین-پروتئازم است که باعث تجزیهٔ پروتئین‌های انقباضی می‌شود (۱۷). در واقع مسیر AKT/mTOR با فعالیتش از آتروفی و تجزیهٔ پروتئین های عضلات اسکلتی جلوگیری می‌کند. تحقیقات نشان می‌دهد که تمرینات قدرتی از طریق فعال‌سازی مسیر AKT/mTOR، باعث مهار عامل FOXO وآتروژنین می‌شود و درنتیجه از آتروفی عضلات جلوگیری می‌کند (۱۸). بر اساس تحقیقاتی که در زمینه ارتباط بین مسیر mTOR/ AKT و فعالیت ورزشی صورت گرفته است، می‌توان گفت که این مسیر به‌طور ویژه در تمرینات قدرتی و به‌منظور هایپرتروفی فعال می‌شود (۱۵). البته باید گفت که این مسیر وظایف دیگری را نیز بر عهده دارد (۱۹). ولی در کل یک مسیر آنابولیسمی می‌باشد؛ اما در اینکه آیا مدت، شدت و نوع تمرین چگونه سطوح mTOR/ AKT را در انسان تحت تأثیر قرار می‌دهد هنوز بی‌پاسخ‌مانده است. فعالیت مسیر mTOR/ AKT به سن، جنس، نوع و شدت فعالیت انجام‌شده، نوع و میزان سرعت انقباض (درونگرا-برونگرا) و همچنین نوع تار بستگی دارد (۲۰). لذا پژوهشگر در پژوهش حاضر در نظر دارد تا به مقایسه یک جلسه فعالیت اکسنتریک و کانسنترک مجزا بر بیان پروتئین‌های mTOR/ AKT را مورد ارزیابی قرار دهد.

روش کار

پژوهش حاضر از نوع نیمه تجربی بوده و در این راستا ۱۰مرد سالم با رنج سنی ۱۸ تا ۳۰ سال که به صورت تفریحی تمرین قدرتی انجام می‌دهند (افرادی که به‌منظور سلامت عمومی بدن و ارتقای ترکیب بدنی ۳ تا ۶ روز در هفته تمرین می‌کنند) و به صورت تصادفی در هر یک از گروه ها (گروه کانسنتر یک ۵ نفر- گروه اکسنتریک ۵ نفر) تقسیم شدند. در این پژوهش برای به حداقل رساندن تأثیر بین جنسی در بیان ژن، تنها از مردان استفاده شد. به‌منظور تعیین سلامتی آزمودنی‌ها و به حداقل رساندن خطرهای مرتبط با سیستم قلبی عروقی از راهنمای سلامت دانشکده پزشکی ورزشی آمریکا استفاده شد. از طرفی افراد حاضر در پژوهش با توجه به خود اظهاری، در ۶ ماه منتج به تمرین از هیچ مکمل ورزشی استفاده نکرده بودند. همچنین کد اخلاق این پژوهش IR.UT.SPORT.REC.1397.029 که توسط دانشگاه تهران صادر و در سایت وزارت بهداشت جمهوری اسلامی ایران موجود است.

آزمودنی‌ها دو جلسه در آزمایشگاه حضور پیدا کردند. هدف از جلسه اول آشنایی با محیط آزمایشگاه، سیستم آیزوکینتیک (دستگاه دینامومتر آیزوکینتیک ساخت کمپانی Biodex کشور آمریکا) و اندازه‌گیری قد، وزن، توضیح پرسشنامه درک فشار تمرین بورگ و تعیین گشتاور بود. در جلسه دوم، آزمودنی‌ها به‌صورت تصادفی یکی از پروتکل‌های اکسنتریک یا کانسنتریک را در ساعت ۸ تا ۹ صبح انجام دادند. پروتکل تمرین در این مطالعه به شرح زیر بود: آزمودنی‌ها در هر جلسه ابتدا پس از مراجعه به آزمایشگاه به مدت ۱۰ دقیقه به حالت نشسته استراحت کردند و مراحل کار بار دیگر برای آن ها به‌منظور اطمینان از درک آن ها از نحوه اجرای تمرین مرور شد. پس‌ازآن آزمودنی بر روی صندلی دینامومتر نشسته و تنظیمات برای آماده سازی دستگاه صورت گرفت. این تنظیمات شامل جهت-گیری دینامومتر ۹۰ درجه، تیلت دینامومتر. درجه، جهت‌گیری صندلی ۹۰ درجه، تیلت پشتی صندلی ۸۵ درجه، دامنه حرکت ۰ تا ۹۰ درجه و محور چرخش دینامومتر در صفحه ساجیتال در راستای خطی که از کندیل خارجی محور می‌گذرد انتخاب شد. گرم کردن اختصاصی با سیستم آیزوکینتیک شامل ۲ ست ۵ تایی و زمان استراحت بین هر ست ۳۰ ثانیه بود. آزمودنی‌ها سپس یکی از دو پروتکل مختلف انقباض عضلانی آیزوکینتیک که از قبل و به‌صورت تصادفی برای آن‌ها تعیین‌شده بود را با پای راست اجرا کردند. پس از اتمام فعالیت پای تمرین کرده بدون هیچ فشاری تا زمان انجام بایوپسی ثابت نگاه داشته شد. بایوپسی از هر آزمودنی ۳ تا ۴ ساعت پس از اتمام پروتکل تمرینی انجام شد. طی

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-10-06]

اجرای پروتکل در انتهای هر ست میزان درک فشار با استفاده از مقیاس ۲۰ نمره‌ای بورگ (RPE) تعیین گردید. مقیاس بورگ همبستگی بالایی با میزان HR، میزان تنفس و تجمع اسیدلاکتیک دارد و یکی از راه‌های تعیین شدت فعالیت بدنی می‌باشد. از آزمودنی‌ها خواسته شد که پس از اتمام هر ست عدد مربوط به مقیاس بورگ را اعلام کنند. زمانیکه آزمودنی عدد ۲۰ را اعلام می‌کرد با تشویق کلامی ۲ ست دیگر تمرین ادامه پیدا می‌کرد و هنگامی که توانایی اجرای کامل پروتکل توسط آزمودنی وجود نداشت، تمرین متوقف می‌شد. پروتکل های انقباض آیزوکینتیک شامل اکسنتریک و کانسنتریک اکستنشن زانو با حداکثر قدرت و سرعت زاویه‌ای ۶۰ درجه بر ثانیه بود. گشتاورهای تعیین‌شده برای هر آزمودنی به‌منظور همسان سازی بارکاری در هر دو پروتکل یکسان در نظر گرفته شد و سرعت رفت‌وبرگشت ۶۰ درجه بر ثانیه بود. انقباض‌ها شامل حداکثر ۱۲ ست ۱۰ تکراری برای پای راست، زمان استراحت بین هر ست ۳۰ ثانیه در نظر گرفته شد. بدیهی است که زمان اجرای تمرینات اکسنتریک بیشتر از تمرینات کانسنتریک بود (جدول شماره ۱).

نمونه‌برداری بافت عضله به شرح ذیل بود: در ابتدا و انتهای مطالعه از بافت عضله پهن جانبی بایوپسی انجام شد. بایوپسی در دو جهت دیستال و پروگزیمال عضله پهن جانبی انجام شد. نمونه بایوپسی در شرایط پایه برای بار اول و ۳ تا ۴ ساعت پس از انجام تمرین در شرایط کاملا استریلیزه و در بیمارستان فوق تخصصی بقیه‌الله و توسط فوق تخصص جراحی ارتوپد انجام شد (۲۱). بایوپسی های عضلانی پوستی (۱۵ تا ۲۰ میلی‌گرم) از قسمت میانی عضله پهن جانبی در نقطه میانی بین کشکک و تروکانتر بزرگتر ران در یک عمق بین ۱ تا ۲ سانتی‌متر بر اساس روش‌های قبلاً تأییدشده به دست آمد. برای تمامی آزمودنی‌ها از پای راست استفاده شد. ناحیه بایوپسی تمیز شده و موهای پا در آن ناحیه کاملاً برداشته شد و با صابون ضدعفونی شسته و با الکل ضدعفونی شد. علاوه بر این، مکان بایوپسی با سم‌زدایی نیز با بتادین (آنتی‌سپتیک مایع) ضدعفونی شد. یک ناحیه کوچک از پوست تمیز شده، تقریباً ۲ سانتی‌متر قطر، با یک تزریق زیر جلدی ۰/۱ میلی‌لیتر موضعی لیدوکائین بی‌حس شد. پس از بی‌حسی، یک نمونه بیوپسی آسپیراسیون سوزنی با اندازه ۱۶ اینچی (Tru-Core I Biopsy Instrument، Techniques Device Technologies، Gainesville، FL) در عمق تقریبی ۱ سانتی‌متر برای استخراج نمونه عضلانی قرار گرفت. پس از بایوپسی اولیه، بایوپسی بعدی، با استفاده از نشانه های پیش بایوپسی و نشانه‌های عمق روی سوزن، بافت عضلانی را از تقریباً همان مکان اولیه استخراج شد. پس از استخراج عضله، بافت چربی از نمونه‌های عضلانی برداشته شد. نمونه‌ها بلافاصله در دمای -۸۰ درجه سانتی گراد ذخیره شدند. در هر یک از دو جلسه آزمون، دو نمونه عضلانی به دست آمد که مجموعاً ۱۰ نمونه عضلانی طی دوره مطالعه برای هر گروه و در کل ۲۰ نمونه به دست آمد. نمونه های عضلانی در زمان پایه و ۳ تا ۴ ساعت پس از تمرین به دست آمد.

مکان یابی پروتئین یا آنتی‌ژن خاص این گونه انجام شد که ابتدا سو سپانسیون سلولی بر روی لامل های ژلاتیه استریل کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت با PBS شست‌وشو داده شد. به مدت ۲۰ دقیقه با پارافرمالدئید ۴ درصد در دمای یخچال فیکس شدند. لامل ها پس از شست و شو با PBS در ۲ HCL نرمالیته به مدت بیست دقیقه در دمای محیط انکوبه شدند. لامل ها پس از شست‌وشو با PBS در معرض تریتون ۰/۳ X-1002 درصد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند. تریتون غشای

جدول ۱- پروتکل تمرین در گروه‌های اکسنتریک و کانسنتریک

گروه	تعداد ست	تعداد حرکت	استراحت بین ست
اکسنتریک	حداکثر ۱۲ ست	۱۰ تکرار	۳۰ ثانیه استراحت بین ست‌ها با سرعت‌پایین
کانسنتریک	حداکثر ۱۲ ست	۱۰ تکرار	۳۰ ثانیه استراحت بین ست‌ها با سرعت‌بالا

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-10-06]

سلولی را به آنتی‌بادی‌ها نفوذپذیر می‌کند. در مرحله بعد سرم بز ۱۰ درصد به مدت نیم ساعت به سلول‌ها اضافه شد. پروتئین‌های سرم بزی باعث می شود که محل‌های غیراختصاصی آنتی‌ژنی پوشیده شده و از واکنش غیراختصاصی جلوگیری شود. سلول‌ها به مدت ۱ ساعت با آنتی‌بادی اولیه رقیق‌شده به نسبت ۱ به ۱۰۰ در PBS به مدت یک‌شب در دمای یخچال و در اتاقک مرطوب انکوبه شدند. استفاده از پارافیلم و مرطوب نگه‌دا شتن شرایط از خ شک شدن آنتی‌بادی جلوگیری می‌کند. سپس دو بار با PBS شست‌وشو داده شدند و به مدت ۶۰ دقیقه در معرض آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با رقت ۱ به ۲۰۰ در تاریکی و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. پس از ۳ بار شست‌وشو با PBS به‌منظور رنگ‌آمیزی هسته‌ها از PI یا DAPI استفاده شد و سپس با میکروسکوپ فلورسنت بررسی شدند.

پس از جمع‌آوری داده‌ها برای تجزیه‌وتحلیل داده‌های این پژوهش از روش‌های آماری توصیفی و استنباطی ا ستفاده شد. از آمار تو صیفی برای محا سبه میانگین و انحراف استاندارد داده‌ها استفاده شد و از آمار استنباطی برای مقای سه گروه‌ها باهم ا ستفاده شد. همچنین برای بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون کولموگروف اسمیرنف استفاده شد. برای مقایسه میانگین‌های درون‌گروهی از روش آ ماری تی وابسته در سطح معناداری (P<۰/۰۵) استفاده شد. برای مقایسه دو گروه از آزمون کوواریانس ا ستفاده شد. برای تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS21 و برای ر سم نمودارها از نرم‌افزار Exell 2013 استفاده شد.

یافته‌ها

در این بخش ابتدا داده‌های توصیفی مرتبط با شاخص‌های دموگرافیک آزمودنی‌ها (جدول ۲) ارائه شده است.

طبق جدول ۳ و شکل‌های شماره ۱ و ۲، بین مقادیر پیش آزمون و پس آزمون متغیرهای mTOR، AKT در گروه‌های اکسنتریک تفاوت معنادار وجود دارد (p≤۰/۰۵). همچنین بین مقادیر پیش آزمون و پس آزمون AKT در گروه کانسنتریک اختلاف معناداری مشاهده شد (p≤ ۰/۰۵). از آزمون کوواریانس جهت بررسی اثرات بین گروهی استفاده شد. نتایج نشان داد. مطابق با جدول شماره ۳ مقدار F تعامل پیش‌آزمون mTOR۲/۱۷۸، پیش‌آزمون AKT ۰/۳۰۲ می باشد (p≥۰/۰۵) که معنادار نمی‌باشد و می‌توان نتیجه گرفت

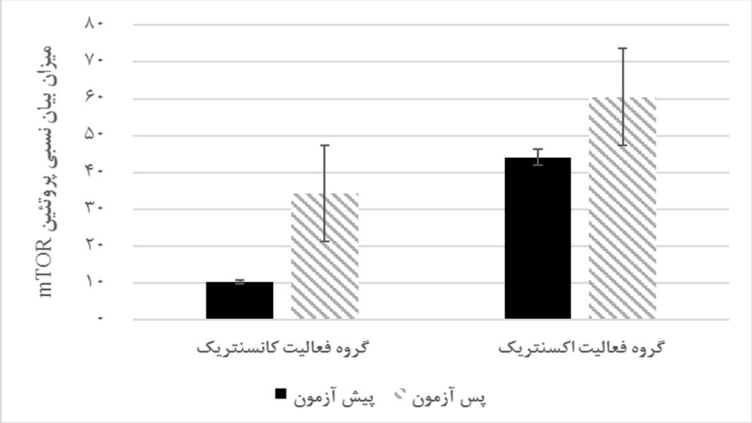
جدول ۲- شاخص‌های دموگرافیک آزمودنی‌ها در دو گروه

متغیر	گروه‌ها	میانگین ± انحراف استاندارد
وزن (کیلوگرم)	گروه فعالیت کانسنتریک	۷۱/۸±۵۰/۱۶
	گروه فعالیت اکسنتریک	۷۲/۹±۱۰/۶۱
BMI (kg/m^2)	گروه فعالیت کانسنتریک	۲۳/۲±۴۵/۲۶
	گروه فعالیت اکسنتریک	۲۴/۱±۲۶/۹۷
قد (سانتیمتر)	گروه فعالیت کانسنتریک	۱۷۸/۴±۸۰/۲۶
	گروه فعالیت اکسنتریک	۱۷۶/۴±۲۶/۶۷
سن (سال)	گروه فعالیت کانسنتریک	۲۶/۳±۷۶/۴۵
	گروه فعالیت اکسنتریک	۲۵/۲±۱۵/۶۸

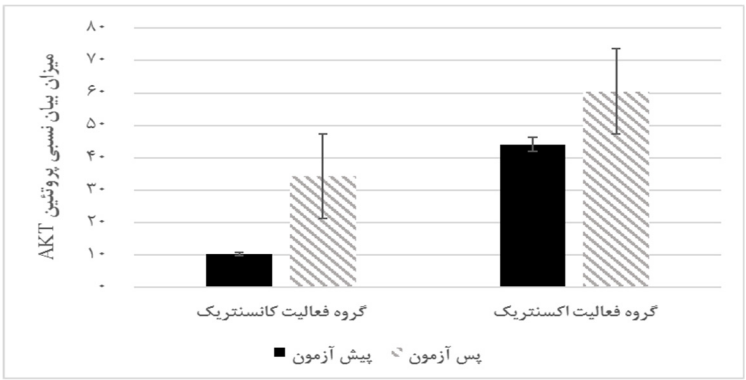
جدول ۳- نتایج آزمون T وابسته جهت مقایسه میانگین‌های پیش آزمون و پس آزمون mTOR، AKT در دو گروه

متغیر	گروه	اختلاف میانگین	T	درجات آزادی	p
mTOR	گروه فعالیت کانسنتریک	-۴/۰۶	-۹/۴۵۲	۴	۰/۵۹۵
	گروه فعالیت اکسنتریک	-۴/۵۱	-۳/۴۱۵	۴	۰/۰۰۱
AKT	گروه فعالیت کانسنتریک	-۳۳/۹۲۳	-۱۱/۶۷۶	۴	۰/۰۰۷
	گروه فعالیت اکسنتریک	-۲۶/۲۴۳	-۴/۸۶۹	۴	۰/۰۴۰

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-10-06]



شکل ۱- مقادیر نسبی mTOR در پیش‌آزمون و پس‌آزمون دو گروه



شکل ۲- مقادیر AKT در پیش‌آزمون و پس‌آزمون دو گروه

که پیش فرض همگنی شیب رگرسیون رعایت شده است. همچنین نتایج حاصل از جدول شماره ۳ تحلیل کوواریانس نشان می‌دهد که بین گروه‌های مختلف در مقادیر پس‌آزمون mTOR اختلاف معناداری وجود ندارد (F= ۲/۰۷۰ و p= ۰/۲۴۶). همچنین نتایج حاصل از جدول تحلیل کووار یانس نشان می‌دهد که بین گروه های مختلف در مقادیر پس‌آزمون AKT اختلاف معناداری وجود ندارد (F= ۰/۹۵۰ و p= ۰/۴۰۲).

بحث

مسیر سیگنالینگ mTOR تسهیل‌کنندهٔ اصلی رشد طبیعی عضله و مهم‌ترین مسیر سیگنالینگ درگیر در هایپرتروفی عضلات اسکلتی است. تمرین قدرتی به صورت حاد و مزمن- هر دو- مسیر AKT/mTOR را فعال می‌کند. به‌طور مثال در تحقیقی آزمودنی‌ها به سه گروه تمرین استقامتی، تمرین قدرتی و گروه کنترل تقسیم شدند و به مدت ۱۰ هفته فعالیت استقامتی و قدرتی را انجام دادند. نتایج نشان داد که در گروه تمرین قدرتی فعالیت، AKT/mTOR به نسبت قبل از فعالیت افزایش داشت، در حالی‌که هیچ تغییری در مقدار AMPK آن‌ها رخ نداد (۱۰). از طرفی در گروه تمرین استقامتی فقط مقدار AMPK افزایش داشت که با بایوژنز میتوکندریایی همراه بود (۱۱). در واقع AMPK از طریق فسفوریله کردن راپتور که بخشی از کمپلکس mTOR است، باعث مهار فعالیت AKT/mTOR می‌شود (۷). در پژوهش حاضر نشان داده شد تغییرات درون‌گروهی mTOR بعد از یک جلسه فعالیت، در گروه اکسنتریک (p=۰/۰۰۶) و گروه کانسنتریک (p=۰/۰۱۹) معنادار بود. همچنین تغییرات بین گروهی نشان‌دهنده عدم تفاوت بین دو گروه بود (p=۰/۲۴۶). همچنین

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-10-06]

تغییرات درون‌گروهی AKT بعد از یک جلسه فعالیت، در گروه اکسنتریک (p=۰/۰۰۷) و گروه کانسنتریک (p=۰/۰۴۰) معنادار بود. همچنین تغییرات بین گروهی نشان‌دهنده عدم تفاوت بین دو گروه بود (p=۰/۴۰۲). در همین راستا لین (Layne) و همکاران (۲۰۱۷) به بررسی تعیین تأثیر اجرای یک دوره تمرین مقاومتی بر بیان پروتئین‌های تام و فسفریله mTOR و p70s6k به‌عنوان تنظیم‌گر اصلی هایپرتروفی در عضله خم کننده طویل انگشتان پا (FHL) رت‌های نر سالم پرداختند. نتایج نشان داد، اجرای تمرین مقاومتی موجب افزایش معنادار شکل فسفریله پروتئین‌های mTOR و p70s6k می‌شود؛ اما موجب افزایش معنادار محتوی پروتئینی تام mTOR و p70s6k نشد (۸). همچنین پیک (Peake) و همکاران (۲۰۲۰) به بررسی سازگاری هیپرتروفی عضله اسکلتی در ۳ و ۶ هفته تمرین مقاومتی برای سنتز پروتئین عضله از طریق مسیر سیگنالینگ mTORC1 پرداختند. سطوح پروتئین‌های mTOR و پروتئین AKT اندازه‌گیری شد. نتایج این مطالعه هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (۱۴). در مطالعه دیگری مسیر PI3K/AKT/mTOR در هیپرتروفی بطن چپ موش های صحرایی بررسی کردند. در این تحقیق موش‌ها به دو گروه تمرین و کنترل تقسیم شدند و گروه تمرین به مدت ۸ هفته و ۵ جلسه در هفته و یک ساعت در روز شنا می‌کردند و بیان سطوح پروتئین قلبی PI3K/AKT/mTOR براثر تمرین ۳۶ درصد افزایش داشت که نشان‌دهنده فعال شدن مسیر پیام‌رسانی PI3K/AKT/mTOR بود (۹). mTOR از مسیرهای مختلفی می‌تواند فعال شود اما به‌طور کامل مشخص نشده است که تمرینات ورزشی از کدام مسیر باعث فسفوریله و فعال شدن mTOR می شود (۲۲). یکی از مسیرهای پیشنهادشده مسیر IGF-1/PI3K/AKT است که با توجه به نتایج تحقیق حاضر که منجر به فعال شدن mTOR شده است مورد تائید است. نظریه‌ای که به تازگی ارائه شده است، نظریه گیرنده‌های مکانیکی در سطح سلول‌های مانند انتگرین، دسیتروفن و کانال‌های فعال‌شده از طریق کشش است (۲۳). با توجه به نتیجه تحقیق حاضر می‌توان گفت که فعالیت ورزشی با تأثیر بر بعضی از پروتئین‌ها و مکانیسم‌ها می‌تواند به صورت مستقل منجر به فعال شدن mTOR شود. با این حال باید مطالعات بیشتری در این زمینه انجام گیرد (۲۴). در تحقیقی دیگر محققان به بررسی اثر تمرینات مقاومتی بر سطوح پروتئین‌های AKT،mTOR پرداختند. نتایج این مطالعه تفاوت معنی‌داری را به دنبال فعالیت ورزشی مقاومتی در عضله چهار سر موش‌های صحرایی نشان دادند (۲۵). نتایج تحقیق حاضر افزایش را در فاکتور موردنظر نشان داد. مهم‌ترین تأثیر مسیرهای پیام‌رسانی mTORC1 اثر بر پروتئین‌های درگیر در کنترل ترجمه یعنی پروتئین‌های P70S6K1 است (۸). علاوه بر نوع تمرین، نوع و سرعت انقباض (درونگرا-برونگرا) نیز در تحریک مسیر رشد عضله تأثیر دارد. بطوریکه انقباض برونگرا به نسبت درون‌گرا باعث افزایش بیشتری در سنتز پروتئین‌های عضلانی می‌شود. چون در این نوع انقباض به نسبت انقباض درون‌گرا، تارهای عضلانی بیشتری درگیر می شود درنتیجه نیروی بیشتری نیز تولید شده و مسیر AKT/Mtor بیشتر درگیر می‌شود و اینکه در انقباض برونگرا آسیب بیشتری به عضله وارد می شود که این آسیب خود محرک ترشح IGF-1 و IL6 است که بر روی سلول‌های ماهواره‌ای گیرنده دارند و با فعال‌سازی‌ای سلول‌ها باعث هایپرتروفی عضلانی می‌شوند (۲۶). از طرفی هرچه انقباض با سرعت بیشتری همراه باشد رشد عضله بیشتر تحریک می شود؛ مثلاً در دو گروه که یک جلسه تمرین قدرتی (یک گروه انقباض آهسته برونگرا و گروه دیگر انقباض سریع برونگرا) را با ۵ ست، ۸ تکراری انجام دادند، طی بایوپسی که ۲ ساعت بعد از اتمام فعالیت از قسمت ران دو گروه آزمودنی گرفته شد، مشخص شد که مقدار فسفوریله شدن AKT و P70s6k در گروه انقباض سریع خیلی بیشتر از گروه انقباض آهسته بوده است (۲۷). در تحقیقی دیگر نشان داده شد که انجام تمرینات مقاومتی منجر به افزایش فاکتورهای p70S6K و AKT، mTOR می‌شود (۲۳). در مطالعه حاضر نیز نشان داده شد، فعالیت اکسنتریک باعث فسفوریلاسیون AKT شده است و این افزایش منجر به بهبود mTOR گردیده است. این نتایج نشان می‌دهد که

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-10-06]

دو نوع انقباض اکسنتریک و کانسنتریک ممکن است از مکانیسم‌های مختلف فیزیولوژیکی بر تغییرات سنتز پروتئین نقش داشته باشند.

نتیجه‌گیری

بسیاری از سازگاری‌ها مانند افزایش قدرت و توده بدون چربی، ناشی از تمرینات مقاومتی تکراری می‌باشد و این به دلیل درجه بالای شکل‌پذیری عضله اسکلتی در پاسخ به فشار تمرینی است. محرک های تمرینی متفاوت در ورزش‌های مقاومتی می‌تواند پاسخ های مولکولی متفاوتی را در ارتباط با سازگاری‌های ویژه عضله اسکلتی به نوع تمرین مقاومتی ایجاد کند. تجویز یک برنامه مقاومتی باید با توجه به دستکاری‌های انجام شده در متغیرها صورت گیرد. متغیرهای تمرینی شامل شدت، حجم و زمان تحت تنش می‌باشد. دستکاری هر یک از این متغیرها می‌تواند در نتیجه نهایی تأثیرگذار باشد. البته باید در نظر داشت که دستکاری تنها یک متغیر می‌تواند مطالعه اثر دیگر متغیرها را در پاسخ‌های مولکولی غیر ممکن کند. در مجموع مطالعه حاضر نشان داد یک جلسه فعالیت اکسنتریک و کانسنتریک منجر به تغییر فاکتورهای درگیر در قدرت، هایپرتروفی می‌شود. علاوه براین، این تغییرات در مجموع در انقباض اکسنتریک بیش از کانسنتریک است.

تقدیر و تشکر

مقاله حاضر مستخرج از رساله دکتری فیزیولوژی ورزشی آقای سعید علی اعظم می‌باشد. لذا از مساعدت و همکاری صمیمانه مسئولین دانشگاه آزاد اسلامی واحدعلوم وتحقیقات تهران و بیمارستان بقیه‌الله و تمام افرادی که موجب تسهیل اجرای رساله شدند، تقدیر و تشکر می‌گردد.

References

1. Venkatasamy VV, Pericherla S, Manthuruthil S, Mishra S, Hanno R. Effect of Physical activity on Insulin Resistance, Inflammation and Oxidative Stress in Diabetes Mellitus. J Clin Diagn Res. 2013;7(8):1764-6.

2. Elosua R, Molina L, Fito M, Arquer A, Sanchez-Quesada JL, Covas MI, et al. Response of oxidative stress biomarkers to a 16-week aerobic physical activity program, and to acute physical activity, in healthy young men and women. Atherosclerosis. 2003;167(2):327-34.

3. Accattato F, Greco M, Pullano SA, Carè I, Fiorillo AS, Pujia A, et al. Effects of acute physical exercise on oxidative stress and inflammatory status in young, sedentary obese subjects. PLoS One. 2017;12(6):e0178900.

4. Padilha CS, Borges FH, Costa Mendes da Silva LE, Frajacomo FTT, Jordao AA, Duarte JA, et al. Resistance exercise attenuates skeletal muscle oxidative stress, systemic pro-inflammatory state, and cachexia in Walker-256 tumor-bearing rats. Appl Physiol Nutr Metab. 2017;42(9):916-923.

5. Britto FA, Gnimassou O, De Groote E, Balan E, Warnier G, Everard A, et al. Acute environmental hypoxia potentiates satellite cell□dependent myogenesis in response to resistance exercise through the inflammation pathway in human. FASEB J. 2020;34(1):1885-1900.

6. Gruntman AM, Flotte TR. The rapidly evolving state of gene therapy. FASEB J. 2018;32(4):1733-1740.

7. Luk HY, Levitt DE, Boyett JC, Rojas S, Flader SM, McFarlin BK, et al. Resistance exercise-induced hormonal response promotes satellite cell proliferation in untrained men but not in women. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2019;317(2):E421-E432.

8. Layne AS, Larkin-Kaiser K, MacNeil RG, Dirain M, Sandesara B, Manini TM, et al. Effects of blood-flow restriction on biomarkers of myogenesis in response to resistance exercise. Appl Physiol Nutr Metab. 2017;42(1):89-92.

9. Jang J, Park S, Kim Y, Jung J, Lee J, Chang Y, et al. Myostatin Inhibition-Induced Increase in Muscle Mass and Strength Was Amplified by Resistance Exercise Training, and Dietary Essential Amino Acids Improved Muscle Quality in Mice. Nutrients. 2021;13(5):1508.

10. Morais SRL, Brito VGB, Mello WG, Oliveira SHP. l-arginine modulates inflammation and muscle regulatory genes after a single session of resistance exercise in rats. Scand J Med Sci Sports. 2018;28(2):425-435.

11. Ishikawa K, Weber T, Hajjar RJ. Human Cardiac Gene Therapy. Circ Res. 2018;123(5):601-613.

12. Bechshøft CJL, Jensen SM, Schjerling P, Andersen JL, Svensson RB, Eriksen CS, et al. Age and prior exercise in vivo determine the subsequent in vitro molecular profile of myoblasts and nonmyogenic cells derived from human skeletal muscle. Am J Physiol Cell Physiol. 2019;316(6):C898-C912.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-10-06]

13. Sailani MR, Halling JF, Møller HD, Lee H, Plomgaard P, et al. Lifelong physical activity is associated with promoter hypomethylation of genes involved in metabolism, myogenesis, contractile properties and oxidative stress resistance in aged human skeletal muscle. Sci Rep. 2019;9(1):3272.

14. Peake JM, Markworth JF, Cumming KT, Aas SN, Roberts LA, Raastad T, et al. The effects of cold water immersion and active recovery on molecular factors that regulate growth and remodeling of skeletal muscle after resistance exercise. Front Physiol. 2020;11:737.

15. Moore NA, Morral N, Ciulla TA, Bracha P. Gene therapy for inherited retinal and optic nerve degenerations. Expert Opin Biol Ther. 2018;18(1):37-49.

16. Choi Y, Lee SY. Biosynthesis of inorganic nanomaterials using microbial cells and bacteriophages. Nat. Rev. Chem. 2020;4(12):638-56.

17. Iqbal P, Ghani MA, Ali B, Shahid M, Iqbal Q, Ziaf K, et al. Exogenous application of glutamic acid promotes cucumber (Cucumis sativus L.) growth under salt stress conditions. EJFA. 2021:407-16.

18. Bhardwaj AK, Naraian R. Cyanobacteria as biochemical energy source for the synthesis of inorganic nanoparticles, mechanism and potential applications: a review. Biotech. 202;11(10):1-6.

19. Hassan F, Mobarez S, Mohamed M, Attia Y, Mekawy A, Mahrose K. Zinc and/or Selenium Enriched Spirulina as Antioxidants in Growing Rabbit Diets to Alleviate the Deleterious Impacts of Heat Stress during Summer Season. Animals (Basel). 2021;11(3):756.

20. Nasrollahzadeh M, Sajjadi M, Iravani S, Varma RS. Green-synthesized nanocatalysts and nanomaterials for water treatment: Current challenges and future perspectives. J Hazard Mater. 2021;401:123401.

21. Godfrey JK, Kayser BD, Gomez GV, Bennett J, Jaque SV, Sumida KD. Interrupted resistance training and BMD in growing rats. Int J Sports Med. 2009;30(8):579-84.

22. Kemmler W, Kohl M, Fröhlich M, Schoene D, von Stengel S. Detraining effects after 18 months of high intensity resistance training on osteosarcopenia in older men-Six-month follow-up of the randomized controlled Franconian Osteopenia and Sarcopenia Trial (FrOST). Bone. 2021;142:115772.

23. Hohman TC. Hereditary Retinal Dystrophy. Handb Exp Pharmacol. 2017;242:337-367

24. Farsani ZH, Banitalebi E, Faramarzi M, Bigham-Sadegh A. Effects of different intensities of strength and endurance training on some osteometabolic miRNAs, Runx2 and PPARγ in bone marrow of old male wistar rats. Mol Biol Rep. 2019;46(2):2513-2521.

25. Jafarzadeh G, Shakerian S, Farbood Y, Ghanbarzadeh M. Effects of Eight Weeks of Resistance Exercises on Neurotrophins and Trk Receptors in Alzheimer Model Male Wistar Rats. Basic Clin Neurosci. 2021;12(3):349-359.

26. Bourzac C, Bensidhoum M, Manassero M, Chappard C, Michoux N, Pallu S, et al. Preventive Moderate Continuous Running-Exercise Conditioning Improves the Healing of Non-Critical Size Bone Defects in Male Wistar Rats: A Pilot Study Using μCT. Life (Basel). 2020;10(12):308.

27. Bosiacki M, Gutowska I, Piotrowska K, Lubkowska A. Concentrations of Ca, Mg, P, Prostaglandin E2 in Bones and Parathyroid Hormone; 1,25-dihydroxyvitamin D3; 17-β-estradiol; Testosterone and Somatotropin in Plasma of Aging Rats Subjected to Physical Training in Cold Water. Biomolecules. 2021;11(5):616.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-10-06]