View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by shahrekord university of medical scinces

51 / Journal of Gorgan University of Medical Sciences
Winter 2013 / vol 14 / no 4

Original Paper

Effect of 8 weeks resistance training on sphingosine-1-phosphate level and gene expression of SK1 enzyme, isoforms of MHCs in skeletal muscles of male Wistar Rats

Banitalebi E (PhD)[1], Ghatre Samani K (PhD)[2], Mardani G (MSc)[3]
Soheili A (Pharm.D)[4], Ansari Samani R (MSc)[5], Teimori H (PhD)*[6]

[1]Assistant Professor, Department of Sport Science, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran. [2]Assistant Professor, Department of Biochemistry, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran. [3]PhD Candidate in Environmental Health, Herbal Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran. [4]Pharmacologist. [5]MSc in Histology, Herbal Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran. [6]Assistant Professor, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.

Abstract

Background and Objective: Sphingosine-1-phosphate (S1P) is involved in regulation of proliferation, differentiation, hypertrophy and anti-apoptosis and activation of satellite cells. This study was done to evaluated the effect of 8 weeks resistance training on sphingosine-1-phosphate level and gene expression of SK1 enzyme, isoforms of MHCs in skeletal muscles of male Wistar rats.

Materials and Methods: This experimental study was done on Twenty four 8-week-old 190-250 gr male Wistar rats. The rats were allocated randomly into control (N=12) and training (N=12) groups. Resistance training was done using a 1 meter height ladder with 2 cm grid with an 85 degree incline, and weights attached to rat's tails. The content of S1P present in the chloroform layer was determined by means of high performance liquid chromatography (HPLC). Determination of relative mRNA expression was performed by Real-time PCR. Data were analyzed using SPSS-17, Kolmogorov-Smirnov and independent t-test.

Results: Resistance exercise training increased the total content of S1P in FHL (fast-twitch) and soleus (slow-twitch) muscles in comparison with control group ($P<0.05$). Resistance exercise training changed the gene expression of FHL SK1, SOL SK1, FHL MHC I, Sol MHC I, FHL MHC IIa, Sol MHC IIa, FHL MHC IIb, Sol MHC IIb, FHL MHC IIx, Sol MHC IIx in comparison with control group ($P<0.05$).

Conclusion: This study showed that S1P level and gene expression of SK1, MHCs increased at skeletal muscles after training.

Keywords: Resistance training, Sphingosine-1-phosphate (S1P), Sphingosine-1-phosphate Kinase 1 (SK1), Myosine heavy chain (MHC), Fast-twitch and slow twitch muscles

*** Corresponding Author: Teimori H (PhD), E-mail: hteimori@skums.ac.ir**

Received 31 Oct 2011 **Revised** 14 Apr 2012 **Accepted** 27 May 2012

This paper should be cited as: Banitalebi E, Ghatre Samani K, Mardani G, Soheili A, Ansari Samani R, Teimori H. [Effect of 8 weeks resistance training on sphingosine-1-phosphate level and gene expression of SK1 enzyme, isoforms of MHCs in skeletal muscles of male Wistar Rats]. J Gorgan Uni Med Sci. 2013; 14(4):44-51. [Article in Persian]

تحقیقی

اثر ۸ هفته تمرین مقاومتی بر مقدار اسفنگوزین -۱-فسفات، میزان بیان ژن اسفنگوزین-۱-فسفات کیناز۱ و ایزوفرم‌های مختلف زنجیره سنگین میوزینی عضلات اسکلتی موش صحرایی

دکتر ابراهیم بنی‌طالبی[۱]، دکتر کیهان قطره سامانی[۲]، گشتاسب مردانی[۳]، دکتر علی سهیلی[۴]، رویا انصاری سامانی[۵]، دکتر حسین تیموری*[۶]

۱-استادیار گروه تربیت بدنی، دانشگاه شهرکرد. ۲- استادیار گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد. ۳- دانشجوی دکتری تخصصی بهداشت محیط، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد. ۴- دکتری داروسازی. ۵- کارشناس ارشد بافت شناسی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد. ۶- استادیار مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد.

چکیده

زمینه و هدف : *اسفنگوزین-۱-فسفات (S1P) در تنظیم، تکثیر، تمایز، هایپرتروفی و مقابله با مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی و فعال‌سازی سلول‌های ماهواره‌ای (satellite cell) نقش دارد. این مطالعه به منظور تعیین اثر ۸ هفته تمرین مقاومتی بر مقدار اسفنگوزین-۱-فسفات، میزان بیان ژن اسفنگوزین-۱-فسفات کیناز۱ و ایزوفرم‌های مختلف زنجیره سنگین میوزینی (MHC I, IIa, IIb, IIx) عضلات اسکلتی تند و کند انقباض موش صحرایی نر انجام شد.*

روش بررسی : *این مطالعه تجربی روی ۲۴ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار ۸ هفته‌ای با وزن تقریبی ۲۵۰-۱۹۰ گرم انجام شد. موش‌ها به صورت تصادفی در دو گروه ۱۲ تایی کنترل و تمرینی قرار گرفتند. نردبان مقاومتی یک متری با فاصله میله‌های ۲ سانتی‌متری با شیب ۸۵ درجه به‌عنوان وسیله تمرین مقاومتی و وزنه‌های متصل شده به دم حیوان به‌عنوان مقاومت استفاده شد. مقدار S1P در لایه کلروفرم به‌وسیله دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد. برای بررسی بیان ژن اسفنگوزین-۱-فسفات کیناز۱ (SK1) و ایزوفرم‌های مختلف زنجیره سنگین میوزینی (MHC I, IIa, IIb, IIx) عضلات اسکلتی تند و کند موش‌ها از روش Real-Time PCR استفاده شد. بیان ژن‌ها در عضلات تاکننده بلند انگشت شست پا (Flexor Hallucis Longus: FHL) به عنوان عضله تندانقباض و عضله نعلی (Soleus: SOL) به عنوان کندانقباض بررسی گردید. داده‌ها با میانگین و انحراف معیار توصیف گردید و پس از انجام آزمون نرمالیتی Kolmogorov-Smirnov، مقایسه میانگین‌ها با نرم‌افزار SPSS-17 و independent t-test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.*

یافته‌ها : *تمرین مقاومتی محتوای S1P در عضله FHL (۰/۲۹۲±۰/۰۴۲ pmol/mg weight) و SOL (۰/۱۱۱±۰/۰۵۸۷ pmol/mg weight) را در گروه تمرینی در مقایسه با عضله FHL (۰/۱۴۶±۰/۰۶۰۸ pmol/mg weight) و SOL (۰/۱۵۹±۰/۰۴۲۷ pmol/mg weight) گروه کنترل افزایش داد (P<۰/۰۵). به‌علاوه تمرین مقاومتی باعث تغییرات در بیان ژن SK1 در عضله تندانقباض FHL و کندانقباض SOL، MHC I در عضله تندانقباض FHL و کندانقباض SOL، MHC IIa در عضله تندانقباض FHL و کندانقباض SOL، MHC IIb در عضله تندانقباض FHL و کندانقباض SOL و MHC IIx در عضله کندانقباض SOL گروه‌تمرینی نسبت به گروه کنترل شد (P<۰/۰۵).*

نتیجه‌گیری : *این مطالعه نشان داد که تمرین مقاومتی سبب افزایش میزانS1P عضلانی و بیان MHCs و SK1 می‌گردد.*

کلید واژه‌ها : *تمرین مقاومتی، اسفنگوزین-۱-فسفات، بیان ژن اسفنگوزین-۱-فسفات کیناز۱ ، زنجیره سنگین میوزینی ، موش صحرایی*

* نویسنده مسؤول : دکتر حسین تیموری ، پست الکترونیکی hteimori@skums.ac.ir

نشانی : شهرکرد ، رحمتیه ، دانشکده پزشکی ، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی ، تلفن ۳۳۴۶۶۹۲-۰۳۸۱ ، نمابر ۳۳۴۶۶۹۲

وصول مقاله : ۹۰/۸/۹ ، اصلاح نهایی : ۹۱/۱/۲۶ ، پذیرش مقاله : ۹۱/۳/۷

مقدمه

عضله اسکلتی یک بافت بیولوژیک است که خود را با شرایط مکانو-بیولوژیکی سازگار می‌کند و منجر به تغییر در عوامل سلولی و ملکولی می گردد که برای تنظیم قطر، طول و نوع تار عضله مهم است (۱). زنجیره سنگین میوزینی یکی از اجزاء دستگاه انقباضی در عضلات مخطط است که دارای ایزوفرم‌های مختلف (MHC I, IIa, IIb, IIx) است (۲).

سلول‌های یوکاریوتیک به‌وسیله یک لایه چربی احاطه شده و شامل گلیسرولیپید، اسفنگولیپید (Sphingolipids: SLs) و استرول می‌باشند (۳و۴). در این میان اسفنگولیپیدها [اسفنگوزین،

اسفنگوزین-۱-فسفات (Sphingosine-1-phosphate: S1P)، اسفنگانین، اسفنگوزین-۱-فسفوکولین (Sphingosine-1-phosphocholine: S1Pch)، سرامید و سرامید-۱-فسفات] شناخته‌شده ترین چربی فعال زیستی بوده که در تنظیم تکثیر، تمایز، هایپرتروفی و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی درگیر است و حضور یک گروه آمین آزاد در مولکول اسفنگولیپید بر فعالیت بیولوژیکی آنها تاثیر می‌گذارد (۴و۵). S1P یک اسفنگولیپید مشتق شده از پلاکت‌ها است (۶). با این‌حال گلبول‌های قرمز خون که به‌طور دایم S1P را تخلیه می‌کند؛ می‌تواند مسؤول سطوح پایه S1P پلاسمایی باشد (۷). دو ایزوفرم آنزیم اسفنگوزین کیناز (Sphingosine kinase: SK1, SK2)، آنزیمی که اسفنگوزین را به محصول S1P فسفوریله می‌کند؛ مشخص شده است (۸). این دو ایزوفرم دارای نقش‌های متفاوت می‌باشند. به‌طوری که SK1 باعث رشد و بقاء سلول و SK2 سبب توقف رشد و افزایش مرگ برنامه‌ریزی شده سلول می‌گردد. به‌دنبال تحریک سلول با عوامل رشدی و سایتوکین‌ها، SK1 تحریک شده و از سیتوپلاسم به غشاء سیتوپلاسمی منتقل می‌شود؛ به‌نظر می‌رسد منبع اصلی S1P ترشح شده از سلول‌ها تحت این شرایط است (۹و۱۰). پاسخ‌های میتوژنیک به عوامل رشدی مربوط به فعال‌سازی آنزیم SK1 و متعاقباً افزایش تولید درون‌سلولی S1P است (۸و۱۱و۱۲). بیش‌بیانی آنزیم SK1 نه فقط باعث افزایش میزان رشد سلولی می‌گردد؛ بلکه باعث محافظت سلول از مرگ برنامه‌ریزی شده ناشی از TNF-α و یا افزایش برونزاد سرامید در سلول می‌گردد (۳). عضلات اسکلتی منبع فقیری از SK1 می‌باشند تا بتوانند S1P اضافی در سطح تارهای عضلات اسکلتی را تولید نمایند (۱۳). غلظت‌های بالایی از S1P در پلاسما (۱۹۱ pmol/ml) و سرم (۴۸۴ pmol/ml) خون یافت می‌شود که نشان می‌دهد پلاکت‌ها منبع اسفنگولیپیدها می‌باشند (۱۴) و بعد از تحریک پلاکت‌ها مقدار S1P در جریان خون افزایش می‌یابد (۱۵). S1P می‌تواند به‌عنوان یک واسطه خارج سلولی در کنترل تحریک‌پذیری سلول از طریق متصل شدن به گیرنده‌های موجود در غشاء S1P که خانواده‌ای از پروتئین‌های جفت شده به G-پروتئین‌ها (Family of G protein–coupled receptors) هستند؛ سبب فعال شدن آنها گردد (۱۶) و سپس گیرنده‌های S1P به G-پروتئین‌های مختلفی که شامل Gα,i,q, 12/13 می‌باشند؛ جفت می‌شوند (۱۷). بسیاری از اثرات سیگنالی S1P از طریق فعال‌سازی فسفولیپاز C (PLC)، تحریک +Ca2، فعالسازی ERK1/2، آدنیلات سیکلاز C (AC)، MAPK، PI3K، Rac، Rho، Akt، JNK، فسفولیپاز D (PLD) و دیگر واسطه‌های پایین‌رونده تعدیل می‌گردد که باعث افزایش جریان کلسیم درون‌سلولی و مهار تجمع cAMP می‌گردد (۱۹-۱۷). این مسیرهای سیگنالی به فعال‌سازی عوامل نسخه‌برداری، پروتئین‌های داربست سلولی، بیان مولکول‌های چسبان (Adhesion molecule) و فعالیت کاسپازها مرتبط می‌باشند (۲۰). تزریق S1P و اسفنگوزین به عضلات قطع نخاع شده باعث افزایش بیان در سطح دو عامل رونویسی میوژنیک Myo-D و میوژنین و تبدیل تار تندانقباض به کندانقباض می‌گردد (۱۳). در مطالعه Nagata و همکاران اسفنگومیلینی که برای تولید S1P متابولیزه شد؛ باعث انتقال سلول‌های اقماری از حالت خاموشی به تکثیر شونده گردید. به‌علاوه در یک مدل آسیب عضلانی، بلوک کردن تولید S1P از طریق مهار SK1 سبب اختلال در بازسازی سلول عضلانی گردید که نشان می‌دهد S1P دارای نقش مهمی در بازسازی عضلانی از طریق سلول‌های بنیادی اقماری (Satellite stem cells) است (۹و۱۰). در ضمن سطوح SK1 و S1P درونزاد در تارهای آسیب‌دیده بالاتر بود و با سلول‌های اقماری در ارتباط بود که نشان می‌دهد محور SK1/S1P در حمایت و ترمیم بافت آسیب‌دیده درگیر است (۲۱). Folland و Williams نیز به نقش S1P در تکثیر و بقاء مزونژیوبلاست‌ها اشاره داشتند (۲۲). اضافه‌کردن برونزاد S1P باعث تحریک رشد میوفیبرهای در حال بازسازی شد؛ در حالی که کاهش محتوای سیستمی این لیپید از طریق خنثی‌کردن تولید آن، باعث نتایج معکوس گردید که نشان می‌دهد این لیپید بیواکتیو به عنوان یک عامل رشد جدید در رشد سلول است (۲۳). Danieli-Betto و همکاران نشان دادند که ورزش حاد طولانی مدت محتوای S1P در عضله نعلی و بخش قرمز عضله دو قلو را افزایش می‌دهد (۲۴). در مقابل در مطالعه‌ای به‌دنبال ۵ هفته تمرین هوازی، تغیر معنی‌داری در محتوای S1P عضلات نعلی و دوقلوی موش صحرایی دیده نشد (۲۵). همچنین نشان داده شد که در عضله نعلی موش صحرایی هیچ تغییری در محتوای S1P تا دقیقه ۹۰ از یک تمرین دو روی تردمیل مشاهده نشد. با این حال در نقطه واماندگی، محتوای S1P تا دو برابر افزایش یافت (۲۶). از آنجا که در مطالعات فوق الذکر از S1P به‌عنوان یک عامل میوژنیک با عملکرد گسترده و متنوع نام برده شد و از طرف دیگر از آنجا که هیچ تحقیقی تاکنون رفتار و پاسخ این لیپید بیواکتیو را در پاسخ به این گونه تمرین مقاومتی مطالعه نکرده است و تحقیقات قبلی یا از پروتکل‌های حاد و یا استقامتی استفاده کرده‌اند؛ لذا این مطالعه به منظور تعیین اثر ۸ هفته تمرین مقاومتی بر مقدار اسفنگوزین-۱-فسفات، میزان بیان ژن اسفنگوزین-۱-فسفات کیناز۱ و ایزوفرم‌های مختلف زنجیره سنگین میوزینی (MHC I, IIa, IIb, IIx) عضلات اسکلتی تند و کند انقباض موش صحرایی نر انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی روی ۲۴ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار ۸هفته‌ای با وزن تقریبی ۲۵۰-۱۹۰ گرم خریداری شده از مرکز

تحقیقاتی پاستور در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد در سال ۱۳۹۰ انجام شد. این تحقیق توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد تایید شد.

پروتکل کار بر روی حیوانات رعایت گردید. موش‌ها به‌صورت جفتی در قفس‌های استاندارد و در محیط کنترل شده‌ای با درجه حرارت ۲۲ درجه سانتی‌گراد و چرخه خواب و بیداری ۱۲ ساعته نگهداری شدند. غذا به‌صورت پلیت و آب در دسترس آنها بود. بعد از یک ماه آشناسازی، موش‌ها به صورت تصادفی در دو گروه ۱۲ تایی کنترل و تمرینی قرار گرفتند.

گروه کنترل در طول دوره تمرین در قفس‌ها قرار داشت و برای کنترل سلامت حیوانات وزن آنها هر هفته اندازه‌گیری شد.

در پروتکل تمرین، نردبان مقاومتی با یک متر ارتفاع و فاصله میله‌های ۲ سانتی‌متری با شیب ۸۵ درجه استفاده گردید. از وزنه‌هایی که با چسب نواری به دم موش‌های صحرایی متصل شد؛ استفاده گردید. بعد از یک هفته آشناسازی با دستگاه تمرین مقاومتی، تمرین در هفته اول با وزنه‌ای معادل ۵۰درصد وزن بدن شروع شد و این وزنه‌ها به دم موش ها (درست ۲-۱ سانتی‌متر پایین‌تر از محل رویش مو) متصل شد. بار تمرین تا ۲۰۰درصد وزن بدن حیوانات تا پایان هفته هشتم ادامه داشت. یک تکرار موفق زمانی محسوب گردید که حیوان توانست پله‌ها را کامل و در زمان حدود ۸ ثانیه بالا رود. موش‌ها در پایین پله‌ها قرار گرفتند و برای بالارفتن برانگیخته شدند. فقط ضربات بسیار آهسته به دم آنها یا میله‌ها انگیزش برای بالارفتن بود. در این مطالعه از هیچ گونه پاداش غیرطبیعی و تحریک غیرطبیعی مثل تحریک الکتریکی، آب سرد و فشار هوا استفاده نشد. تعداد تکرارها در هر جلسه ۲۰ دفعه بود. وقتی یک حیوان به بالای دستگاه رسید و یک تکرار را انجام داد؛ بعد از ۴۵ ثانیه برای تکرار بعدی آماده گردید. در شروع هر برنامه ۲ ست ۵ تکراری گرم کردن بدون وزنه انجام شد. پروتکل تمرین در هر روز در ۴ ست ۵ تکراری انجام شد و بعد از هر ست ۲دقیقه استراحت درنظر گرفته شد. در پایان هر جلسه تمرین حیوان یک ست تمرین ۵ تکراری بدون وزنه با ۳ دقیقه استراحت بین هر تکرار را برای سرد کردن انجام داد. این برنامه تمرین برای ۸ هفته ادامه داشت.

تمام مراحل جراحی در یک جلسه انجام شد. موش‌ها ۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرین (برای از بین رفتن اثرات حاد تمرین) از طریق تزریق کتامین (۷۵ mg/kg) و گزالایسین (۲۰ mg/kg) بیهوش و سپس قربانی شدند. عضلات تاکننده بلند انگشت شست پا (Flexor Hallucis Longus: FHL) به عنوان عضله تندانقباض و عضله نعلی (Soleus: SOL) به عنوان کندانقباض خارج شدند. نمونه‌های عضلات سریعاً در نیتروژن مایع منجمد شد و سپس برای آنالیزهای بیوشیمیایی و ژنتیک بعدی در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

S1P (شماره کاتالوگ 860492P) و C17-S1P (یک آنالوگ ۱۷ کربنی از S1P، به عنوان استاندارد داخلی، شماره کاتالوگ 860643) از شرکت Avanti Polar Lipids خریداری شد. فتال‌دی‌آلدهید (OPA) (شرکت مرک آلمان، شماره کاتالوگ۱۱۱۴۵۲) مناسب برای تشخیص HPLC (High pressure liquid chromatography) فلورومتری تهیه شد. همچنین آلکالین فسفاتاز از شرکت Sigma (شماره کاتالوگ A2356،10KU) تهیه شد. دیگر محلول‌ها مثل اتانول، بتا-مرکاپتواتانل از شرکت مرک آلمان (شماره تولید 444203-250ML) خریداری شدند. تمام استانداردهای لیپیدی به‌صورت محلول تهیه و در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. محتوای S1P موجود در فاز کلروفرم به‌وسیله دستگاه کروموتوگرافی مایع با فشار بالا (HPLC) با یک سیستم دتکتور فلوروسنس و یک ستون C18 (NanoLC Aligent 1200 series) اندازه‌گیری شد. براساس مطالعه Min و همکاران C17-S1P به عنوان استاندارد داخلی قبل از هموژن کردن نمونه‌ها اضافه شد و نمونه‌ها در محیط یخی اولتراسونیک شدند. S1P موجود در نمونه‌ها از طریق آلکالین فسفاتاز به اسفنگوزین تبدیل شده و این محصولات از طریق OPA قبل از تزریق به دستگاه مشتق‌سازی شدند (۲۷). محلول مورد استفاده استونیتریل (Acetonitrile) (مرک آلمان شماره کاتالوگ100030) و آب HPLC grade (شرکت ندای فن) به نسبت (۹:۱v\v) بود. میزان جریان (Flow Rate) یک میلی‌لیتر در دقیقه بود.

میزان تقریبی ۵۰ میلی‌گرم عضله با روش هاون‌کوبی پودر گردید و برای استخراج کل RNA در ۸۰۰ میکرولیتر ترایزول (Trizol) شرکت Invitrogen (شماره کاتالوگ026-15596) هموژن گردید. بااستفاده از دستورالعمل شرکت سازنده RNA استخراج شد. سپس RNA استخراج شده که به‌صورت پلیت روشن بود؛ در ۵۰ میکرولیتر آب RNAase-Free حل گردید. انسجام و کامل بودن RNA به‌وسیله استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز و مشاهده باند RNA بین دو باند 18s و 28s زیر نور U.V بررسی گردید. برای تعیین کیفیت و غلظت RNA از دستگاه نانودراپ استفاده گردید. نسبت جذب نوری در طول موج ۲۶۰ به جذب نوری در طول موج ۲۸۰ (A260/A280) برآوردی از خلوص RNA بود. همچنین نسبت جذب نوری در طول موج ۲۶۰ به جذب نوری در طول موج ۲۳۰ (A260/A230) نشان‌دهنده آلودگی فنلی بود. این نسبت برای RNA بین ۱/۸ تا ۲ بود. مقادیر کمتر از ۱/۸ نمایانگر وجود آلودگی با پروتئین یا مواد آروماتیک و یا نشانه غلظت کم RNA بود. نمونه‌هایی که نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ آنها بین ۱/۸ تا ۲

جدول ۱ : توالی پرایمر برای ژن‌های 18s، S1P1 ، S1P2 ، S1P3

پرایمر			شماره دسترسی	طول قطعه
18S rRNA	F	GTTGGTTTTCGGAACTGAGGC	Pattyn et al. (2003)	204bp
	R	GTCGGCATCGTTTATGGTCG		
SK1	F	CCGTACTTGGTTCATGTGCCA	NM_017301	80pb
	R	TCCCCGTCCACAGAAAACACT		
MHC I	F	TTGCTCTACCCAACCCTAAGGATG	NM_017192	81bp
	R	TTGTGTTTCTGCCTGAAGGTGC		
MHC IIa	F	CTCAGGCTTCAAGATTTGGTGG	XM_225216	265bp
	R	TTGTGCCTCTCTTCGGTCATTC		
MHC IIb	F	GAGGTTCACACCAAAGTCATAAGC	NM_176079	129bp
	R	CTTCGCTTATGACTTGGATCCTTG		
MHC IIx	F	GGAGGAACAATCCAACGTCAACC	NM_017115	178bp
	R	GGTCACTTTCCTGCTTTGGATCG		

بود انتخاب شدند و در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد برای آزمایش‌های بعدی نگهداری شدند.

ساخت cDNA با استفاده از کیت Reverse Transcriptase M-MuLV (Fermantas شماره کاتالوگ EF0441) مطابق دستور کار شرکت سازنده، با استفاده از پرایمرهای تصادفی هگزامر در دستگاه ترموسایکلر Techne صورت گرفت. محصول تولید شده بلافاصله در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تعیین بیان mRNA نسبی از طریق Real-time RT-PCR با استفاده از دستگاه Applied Biosystems (48 well) StepOnePlus™ Real-Time PCR System نسبت به بیان ژن 18S rRNA انجام شد. توالی پرایمر برای ژن‌های 18s، S1P1 ، S1P2 ، S1P3 در جدول یک آمده است.

کل حجم واکنش برابر ۲۰ میکرولیتر بود. این حجم شامل ۱۰میکرولیتر Master Mix Syber Green (Primer design,UK) (کد Precision-R-SY)، ۱/۴ میکرولیتر مجموع دو پرایمر (هر پرایمر به مقدار ۵ پیکومول)، ۵ میکرولیتر آب استریل RNAase Free و ۳/۶ میکرولیتر از نمونه cDNA (۵۰ نانوگرم) بود. مراحل PCR شامل یک مرحله دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه، یک دمای Annealing (جفت شدن) در ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه به‌همراه یک دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه بود که در ۴۰ سیکل تکرار انجام شد. سیکل طویل شدن انتهایی ۶۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود.

میزان بیان ژن از طریق فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه گردید (۱۳). در این مطالعه $\Delta\Delta CT$ هر ژن در بافت عضله دوقلوی (Gastrocnemius) ۱۲ موش گروه کنترل به عنوان معیار برای تعیین نسبت بیان ژن‌ها استفاده گردید. از تقسیم $\Delta\Delta CT$ هر ژن در بافت مورد نظر گروه کنترل یا مورد بر $\Delta\Delta CT$ همان ژن در عضله دوقلو نسبت بیان محاسبه گردید.

داده‌ها با میانگین و انحراف معیار توصیف گردید و پس از انجام آزمون نرمالیتی Kolmogorov-Smirnov، مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS-17 و independent t-test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سطح معنی‌داری آزمون‌ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در شروع مطالعه و پس از ۸ هفته تمرین مقاومتی، تغییر معنی‌داری در وزن حیوانات مشاهده نشد (جدول ۲).

بین مقدار S1P عضله FHL گروه تمرین (۰/۲۹۲±۱/۰۴۲) و کنترل (۰/۱۴۶±۰/۶۰۸) (P<۰/۰۰۱) و عضله SOL گروه تمرین (۰/۱۱۱±۰/۵۸۷) و کنترل (۰/۱۵۹±۰/۴۲۷) (P<۰/۰۰۹) تفاوت آماری معنی‌داری یافت شد.

در مقایسه با گروه کنترل میزان بیان آنزیم SK1 در عضله FHL گروه کنترل ۷/۶±۸/۴۰ و گروه تمرین ۲۳/۰۵ ±۲۴/۷۰ (P<۰/۰۲۸) و SOL گروه کنترل ۴/۰۳ ±۴/۶۳ و گروه تمرین ۱۱/۱۷ ±۱۲/۲۴ (P<۰/۰۴۳) تعیین شد.

جدول ۲ : میانگین و انحراف معیار تغییرات وزن و مقادیر S1P در بافت‌های موش‌های صحرایی

		گروه تمرین	گروه کنترل	مقدار t	p-value
وزن (گرم)	قبل از تمرین	۲۲۳/۲۵±۱۱/۹۵	۲۲۴/۴۱±۱۵/۷۷	۰/۲۰۴	۰/۸۴۰
	بعد از تمرین	۲۸۵/۸۳±۱۸/۵۰	۲۸۰/۵۸±۱۶/۲۰	۰/۷۳۹	۰/۴۶۷
محتوای S1P عضله (pmol/mg weight)	تاکننده بلند انگشت شست پا	۱/۰۴۲±۰/۲۹۲	۰/۶۰۸±۰/۱۴۶	۴/۶۰۴	۰/۰۰۱ *
	نعلی	۰/۵۸۷±۰/۱۱۱	۰/۴۲۷±۰/۱۵۹	۲/۸۶۵	۰/۰۰۹ *

P<۰/۰۵ *

میزان بیان ژن MHC I در عضله FHL گروه تمرینی ۰/۰۲۸±۰/۰۳۸ و در گروه کنترل ۰/۰۲۸±۰/۱۴ و در عضله SOL گروه تمرینی ۴/۶±۲/۷۱ و گروه کنترل ۲/۲±۳/۲۲ تعیین شد و از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نداشت. از طرفی در گروه تمرین اختلاف معنی‌داری در بیان این ژن بین عضله FHL و SOL وجود داشت (P<۰/۰۰۱) و در گروه کنترل نیز اختلاف معنی‌داری در بیان این ژن بین عضله FHL و SOL یافت شد (P<۰/۰۰۱).

در بیان ژن گیرنده MHC IIa در بافت‌های مختلف اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۰۲۲). به‌طوری که تمرین مقاومتی باعث افزایش معنی‌داری در بیان ژن IIa در عضله FHL گروه‌های تمرین (۱/۷±۲/۵۲) و کنترل (۰/۶۹±۱/۲۱) (P<۰/۰۱۳) و SOL گروه تمرین (۷/۵۳±۷/۱۹) و کنترل (۲/۶۵±۲/۶۸) (P<۰/۰۲۸) گردید. همچنین تمرین مقاومتی سبب افزایش معنی‌داری در بیان ژن MHC IIb در عضله FHL گروه‌های تمرین (۰/۴۸±۱/۰۸) و کنترل (۴/۵±۳/۸۱) (P<۰/۰۲۱) و SOL گروه‌های تمرین (۱/۲۳±۰/۶۷) و کنترل (۱/۱۶±۰/۹۲) (P<۰/۰۴۳) گردید.

بین بیان ژن MHC IIx در عضلات SOL گروه تمرینی (۰/۶۱±۰/۳۳) و کنترل (۰/۵۸±۰/۴۶) تغییرات آماری معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۴۳).

بحث

در مطالعه حاضر تمرین مقاومتی به‌طور قابل ملاحظه‌ای میزان S1P عضلات را افزایش داد. به‌نظر می‌رسد که تمرین مقاومتی میزان شکل‌گیری این لیپید را افزایش و میزان تجزیه آن را کاهش داده است. نتایج مطالعه Koopman و همکاران بیانگر آن است که میزان S1P در عضله FHL بالاتر از مقدار آن در عضله نعلی در گروه تمرینی و کنترل بود. می‌توان نتیجه گرفت که پاسخ تمرین مقاومتی می‌تواند نسبت به نوع تار عضله ویژه باشد (۲۸).

در مطالعه حاضر میزان S1P (pmol/mg weight) در عضله FHL و SOL گروه کنترل به ترتیب برابر ۰/۱۴۶±۰/۶۰۸و ۰/۱۵۹±۰/۴۲۷ تعیین شد. در این مطالعه نشان داده شد که به‌دنبال تمرین مقاومتی افزایش معنی‌داری در بیان ژن آنزیم SK1 تار تند و کند گردید که می‌تواند یک دلیل افزایش تولید S1P در این دو نوع تار به‌دنبال تمرین مقاومتی باشد. بسیاری از عوامل رشدی مثل PDGF، EGF، IGF و انسولین، به‌علاوه سایتوکین‌های TNF- α و IL-6 باعث فعال شدن آنزیم SK1 شده که می‌تواند باعث افزایش موقت (معمولاً ۳-۲ برابر) S1P گردد (۲۹). در مطالعات مختلف نشان داده شده که به‌دنبال تمرین طولانی مدت مقاومتی میزان IGF-I پلاسما افزایش معنی‌داری می‌یابد (۳۲-۳۰). از این مطالعات می‌توان نتیجه گرفت که سطوح افزایش یافته IGF-I می‌تواند دلیلی برای افزایش فعالیت SK1 و متعاقباً تولید S1P باشد. در تحقیق Dobrzyn و همکاران، ۶ هفته ورزش استقامتی کل محتوای سرامید موش‌های صحرایی نژاد ویستار را کاهش داد؛ اما اثری روی محتوای اسفنگوزین نداشت (۳۳). در مطالعه Błachnio-Zabielska و همکاران یک تمرین حاد طولانی مدت محتوای کل S1P را در عضله نعلی و بخش قرمز عضله دوقلو افزایش داد (۲۶). در مقابل در مطالعه‌ای ۵ هفته تمرین استقامتی هوازی تغییر معنی‌داری در میزان S1P عضلات نعلی و دوقلو ایجاد ننمود (۲۵) و علی‌رغم تفاوت با نوع و مدت تمرین با مطالعه ما مغایر بود. در مطالعه Formigli و همکاران فعالیت آنزیم SK1 و سطح S1P درونزاد در بافت‌های آسیب دیده به‌طور معنی‌داری افزایش داشت و با سلول‌های اقماری همبستگی داشت که نشان‌دهنده درگیری SK1/S1P در ترمیم و بهبود آسیب است. این نتایج در حمایت از نقش S1P به‌عنوان یک رویکرد جدید درمانی برای عضلات اسکلتی آسیب دیده است (۲۱). در مطالعه Danieli-Betto و همکاران S1P درون‌سلولی تولید شده توانست در جایگاه‌های آسیب دیده آزاد شود و فرآیند ترمیم بافت آسیب دیده را تحریک کند. فعال شدن SK1 و تولید S1P می‌تواند عوامل متعددی چون HGF که یک عامل میوژنیک است را فعال نماید (۲۳) که این یافته به طور مستقیم و غیرمستقیم نتایج مطالعه ما را تقویت می‌کند. در این تحقیق نشان داده شد که تمرین دارای اثرات مثبت و معنی‌داری در بیان ژن SK1 داشته و از طرف دیگر، اختلاف مشاهده شده در مقدار S1P عضلات در گروه‌های تمرینی و کنترل می‌تواند به سبب افزایش بیان این آنزیم باشد؛ اما همبستگی معنی‌داری بین مقدار S1P عضلات و بیان این آنزیم مشاهده نشد. لذا به نظر می‌رسد مسیرهای دیگری در سنتز S1P به جزء SK1 وجود داشته باشد و یا بین مقدار بیان mRNA و مقدار پروتئین این آنزیم تفاوت وجود داشته باشد. علاوه بر فعال‌سازی سریع SK، سایتوکاین‌ها و عوامل رشدی می‌توانند بیان SK را افزایش دهند (۳۴).

به‌دنبال ۸ هفته تمرین مقاومتی تفاوت غیرمعنی‌داری در بیان ژن MHC I در عضله FHL گروه تمرینی نسبت به کنترل و عضله SOL تمرین کرده نسبت به کنترل دیده شد. به‌دنبال ۸ هفته تمرین مقاومتی اختلاف معنی‌داری در بیان ژن MHC IIa در بافت‌های مختلف دیده شد. به‌طوری که تمرین مقاومتی باعث افزایش معنی‌داری در بیان این ژن در عضله FHL و SOL نسبت به گروه کنترل گردید. به‌علاوه، تمرین مقاومتی باعث افزایش معنی‌داری در بیان ژن MHC IIb در عضله FHL و SOL نسبت به گروه کنترل گردید. تمرین مقاومتی باعث تغییر غیرمعنی‌داری در بیان این ژن در عضله FHL گروه تمرین کرده نسبت به گروه کنترل گردید و نیز تمرین مقاومتی باعث تغییر معنی‌داری در بیان این ژن در عضله SOL گروه تمرین کرده نسبت به گروه کنترل گردید. در مطالعه Putman و همکاران به‌دنبال ۱۲ هفته تمرین مقاومتی در مردان و زنان افزایش معنی‌داری در بیان ژن IIa دیده شد (۳۵). به‌علاوه

کاهش معنی‌داری در بیان ژن IIx دیده شد که با نتایج تحقیق ما همسو بود. از طرف دیگر در مطالعه Putman و همکاران تمرین مقاومتی باعث افزایش بیان ژن MHC I گردید (۳۵) که با نتایج تحقیق حاضر همسو نبود. در طول عصب‌زدایی عدم فعالیت باعث توسعه آتروفی تارهای عضلانی می‌گردد. آتروفی مرتبط با تغییرات ترکیب MHC، به ویژه کاهش MHC آهسته (نوعI) شده که با بیان بیشتر ایزوفرم‌های تند جبران می‌گردد. تزریق S1P یا اسفینگوزین به عضله کند نعلی، تغییر تار کند انقباض به تند انقباض ناشی از بی‌تحرکی را کاهش داده است (۱۳). با توجه به این که به‌دنبال تمرین مقاومتی تغییر فنوتیپ نوع تار تند به کند رخ می‌دهد و تحقیق ما نیز دارای چنین پروتکل تمرینی بود؛ به‌نظر می‌رسد که افزایش بیان ژن MHC IIa و کاهش همزمان بیان MHC IIb و MHC IIx در این تحقیق با توجه به نوع پروتکل تمرین ما دور از انتظار نیست. به‌دنبال ۸ هفته تمرین مقاومتی همبستگی معنی‌داری بین مقدار S1P عضلانی گروه تمرین کرده و بیان ژن‌های MHCs مشاهده نشد. هرچند در مطالعه Zanin و همکاران به‌دنبال تزریق S1P و اسفنگوزین به عضله نعلی عصب‌زدایی شده، تغییر ایزوفرم نوع تند به آهسته مشاهده شد (۱۳)؛ اما درمطالعه ما همبستگی بین مقدار S1P عضلانی با ایزوفرم‌های مختلف MHC دیده نشد و می‌توان گفت شاید مکانیسم‌های دیگری در تغییر ایزوفرم MHC درگیر هستند. به‌دنبال ۸ هفته تمرین مقاومتی همبستگی معنی‌داری بین بیان ژن آنزیم SK1 و مقدار S1P عضلانی در عضله FHL گروه تمرین (r=+۰/۶۰۱، P<۰/۰۴۸) و عضله SOL گروه کنترل (r=+۰/۷۷۳، P<۰/۰۰۳) مشاهده شد. یکی از مسیرهای اصلی در تولید S1P عضلانی افزایش بیان و فعالیت آنزیم SK1 بوده که عوامل مختلفی بر بیان و فعالیت آن اثرگذارند و می‌توان به افزایش IGF، MGF و سایتوکین‌ها اشاره کرد. با توجه به این که به‌دنبال تمرین مقاومتی این عوامل تنظیم مثبت شده و باعث افزایش بیان و فعالیت این آنزیم کلیدی در تولید S1P می‌گردد؛ به‌نظر می‌رسد که این همبستگی معنی‌دار بین برخی گروه‌ها منطقی باشد. اما از طرف دیگر، در برخی گروه‌ها همبستگی معنی‌دار نبود. در توجیه این مورد می‌توان گفت برخی از عوامل رشدی علاوه بر افزایش در بیان و فعالیت آنزیم SK1، در مهار آنزیم تجزیه کننده S1P نیز موثر بوده و میزان تجزیه آن را کاهش می‌دهند (۳۶). علاوه بر موارد اشاره شده، S1P که به طور درون سلولی تولید شده، می‌تواند به وسیله انتقال‌دهنده ویژه ABCC1 به خارج سلول رها شود (۳۷). این انتقال یک‌طرفه S1P از بافت عضله اسکلتی به داخل جریان خون نیز می‌تواند دلیل دیگری بر عدم همبستگی بین میزان S1P عضله اسکلتی و بیان آنزیم تولیدکننده آن باشد.

در مطالعه حاضر ۸ هفته تمرین از نوع مقاومتی فزاینده در موش‌های جوان سالم باعث افزایش معنی‌دار در مقدار S1P عضلات تند و کند گردید. این افزایش در بافت‌های تند انقباض بالاتر بود. از طرف دیگر مقدار بیان آنزیم تولید کننده عضلانی آن نیز به‌دنبال تمرین افزایش نشان داد. در این مطالعه به‌دنبال تمرین بیان MHC IIa افزایش و ایزوفرم‌های نوع MHC IIb و MHC IIx کاهش نشان دادند. این الگو در هایپرتروفی مشاهده شده است؛ اما همبستگی معنی‌داری بین بیان آنزیم SK1 و مقدار عضلانی آن با هیچ‌یک از مقادیر بیان ایزوفرم‌های MHCs دیده نشد. با توجه به نتایج مطالعه حاضر به‌نظر می‌رسد که S1P یکی از عوامل میوژنیک به‌دنبال تمرین‌های مقاومتی و قدرتی باشد. لذا پیشنهاد می‌گردد در تحقیقات بعدی نقش این عامل به عنوان یکی از عوامل میوژنیک به‌صورت مولکولی مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که تمرین مقاومتی به‌طور قابل ملاحظه‌ای سبب افزایش میزانS1P عضلانی و بیان MHCs و SK1 می‌گردد. با توجه به نقش ساختاری و عملکردی این اسفنگولیپید و از آنجا که این عامل به‌دنبال یک دوره تمرین مقاومتی افزایش می‌یابد؛ می‌توان گفت که یکی از عوامل رشدی و مسیرهای سیگنالی در هایپرتروفی عضلانی است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب (شماره ۳۶۰-۷۴-۰۱-۱۳۸۹) دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد بود و با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد انجام شد. بدین‌وسیله از همکاری بی‌دریغ آقای دکتر مرتضی هاشم زاده رئیس مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Toigo M, Boutellier U. New fundamental resistance exercise determinants of molecular and cellular muscle adaptations. Eur J Appl Physiol. 2006 Aug;97(6):643-63.

2. Agbulut O, Noirez P, Beaumont F, Butler-Browne G. Myosin heavy chain isoforms in postnatal muscle development of mice. Biol Cell. 2003 Sep;95(6):399-406.

3. Lahiri S, Futerman AH. The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids. Cell Mol Life Sci. 2007 Sep; 64(17):2270-84.

4. Zeidan YH, Hannun YA. Translational aspects of sphingolipid metabolism. Trends Mol Med. 2007 Aug;13(8):327-36.

5. Dyatlovitskaya EV. The role of lysosphingolipids in the regulation of biological processes. Biochemistry (Mosc). 2007 May; 72(5):479-84.

6. Igarashi J, Erwin PA, Dantas AP, Chen H, Michel T. VEGF induces S1P1 receptors in endothelial cells: Implications for cross-talk between sphingolipid and growth factor receptors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Sep;100(19):10664-9.

7. Yatomi Y. Plasmasphingosine1-phosphatemetabolism and

analysis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. 2008 Mar; 1780(3): 606-11.

8. Kim RH, Takabe K, Milstien S, Spiegel S. Export and functions of sphingosine-1-phosphate. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. 2009 Jul; 1791(7): 692-6.

9. Nagata Y, Kobayashi H, Umeda M, Ohta N, Kawashima S, Zammit PS, et al. Sphingomyelin levels in the plasma membrane correlate with the activation state of muscle satellite cells. J Histochem Cytochem. 2006 Apr;54(4):375-84.

10. Nagata Y, Partridge TA, Matsuda R, Zammit PS. Entry of muscle satellite cells into the cell cycle requires sphingolipid signaling. J Cell Biol. 2006 Jul;174(2):245-53.

11. Bencini C, Squecco R, Piperio C, Formigli L, Meacci E, Nosi D, et al. Effects of sphingosine 1-phosphate on excitation-contraction coupling in mammalian skeletal muscle. J Muscle Res Cell Motil. 2003;24(8):539-54.

12. Rapizzi E, Taddei ML, Fiaschi T, Donati C, Bruni P, Chiarugi P. Sphingosine 1-phosphate increases glucose uptake through trans-activation of insulin receptor. Cell Mol Life Sci. 2009 Oct; 66(19):3207-18.

13. Zanin M, Germinario E, Dalla Libera L, Sandonà D, Sabbadini RA, Betto R, et al. Trophic action of sphingosine 1-phosphate in denervated rat soleus muscle. Am J Physiol Cell Physiol. 2008 Jan; 294(1):C36-46.

14. Watterson K, Sankala H, Milstien S, Spiegel S. Pleiotropic actions of sphingosine-1-phosphate. Prog Lipid Res. 2003;42(4):344-57.

15. Diatlovitskaia EV, Kandyba AG. [Bioeffector sphingolipids as stimulators of cell growth and survival]. Bioorg Khim. 2004 May-Jun; 30(3):227-33. [Article in Russian]

16. Sanchez T, Hla T. Structural and functional characteristics of S1P receptors. J Cell Biochem. 2004 Aug;92(5):913-22.

17. Gräler MH. Targeting sphingosine 1-phosphate (S1P) levels and S1P receptor functions for therapeutic immune interventions. Cell Physiol Biochem. 2010;26(1):79-86.

18. Pébay A, Bonder CS, Pitson SM. Stem cell regulation by lysophospholipids. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2007 Nov; 84(3-4):83-97.

19. Serra M, Saba JD. Sphingosine 1-phosphate lyase, a key regulator of sphingosine 1-phosphate signaling and function. Adv Enzyme Regul. 2010; 50(1):349-62.

20. Pyne S, Pyne NJ. Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells. Biochem J. 2000 Jul;349(Pt 2):385-402.

21. Formigli L, Sassoli C, Tani A, Squecco R, Francini F, Meacci E, et al. Skeletal muscle repair/regeneration after eccentric contraction-induced damage: effects of S1P. Ital J Anat Embryol. 2010; 115(1/2):190.

22. Folland JP, Williams AG. The adaptations to strength training : morphological and neurological contributions to increased strength. Sports Med. 2007;37(2):145-68.

23. Danieli-Betto D, Peron S, Germinario E, Zanin M, Sorci G, Franzoso S, et al. Sphingosine 1-phosphate signaling is involved in skeletal muscle regeneration. Am J Physiol Cell Physiol. 2010 Mar; 298(3):C550-8.

24. Danieli-Betto D, Germinario E, Esposito A, Megighian A, Midrio M, Ravara B, et al. Sphingosine 1-phosphate protects mouse extensor digitorum longus skeletal muscle during fatigue. Am J Physiol Cell Physiol. 2005 Jun;288(6):C1367-73.

25. Błachnio-Zabielska A, Zabielski P, Baranowski M, Gorski J. Aerobic Training in Rats Increases Skeletal Muscle Sphingomyelinase and Serine Palmitoyltransferase Activity, While Decreasing Ceramidase Activity. Lipids. 2011 Mar;46(3):229-38.

26. Błachnio-Zabielska A, Baranowski M, Zabielski P, Górski J. Effect of exercise duration on the key pathways of ceramide metabolism in rat skeletal muscles. J Cell Biochem. 2008 Oct; 105(3):776-84.

27. Min JK, Yoo HS, Lee EY, Lee WJ, Lee YM. Simultaneous quantitative analysis of sphingoid base 1-phosphates in biological samples by o-phthalaldehyde precolumn derivatization after dephosphorylation with alkaline phosphatase. Anal Biochem. 2002 Apr; 303(2):167-75.

28. Koopman R, Zorenc AH, Gransier RJ, Cameron-Smith D, van Loon LJ. Increase in S6K1 phosphorylation in human skeletal muscle following resistance exercise occurs mainly in type II muscle fibers. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2006 Jun; 290(6):E1245-52.

29. Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2008 Feb;9(2):139-50.

30. Kraemer WJ, Ratamess NA. Hormonal responses and adaptations to resistance exercise and training. Sports Med. 2005;35(4):339-61.

31. Marx JO, Ratamess NA, Nindl BC, Gotshalk LA, Volek JS, Dohi K, Bush JA, et al. Low-volume circuit versus high-volume periodized resistance training in women. Med Sci Sports Exerc. 2001 Apr;33(4):635-43.

32. Borst SE, De Hoyos DV, Garzarella L, Vincent K, Pollock BH, Lowenthal DT, et al. Effects of resistance training on insulin-like growth factor-I and IGF binding proteins. Med Sci Sports Exerc. 2001 Apr;33(4):648-53.

33. Dobrzyń A, Górski J. Ceramides and sphingomyelins in skeletal muscles of the rat: content and composition. Effect of prolonged exercise. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2002 Feb; 282(2):E277-85.

34. Yamanaka M, Shegogue D, Pei H, Bu S, Bielawska A, Bielawski J, et al. Sphingosine kinase 1 (SPHK1) is induced by transforming growth factor-beta and mediates TIMP-1 up-regulation. J Biol Chem. 2004 Dec;279(52):53994-4001.

35. Putman CT, Xu X, Gillies E, MacLean IM, Bell GJ. Effects of strength, endurance and combined training on myosin heavy chain content and fibre-type distribution in humans. Eur J Appl Physiol. 2004 Aug;92(4-5):376-84.

36. Kono Y, Nishiuma T, Nishimura Y, Kotani Y, Okada T, Nakamura S, et al. Sphingosine kinase 1 regulates differentiation of human and mouse lung fibroblasts mediated by TGF-beta1. Am J Respir Cell Mol Biol. 2007 Oct;37(4):395-404.

37. Mitra P, Oskeritzian CA, Payne SG, Beaven MA, Milstien S, Spiegel S. Role of ABCC1 in export of sphingosine-1-phosphate from mast cells. Proc Natl Acad Sci. 2006; 103(44): 16394-9.