Journal of Birjand University of Medical Sciences

Birjand University of Medical Sciences

Original Article

Effect of eight weeks of resistance training on the expression of klotho protein and insulin-like growth factor 1 genes in slow twitch and fast twitch skeletal muscles of aged Wistar rats

Somayeh Kasraei[1], **Seyyed Reza Attarzadeh Hosseini**[1], **Mehrdad Fathei**[1]

ABSTRACT

Background and Aims: Klotho protein is a substance effective in increasing life expectancy. Moreover, it prevents muscle atrophy, osteoporosis, and cardiovascular disease. Therefore, the present aimed to assess changes in the expression of klotho protein and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) genes in the muscles of aged Wistar rats after eight weeks of resistance training.

Materials and Methods: The present experimental study was connected on 16 Wistar male rats, aged 20 months, which were assigned to two groups of resistance training group and control. Resistance training was performed three sessions a week over eight weeks. After dissecting the rats, the soleus and flexor hallucis longus muscles of the rats were extracted to measure the expression of klotho protein and (IGF-1) genes using the real-time polymerase chain reaction technique.

Results: After the resistance training program, Klotho protein in the fast-twitch muscle tissue of the trained rats did not show a significant difference, compared to that in the control group. Furthermore, IGF-1 in the fast-twitch and slow-twitch muscles of the training group did not display a marked difference, compared to that in the control group.

Conclusion: As evidenced by the obtained results, the values of klotho protein and IGF-1 did not improve after a period of resistance training. It can be argued that resistance training should be conducted in longer periods and with different intensities, which should be scrutinized in future research.

Keywords: Elderly, Insulin-like growth factor 1, Klotho protein, Resistance training

Citation: Kasraei S, Attarzadeh Hosseini S.R, Fathei M. [Effect of eight weeks of resistance training on the expression of klotho protein and insulin-like growth factor 1 genes in slow twitch and fast twitch skeletal muscles of aged Wistar rats]. J Birjand Univ Med Sci. 2021; 28(1): 40-50. [Persian]

DOI http://doi.org/10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.1.104

Received: July 16, 2020 **Accepted:** November 21, 2020

[1] Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Corresponding author: Professor in Sport Physiology, Department of Physical Education and Sport Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
Tel: +985138805412 Fax: +985138807381 Email: attarzadeh@um.ac.ir

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.1.104]

مقاله اصیل پژوهشی

تاثیر هشت هفته تمرین مقاومتی بر بیان ژن های پروتئین کلوتو و عامل رشد شبه انسولینی–۱ در عضلات اسکلتی کند انقباض و تند انقباض رت های پیر نژاد ویستار

سمیه کسرائی[۱]، سید رضا عطار زاده حسینی[۱]، مهرداد فتحی[۱]

چکیده

زمینه و هدف: پروتئین کلوتو یک ماده مؤثر در افزایش طول عمر است که از آتروفی عضلانی، پوکی استخوان و بیماری‌های قلبی–عروقی پیشگیری می‌کند. لذا هدف این تحقیق بررسی تغییرات بیان ژن پروتئین کلوتو و عامل رشد شبه انسولینی–۱ در عضلات رت‌های پیر نژاد ویستار پس از هشت هفته تمرین مقاومتی بود.

روش تحقیق: در پژوهش حاضر به روش تجربی، تعداد ۱۶ سر رت نر نژاد ویستار با سن ۲۰ ماهه به دو گروه شامل گروه تمرین مقاومتی و گروه کنترل تقسیم شدند. تمرین مقاومتی به مدت هشت هفته و هر هفته سه جلسه انجام شد. عضله نعلی و تا کننده دراز شست پای رت‌ها تشریح شد و به منظور سنجش تغییرات بیان ژن‌های پروتئین کلوتو و عامل رشد شبه انسولینی–۱ از روش PCR RT- استفاده شد.

یافته‌ها: پروتئین کلوتو متعاقب یک دوره تمرین مقاومتی در بافت عضله تند انقباض گروه رت‌های تمرین کرده تفاوت معناداری را نسبت به گروه کنترل نشان نداد. هم‌چنین متغیر عامل رشد شبه انسولینی در بافت عضله تند انقباض و کند انقباض گروه تمرینی تفاوت معناداری را نسبت به گروه کنترل نشان نداد.

نتیجه‌گیری: نتایج تحقیق حاضر نشان داد که مقادیر کلوتو و عامل رشد شبه انسولینی پس از یک دوره تمرین مقاومتی بهبودی نداشته است و می‌توان اظهار داشت که اجرای تمرینات مقاومتی می‌بایست در دوره‌های طولانی‌تر و با شدّت‌های متفاوت تمرینی اجرا گردد که باید در تحقیقات آینده مورد بررسی قرار بگیرد.

واژه‌های کلیدی: سالمندی، عامل رشد شبه انسولینی–۱، پروتئین کلوتو، تمرین مقاومتی

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۴۰۰؛ ۲۸(۱): ۴۰–۵۰.

دریافت: ۱۳۹۹/۰۴/۲۶ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۹/۰۱

[۱] گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

نویسنده مسئول: گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
آدرس: مشهد– میدان آزادی– پردیس دانشگاه فردوسی مشهد– دانشکده علوم ورزشی
تلفن: ۰۵۱۳۸۸۰۵۴۱۲ نمابر: ۰۵۱۳۸۸۰۷۳۸۱ پست الکترونیکی: attarzadeh@um.ac.ir

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.1.104]

مقدمه

پیری جمعیت یک پدیده جهانی است؛ طی چند دهه اخیر با پیشرفت فناوری، زندگی ماشینی، ارتقای سطح بهداشت عمومی و فردی و بالارفتن سن امید به زندگی، جمعیت سالمندان افزایش یافته است (۱). تا سال ۲۰۰۰، حدود ۱۳ درصد از جمعیت جهان را سالمندان تشکیل می دادند، حال آنکه پیش بینی می شود تا سال ۲۰۴۰ این میزان به ۲۰ درصد افزایش یابد (۱). در ایران نیز طبق سرشماری در سال ۱۳۹۴، سالمندان بالای ۶۰ سال حدود ۱۰ درصد از کل جمعیت را تشکیل می دادند و پیش بینی می شود تا سال ۱۴۲۹ این میزان به حدود ۳۳ درصد برسد (۲). افزایش جمعیت سالمندان ضرورت اتخاذ روش هایی را برای ارتقای کیفیت زندگی سالمندان نمایان تر می کند.

سالمندان تحت شرایط مختلف هورمونی، کم تحرکی، بیماری و تغذیه دچار کاهش توده عضلانی و کاهش عملکرد عضلانی می‌شوند؛ در همین راستا توجه به تاثیر فعالیت بدنی به عنوان یک عامل کاهنده روند سالمندی و موثر بر شاخص های ضدپیری و بهبود وضعیت عضلانی و شاخص های مرتبط با آن نظیر پروتئین کلوتو[1] بسیار حائز اهمیت می باشد (۳،۴).

کلوتو یکی از عوامل ژنتیکی است که در تنظیم ژن های متعدد سهیم در روند پیری و کاهش طول عمر نقش دارد و مطالعات نشان داده اند که کلوتو به عنوان یک سرکوبگر فرایندهای مرتبط با سالمندی شناسایی شده است (۵). کلوتو به عنوان کورسپتور در اتصال فاکتورهای رشد فیبروبلاست[2] FGF15/FGF19 به گیرنده های FGFR1-4[3] و آغاز فعالیت سیگنالینگ ERK1/2[4] نقش مهمی در هیپرتروفی عضله اسکلتی دارد (۶). این پروتئین با فعال کردن فاکتور رونویسی FOXO [5] و افزایش بیان آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)[6] میتوکندریایی سبب افزایش مقاومت به استرس اکسیداتیو می شود و به عنوان کورسپتور اجباری FGF-23 سبب حفظ هومئوستاز کلسیم و فسفات بدن نیز می شود. به علاوه کلوتو با شرکت در مسیرهای بیولوژیکی متعدد دیگری مانند مسیرهای wnt [7] و P53/P21 در کاهش سرعت پیری موثر است (۷). Semba و همکاران در پژوهش خود اظهار داشتند که در سالمندانی با سطح پلاسمایی بالای کلوتو نسبت به سالمندان دارای سطح پایین کلوتو خطر مرگ و میر کمتر است (۸).

علاوه بر این، IGF-1 نیز به عنوان محرک مثبت رشد عضلانی شناخته می شود و از عواملی است که با افزایش سن کاهش یافته و از این رو یکی از واسطه‌های اصلی تحلیل عضلانی مرتبط با سن شناخته شده است (۹). IGF-1 عامل آنابولیکی قوی عضلات اسکلتی است و بر اثر فعال سازی مسیر AKt/TSC2/mTOR[8] بر اعمالی مثل تمایز سلولی و افزایش سنتز پروتئین از راه افزایش انتقال اسیدهای آمینه و مهار تجزیه پروتئین سلولی تاثیر می گذارد که در نهایت به رشد عضلات اسکلتی منجر می شود (۱۰).

در این راستا تمرین ورزشی از نوع مقاومتی یک راهکار موثر و سالم برای افزایش قدرت و توده عضلانی و هم‌چنین ظرفیت کارکردی افراد مسن معرفی شده است (۱۱). در مطالعه‌ای تنظیم مثبت کلوتوی گردشی در موش‌های جوان و پیر تحت تمرینات ورزشی سرعتی بیانگر ارتباط بین انقباض عضله اسکلتی در طی فعالیت بدنی و بیان ژن کلوتو و توضیحی برای عملکرد ضد پیری آن بود (۱۲). حال آنکه در برخی تحقیقات به واسطه افزایش حاد شاخص های التهابی و استرس اکسیداتیو بواسطه اجرای تمرینات بدنی تغییرات مقادیر کلوتو در بافت های مختلف متفاوت بوده است (۱۳).

تحقیقات نشان داده اند که در آتروفی عضلانی با افزایش سن؛ اندازه و تعداد هر دو نوع تار عضلانی تند انقباض و کند انقباض کاهش می یابند، ولی کاهش تعداد و اندازه تارهای تند انقباض در مقایسه با تارهای کند انقباض در اثر افزایش سن شدیدتر است. از طرفی نشان داده شده است که تارهای تند انقباض در زمینه رشد

[1] Klotho
[2] Fibroblast growth factors (FGFs)
[3] Fibroblast Growth Factor Receptor1-4 (FGFR1-4)
[4] Extracellular-signal-regulated protein kinase ½ (ERK1/2)
[5] Members of the class O of forkhead box transcription factors (FOXO)
[6] Superoxide dismutase (SOD)
[7] Wnt Signaling Pathway
[8] Protein kinase B (also known as Akt)/Tuberous Sclerosis Complex 2 (TSC2)/Mammalian target of rapamycin (mTOR)

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.1.104]

عضلانی و تغییرات مربوط به عوامل رشدی نظیر IGF-1 مستعدترند (۱۴،۱۵). لذا هدف پژوهش حاضر بررسی مقادیر پروتئین کلوتو و IGF-1 عضلات تند انقباض و کند انقباض رت های پیر پس از هشت هفته تمرین مقاومتی است.

روش تحقیق

پژوهش حاضر از نوع بنیادی و به روش تجربی بود. در این مطالعه ۱۶ سر رت نر نژاد ویستار با سن ۲۰ ماه و میانگین وزن۷۰±۳۰۰ گرم از انستیتو سرم رازی مشهد خریداری و به خانه حیوانات دانشکده علوم ورزشی دانشگاه فردوسی مشهد منتقل شدند (کد کمیته اخلاق دانشگاه فردوسی مشهد IR.UM.REC.1398.006). در هر شبانه روز آزمایشگاه ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای آزمایشگاه بین ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد و رطوبت آن بین ۴۷ تا ۵۳ درصد بود. تغذیه رت ها در مدت هفته اول تا یازدهم با غذای مخصوص جوندگان (تولید شرکت خوراک و دام به پرور) داده شد. آب نیز به وسیله بطری شیشه‌ای مخصوص همیشه در اختیار رت ها قرار داشت. رت ها پیش از تقسیم بندی وزن کشی شدند. سپس به روش تصادفی به دو گروه مساوی کنترل (۸ سر) و تمرین مقاومتی (۸ سر) تقسیم شدند.

قبل از اجرای پروتکل تمرینی، آشناسازی گروه تمرین مقاومتی در دو روز غیر متوالی با فاصله ۴۸ ساعت استراحت بین جلسات تمرینی انجام شد. تمرین شامل بالا رفتن از یک نردبان با شیب ۸۰ درجه و با بستن ابزار وزنه بدون گذاشتن هیچ گونه وزنه ای به دم رت بود. در این پژوهش از نردبانی به ابعاد ۱۸×۱۱۰ سانتی متر با دو سانتی متر فاصله بین پله ها و یک محفظه استراحت در قسمت بالای آن استفاده شد. این مرحله تا زمانی که رت ها توانستند ۳ بار متوالی بدون اعمال محرک به بالای نردبان صعود کنند، ادامه یافت. تمرین مقاومتی به مدت ۸ هفته و ۳ روز در هفته انجام شد. فعالیت بالا رفتن از نردبان با حمل وزنه‌ها بود که به صورت افزایشی معادل ۶۵، ۸۵، ۹۵ و ۱۰۰درصد حداکثر توانایی هر رت بود. هر جلسه تمرین شامل ۸-۵ تکرار صعود بود و فاصله استراحت بین هر صعود ۸-۶ ثانیه در نظر گرفته شد. در صورتی که هر رت در تکرارها به ۱۰۰ درصد حداکثر ظرفیت حمل خود می‌رسید؛ ۳۰ گرم وزنه جدید اضافه بار اعمال می‌شد. همانند بار اول این اضافه کردن وزنه تا جایی ادامه می‌یافت که رت توانایی بالا رفتن از نردبان را داشته باشد تا حداکثر توانایی جدید بدست آید. زمان هر صعود ۲ دقیقه بود. در صورتی که رت پس از سه تحریک متوالی قادر به بالا رفتن از نردبان نبود؛ تمرین متوقف می‌شد (جدول ۱) (۱۶). گروه کنترل در تمام طول پژوهش در همان محل نگهداری گروه تجربی قرار داشت و دقیقا با همان غذای گروه تجربی تغذیه می شد، اما هیچ برنامه تمرینی بر روی این گروه اجرا نشد.

۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین و پس از ۱۲ ساعت ناشتا با تزریق درون عضلانی ترکیبی از کتامین (۵۰-۳۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن) و زایلازین (۵-۳ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شدند. پس از تایید بیهوشی توسط عدم عقب کشیدن پا، برشی به طول ۵ تا ۶ سانتی‌متر، در ناحیه شکمی بدن رت ایجاد و به سرعت بافت عضلانی نعلی (به عنوان عضله کند انقباض) و تاکننده دراز انگشتان (به عنوان عضله تند انقباض) جدا و به داخل میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و در نیتروژن مایع قرار گرفت. بافت ها تا زمان سنجش در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد در فریزر آزمایشگاه نگهداری شدند. نمونه‌های بافتی پس از خارج شدن از فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد، به مقدار ۳۰ میلی‌گرم توسط تیغ جراحی برش زده شد و داخل میکروتیوب با حجم ۱/۵ میلی‌لیتر قرار گرفت و توسط ترازو وزن گردید. بافت مورد نظر در هاون همزمان با ریختن نیتروژن مایع روی آن کوبیده شد. سوسپانسیون بدست آمده از پودر بافت و ازت مایع را به یک تیوب از پیش سرد شده در ازت مایع انتقال داده و اجازه دادیم ازت تبخیر گردد. پیش از گرم شدن سوسپانسیون بافر لیزکننده اضافه شد و بلافاصله مرحله یکنواخت سازی و هموژنیزاسیون (هموژنایز ،دستگاه سانتریفیوژ مدلBRUSHLESS (D.C.MOTOR آغاز شد. سوسپانسیون سلولی و محلول حاصل از لیز بافت را با استفاده از سرنگ و نیدل یکنواخت نموده و با گذراندن Lysate بافتی از سرنگ دو

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.1.104]

میلی‌لیتری استریل با نیدل شماره ۲۳-۲۰ محلول Lysate هموژن شد.

جهت افزایش هموژنیسیته محلول Lysate و نیز برای تخریب DNA ژنومیک، حداقل ۱۰ بار با استفاده از سرنگ دو میلی‌لیتری استریل (Gauge no. 19) محتویات تیوب پر و خالی گردید. از محلول precipitation موجود در کیت، ۳۰۰ ماکرومول به تیوب اضافه و با استفاده از سمپلر به خوبی مخلوط شد. ۷۰۰ ماکرومول از محتویات تیوب که دارای رسوب بود به یک ستون استخراج RNA که درون تیوب دو میلی‌لیتری قرار داشت منتقل شد. در ستون به آرامی بسته شد و سانتریفیوژ گردید. ستون به آرامی از تیوب خارج شد بطوری که با flow-through تماس نداشته باشد و تیوب دو میلی‌لیتری دور انداخته شد و این عمل چندین بار تکرار شد. ۳۰ ماکرومول از محلول RNase free water که تاکنون در هیتر بلوک ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفته بود درست در مرکز غشاء درون ستون اضافه گردید. جهت افزایش غلظت RNA استخراجی در این مرحله در ستون را به آرامی بسته و به مدت سه دقیقه در حرارت اتاق و یا انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه نموده و به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ گردید.

پس از استخراج RNA برای سهولت در کاربرد فورم آمید در ژل native از(R0641)Dye RNA Loading ×2 و همچنین جهت تعیین اندازه و برآورد غلظت RNA بر روی ژل native و یا دناتوره از High Range RNA Ladder. SM1821/3 RiboRµler™ استفاده گردید. تمام نمونه ها با دستگاه nanodrop خوانش شد. پس از آن پرایمرها جهت مراحل انجام تست Real Time PCR آماده سازی شد بعد از بدست آوردن توالی نوکلئوتیدی ژن مورد نظر به منظور تعیین اختصاصی بودن پرایمرها، بررسی همولوژی توالی پرایمرها با توالی‌های ثبت شده ژنتیکی، از نرم‌افزار Primer blast وBeacon Designer سایت اینترنتی NCBI استفاده گردید. توالی پرایمر و پروپ برای واکنش RQ-PCR کلوتو از پژوهش Castaneda برداشته شد (۱۷) و سپس سنتز cDNA برای واکنش Reverse-transcriptase PCR توسط کیت سنتز cDNA (YT4500) :Cat No به روش سایبرگرین (YTA SYBR Green qPCR MasterMix 2X Cat No: (YT2551 صورت پذیرفت و توالی نوکلئیدی ژن های هدف با توالی نوکلوئیدی ژن رفرنس مقایسه شد. در پایان بیان ژن کلوتو و IGF-1 در بافت عضلانی با استفاده از روش Real Time PCR مطابق استانداردها اندازه‌گیری (دستگاه نانودراپ NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer V1.0) و خوانش شد.

برای بررسی طبیعی بودن توزیع داده ها از آزمون شاپیرو ویلک اکتشافی استفاده شد. به سبب نرمال نبودن داده ها از آزمون یوی من ویتنی برای مقایسه دو به دو گروه ها استفاده شد. تمام عملیات آماری توسط نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۲۳ انجام شد. ضابطه تصمیم گیری آماری برای آزمون فرضیه‌ها P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تعداد ۱۶ نمونه و در هر گروه ۸ نمونه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای تعیین تاثیر هشت هفته تمرین مقاومتی بر بیان ژن کلوتو عضله تند انقباض (عضله تا کننده دراز انگشتان) و عضله کند انقباض (عضله نعلی) رت‌های پیر نژاد ویستار از آزمون آماری یوی من ویتنی استفاده شد. جدول ۲ نتایج آزمون یوی من ویتنی، مقایسه میانگین رتبه بیان ژن کلوتو عضله تندانقباض و کندانقباض رت‌های پیر نژاد ویستار را در دو گروه تمرین مقاومتی و کنترل نشان می‌دهد. براساس نتایج جدول ۲ مشاهده شد، بیان نسبی ژن کلوتو عضله نعلی رت‌های پیر نژاد ویستار در گروه کنترل و تمرین مقاومتی معنادار نیست. در عضله تندانقباض نیز نتایج معنی داری مشاهده نشده است (P>۰/۰۵).

جدول ۳ نتایج آزمون یوی من ویتنی، مقایسه میانگین رتبه بیان ژن IGF-1 عضله تند انقباض (عضله تا کننده دراز انگشتان) و عضله کند انقباض (عضله نعلی) رت‌های پیر نژاد ویستار را در دو گروه تمرین مقاومتی و کنترل نشان می‌دهد. بیان نسبی ژن IGF-1 عضله تا کننده دراز انگشتان رت‌های پیر نژاد ویستار در گروه کنترل و تمرین مقاومتی معنادار نبود (P=۰/۰۸۹؛ Z= -۱/۶۹).

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.1.104]

عضله کندانقباض نیز تغییرات معنی داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

جدول ۴ نتایج آزمون یوی من ویتنی، مقایسه میانگین رتبه بیان ژن کلوتو و IGF-1 عضله تند و کند انقباض رت های پیر نژاد ویستار را در گروه تمرین مقاومتی نشان می‌دهد. میانگین رتبه بیان نسبی ژن IGF-1 عضله تند و کند انقباض رت های پیر نژاد ویستار در گروه تمرین مقاومتی به ترتیب ۷/۶۲ و ۹/۳۸ بود که این تفاوت معنادار نیست (P=۰/۴۶؛ Z= -۰/۷۳). همچنین بین بیان نسبی ژن کلوتو عضله تند و کند انقباض رت های پیر نژاد ویستار در گروه تمرین مقاومتی تفاوت معنی داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

در نمودار های ۱ و ۲ مقایسه میانگین رتبه بیان ژن IGF-1 و بیان پروتئین کلوتو عضله تند و کند انقباض در گروه تمرین مقاومتی و کنترل نمایش داده شده است.

جدول ۱- خریداری، آشنا سازی، مداخله تمرینی و زمان نمونه برداری از رت‌ها

هفته		اقدام
۱		خریداری رت‌ها، آشنایی با محیط زندگی و استفاده از رژیم غذایی استاندارد
۲		آشنایی با محیط تمرین،تعیین حداکثر ظرفیت حمل و مداخله تمرین
۳	تمرین مقاومتی	۴ تکرار اول به ترتیب ۶۵، ۸۵، ۹۵ و ۱۰۰ درصد حداکثر توان بیشینه و سه تکرار بعدی به ازای هر تلاش موفق ۳۰ گرم به وزنه اضافه می‌شود.
۴-۱۰	تمرین مقاومتی	۴ تکرار اول به ترتیب ۶۵، ۸۵، ۹۵ و ۱۰۰ درصد حداکثر توان بیشینه بدست آمده از آخرین تکرار جلسه قبل و سه تکرار بعدی به ازای هر تلاش موفق ۳۰ گرم به وزنه اضافه می‌شود.
۱۱		نمونه برداری

جدول ۲- نتایج آزمون یوی من ویتنی مقایسه میانگین رتبه بیان ژن کلوتو عضله تند انقباض و کندانقباض در دو گروه کنترل و تمرین مقاومتی

متغیر	عضلات	گروه‌ها	میانگین ±انحراف معیار	آماره Z	سطح معناداری
کلوتو	تند انقباض	کنترل	۱/۱۸±۰/۵۳	-۱/۹۱	۰/۰۵۶
		تمرین مقاومتی	۰/۴۸±۰/۴۶		
	کندانقباض	کنترل	۱/۲۸±۰/۸۱	-۱/۹۲	۰/۰۵۶
		تمرین مقاومتی	۰/۶۸±۰/۹۶		

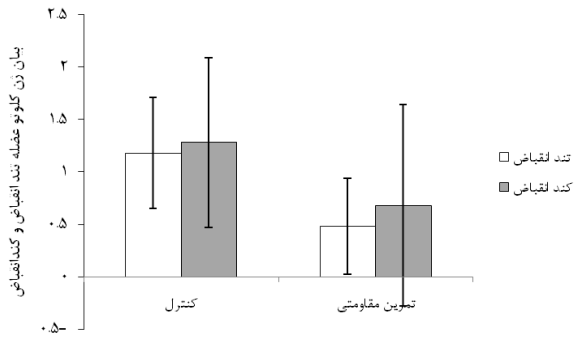
جدول ۳- نتایج آزمون یوی من ویتنی مقایسه میانگین رتبه بیان ژن IGF-1 عضله تند انقباض و کندانقباض در دو گروه کنترل و تمرین مقاومتی

متغیر	عضلات	گروه ها	میانگین ±انحراف معیار	آماره Z	سطح معناداری
IGF-1	تند انقباض	کنترل	۰/۹۱±۰/۲۲	-۱/۶۹	۰/۰۸۹
		تمرین مقاومتی	۰/۵۲±۰/۷۵		
	کند انقباض	کنترل	۱/۱۰±۰/۳۲	-۱/۶۹	۰/۰۹
		تمرین مقاومتی	۰/۵۵±۰/۹۷		

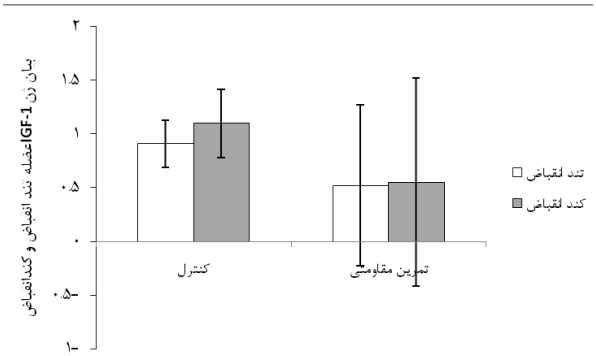
[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.1.104]

جدول ۴- نتایج آزمون یوی من ویتنی مقایسه میانگین رتبه بیان ژن کلوتو و IGF-1 بین عضله تند و کند انقباض در گروه تمرین مقاومتی

گروه	متغیر	عضلات	میانگین رتبه بیان ژن (بیان نسبی)	آماره Z	سطح معناداری
تمرین مقاومتی	کلوتو	عضله تند انقباض	۹	-۰/۴۷	۰/۶۳
		عضله کند انقباض	۸		
	IGF-1	عضله تند انقباض	۷/۶۲	-۰/۷۳	۰/۴۶
		عضله کند انقباض	۹/۳۸		



نمودار ۱- مقایسه میانگین رتبه بیان نسبی ژن کلوتو عضله تند و کند انقباض در گروه تمرین مقاومتی



نمودار ۲- مقایسه میانگین رتبه بیان ژن IGF-1 عضله تند و کند انقباض در گروه تمرین مقاومتی

بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که مقادیر کلوتو در عضله نعلی (به عنوان عضله کند انقباض) و تاکننده دراز انگشتان (به عنوان عضله تندانقباض) در گروه تمرین مقاومتی، تغییرات معنی دار نداشته است. همچنین تغییرات معناداری در IGF-1 در رت های تمرین کرده در مقایسه با گروه کنترل در عضلات کند انقباض و تند انقباض مشاهده نشد. نتایج پژوهش حاضر با پژوهش Saghiv و همکاران (۲۰۱۷) که به بررسی اثرات تمرین مقاومتی طولانی مدت بر گردش کلوتو محلول و IGF-1 خون بزرگسالان جوان پرداختند همخوانی دارد. در پژوهش ساغوی که روی مدل انسانی انجام شد؛ نتایج نشان داد اختلاف معناداری بین سطوح کلوتو وزنه برداران و افراد غیر آموزش‌دیده مشاهده نشد. با این حال سطح IGF-1 در وزنه برداران به طور معناداری بالاتر از افراد غیر آموزش دیده بود. به نظر می رسد که تمرین مقاومتی طولانی مدت بر روی سطوح گردش خون کلوتو محلول تاثیر نمی گذارد (۱۸). یکی از سازوکارهای احتمالی تنظیم مثبت بیان ژن کلوتو بر اثر فعالیت ورزشی، تنظیم کاهشی (منفی) بیان فاکتور نکروز دهنده ی تومور آلفا (TNF-α)[1] از طریق سازوکارهای وابسته به فاکتور هسته‌ای تقویت‌کننده زنجیره سبک کاپا از لنفوسیت‌هایِ B فعال‌شده (NFκB)[2] است. حال آنکه در برخی تحقیقات عدم تغییر معنی دار شاخص TNF-α به دنبال تمرینات مقاومتی نشان داده شده است (۱۹). فشار اکسایشی نیز مقادیر بیان ژن پروتئین را کاهش می‌دهد که در تحقیق حاضر احتمالا یکی از دلایل کاهش مقادیر کلوتو را می توان به عدم تعادل آنتی اکسیدانی آزمودنی ها نسبت داد (۲۰). این موضوع می تواند دلیلی بر این باشد که شاید تمرینات مقاومتی در تحقیق حاضر به دلیل فشار بالای تمرین و ایجاد آسیب و پس از آن ترمیم بافت تحت فشار، مقادیر کلوتو را کاهش داده است (۲۱). علاوه بر این ها نشان داده شده است که پروتئین ترشحی کلوتو به طور مستقیم مانع فعالیت عامل پیش فیبروزی TGF-β1[3] می

[1] Tumor necrosis factor-α (TNF-α)
[2] Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB)
[3] Transforming growth factor beta 1 (TGF-β1)

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.1.104]

گردد. TGF-β1 نه تنها تنظیم کننده فیبروز بافتی است، بلکه به نظر می‌رسد مانع فعالیت سلول‌های ماهواره‌ای و تمایز سلول‌های میوبلاست باشد. شواهد بیانگر آن است که عضلات مسن حاوی مقادیر بالاتر TGF-β1 بوده و ممانعت از پیام‌رسانی TGF-β1 بازسازی عضلات را افزایش می‌دهد. شکل ترشحی کلوتو مستقیما با گیرنده‌های نوع TGF-β1II وارد واکنش شده و باعث کاهش میل ترکیبی لیگاند درون‌زای TGF-β1 می‌گردد. بیشتر پژوهش‌ها بیانگر آن است که تمرینات مقاومتی منجر به افزایش TGF-β1 می‌گردد (۲۲). لذا افزایش همزمان TGF-β1 و پروتئین کلوتو به دنبال تمرینات مقاومتی از سویی و اثر بازدارنده کلوتو بر پیام‌رسانی TGF-β1 از سویی دیگر با یکدیگر متناقض بوده و لذا نیازمند بررسی بیشتر اثر این دو بر یکدیگر می‌باشد (۲۳). یکی از چالش های موجود در زمینه فعالیت ورزشی و سطح کلوتو، پاسخ یا سازگاری آن به نوع تمرینات ورزشی است. در یکی از مطالعات طراحی شده، ارتباط بین کلوتو سرمی و تمرینات ورزشی بی هوازی بررسی شد. در این مطالعه مشخص شد که سطح سرمی کلوتو در دوندگان سرعت بی هوازی در مقایسه با همتایان هوازی آن ها پایین تر بود. در واقع حتی مقدار آن مشابه با افراد همتای کم تحرک بود (۲۴). در نتیجه می توان گفت که کلوتو به نوع تمرینات حساس است و تمرینات دویدن سرعت بی هوازی روی افزایش مقدار آن تاثیری نداشته است، مشابه با نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر که نشان داد تمرینات مقاومتی تاثیری روی مقادیر کلوتو نداشته است. حال آنکه در تمرین فاطمی و همکاران (۱۳۹۷) مشاهده شد که تمرینات هوازی شنا منجر به افزایش سطوح کلوتو شده است (۲۵)؛ معین و همکاران (۱۳۹۶) نیز در تحقیق خود به بررسی تاثیر هشت هفته تمرینات هوازی روی تردمیل بر پروتئین کلوتو موش های صحرایی نر پرداختند و اظهار داشتند که تمرین هوازی می تواند موجب افزایش پروتئین کلوتو گردد و احتمالا با کاهش شاخص التهابی IL-6 و TNF-α ارتباط دارد که بیانگر سازگاری مثبت نسبت به بروز التهاب در ورزشکاران رشته های استقامتی و هوازی می باشد (۱۲). این یافته ها می تواند تایید کننده نتایج مطالعات پیشین باشدکه تاثیر مثبت تمرینات ورزشی هوازی روی سطح سرمی کلوتو را خاطر نشان کردند.

هم چنین، پروتئین کلوتو ممکن است به کمک واسطه‌های عوامل رشدی مانند IGF-1 ایجاد گردد، حال آنکه در تحقیق حاضر مقادیر IGF-1 تغییر معنی داری نداشته است. کاهش سطح IGF-1 در عضلات در حال کار ممکن است به علت کاهش چشمگیر توانایی عضله در سنتز پروتئین منجر به دیستروفی عضلات باشد.IGF-1 با مهار تخریب پروتئین اثرات آنابولیک بر محتوای پروتئین ماهیچه‌ها دارد. در نتیجه توانایی عملکردی IGF-1 در عضلات در حال کار محدود است. در پاسخ به تمرین مقاومتی در برابر انعطاف پذیری بالای سلول‌های ماهواره‌ای، نشان می‌دهد که تغییر در اندازه فیبرهای عضلانی اسکلتی می‌تواند بدون افزودن هسته های فیبر عضله جدید حاصل شود (۲۶). به علاوه، پاسخ هورمون رشد وIGF-1 به نحوه تغییر غلظت گلوکز، انسولین و اسیدهای چرب آزاد و پروتئین های پیوندی حین و پس از انجام فعالیت ورزشی بستگی دارد. غلظت این سوبستراها بر ترشح هورمون رشد و IGF-1 اثر گذاشته و یک تنظیم بازخوردی ایجاد می کنند (۲۷). Scudese و همکاران ۲۰۱۶ اظهار داشتند که تمرین مقاومتی با شرایط مناسب در شدت (۸۰ درصد یک تکرار بیشینه) و مدت (یک جلسهِ ی سی دقیقه ای) بر ترشح IGF-1 تاثیر داشته و این افزایش احتمالا از طریق تسهیل ورود گلوکز به درون عضله اسکلتی بدون وابستگی به انسولین، میانجی گری می شود (۲۸). همچنین Razi و همکاران (۲۰۱۵) در تحقیق خود اظهار داشتند که برخی از تغییرات مرتبط با سن در سیگنال های مکانیکی، هورمون ها، عوامل رشد و سیتوکین ها، موجب کاهش پاسخ فیزیولوژیکی سالمندان به بار مکانیکی می شوند (۲۹). تناقض گزارشات موجود می تواند ریشه در تفاوت گروه های مورد مطالعه، روش های ارزیابی و اندازه گیری شده، شدت، مدت تمرین، نوع برنامه های تمرینی، زمان خونگیری و فاصله ی استراحت بین دو تمرین داشته باشد. محققین نیز در این رابطه اظهار داشته اند که تمرینات مقاومتی می بایست به صورت جلسه های پیاپی و در بلند مدت اجرا شود تا از طریق تنظیم افزایش برخی سایتوکاین ها نقش ضدالتهابی داشته باشد و باعث کاهش عامل TNF-α و افزایش سنتز پروتئین کلوتو شود چرا که سطح

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.1.104]

بالای TNF-α با کاهش سنتز پروتئین کلوتو در ارتباط است (۳۰).

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که هشت هفته تمرین مقاومتی نمی‌تواند تغییری بر پروتئین کلوتو عضله اسکلتی تند انقباض ایجاد کند، از سوی دیگر نمی‌تواند موجب افزایش کلوتو در بافت عضله اسکلتی کند انقباض و هم چنین افزایش IGF-1 بافت عضله تند انقباض و کند انقباض گردد. بنابراین احتمالا می‌توان گفت تمرین مقاومتی در کوتاه مدت نمی‌تواند باعث افزایش پروتئین کلوتو گردد.

پیشنهاد می شود تحقیقات بعدی به مقایسه تأثیر تمرینات مقاومتی و استقامتی با مدت زمان طولانی تر و با شدت های متفاوت و هم چنین تمرین های ترکیبی بر شاخص های کلوتو و IGF-1 بپردازند. هم چنین می توان اظهار داشت که اجرای تمرینات مقاومتی می بایست همراه با تغذیه مناسب و دوره های ریکاوری کافی همراه باشد که منجر به تعادل آنتی اکسیدانی و بهبود شاخص های التهابی شود و در نهایت احتمالا به افزایش شاخص های کلوتو و IGF-1 منجر شود.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد، رشته فیزیولوژی ورزش با کد طرح ۴۷۹۳۰ دانشگاه فردوسی مشهد می‌باشد. نویسندگان از تمامی عوامل اجرایی دانشگاه، مرکز تحقیق، عوامل نگهداری و تکنسین آزمایشگاه که در این پژوهش همکاری صمیمانه داشتند، کمال تشکر را دارند.

تضاد منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

منابع:

1- Negaresh R, Ranjbar R, Gharibvand M, Habibi A, Moktarzade M. Effect of 8-week resistance training on hypertrophy, strength, and myostatin concentration in old and young men. Salmand: Iran J Ageing. 2017; 12(1): 56-67. [Persian] DOI: 10.21859/sija-120154.

2- Mahmodi M. Population aging: a socio-demographic phenomenon. Women's Strategic Studies. 2016; 19(73): 178-83. [Persian] DOI: 10.22095/jwss.2016.44406.

3- Maltese G, Karalliedde J. The putative role of the antiageing protein klotho in cardiovascular and renal disease. Int J Hypertens 2012; 757469. DOI: 10.1155/2012/757469.

4- Semba RD, Cappola AR, Sun K, Bandinelli S, Dalal M, Crasto C, et al. Relationship of low plasma klotho with poor grip strength in older community-dwelling adults: the InCHIANTI study. Eur J Appl Physiol. 2012; 112(4): 1215-20. DOI: 10.1007/s00421-011-2072-3.

5- Kuro-o M. Klotho and the aging process. Korean J Intern Med. 2011; 26(2): 113-22. DOI: 10.3904/kjim.2011.26.2.113

6- Benoit B, Meugnier E, Castelli M, Chanon S, Vieille-Marchiset A, Durand C, et al. Fibroblast growth factor 19 regulates skeletal muscle mass and ameliorates muscle wasting in mice. Nat Med. 2017; 23(8): 990-96. DOI: 10.1038/nm.4363.

7– Jebreil Azimzadeh M, Shidfar F, Jazayeri S, Agha Hosseini F. The effect of vitamin D supplementation on plasma levels of anti-aging protein in elderly. Razi j Med Sci. 2018; 25(9): 84-93. [Persian] Link

8- Semba RD, Cappola AR, Sun K, Bandinelli S, Dalal M, Crasto C, et al. Plasma klotho and mortality risk in older community-dwelling adults. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2011; 66: 794-800. DOI: 10.1093/gerona/glr058.

9- Puche JE, Castilla-Cortázar I. Human conditions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) deficiency. J Transl Med 2012; 10: 224. DOI: 10.1186/1479-5876-10-224.

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.1.104]

10- Armakolas N, Armakolas A, Antonopoulos A, Dimakakos A, Stathaki M, Koutsilieris M. The role of the IGF-I Ec in myoskeletal system and osteosarcoma pathophysiology. Crit Rev Oncol Hematol. 2016; 108: 137-45. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2016.11.004

11- Negaresh R, Ranjbar R, Habibi A, Gharibvand MM. The effects of eight weeks of resistance training on some muscle hypertrophy and physiological parameters in elderly men. J Gerontol Nurs. 2016; 3 (1): 62-75. [Persian] DOI: 10.21859/jgn.3.1.62.

12- Moein A, Nikbakht H, Ghazalian F. The effect of aerobic training on Klotho protein and a selected of inflammatory indices in kidney of Male Rats. Res Med. 2017; 41(3): 175-82. [Persian] Link

13- Nasrollahi H, Gaeini AA, Biglari S, Ghardashi Afousi A. Changes of insulin-like growth factor I gene expression in gastrocnemius muscle of male wistar rats after a period of high-intensity interval training. Daneshvar Med. 2018; 132: 31-39. [Persian] Link

14- Ghadimi Ilkhanlar H, Nourshahi M, Gharakhanloo R, Khodaghli F. Effect of 8 weeks of resistance training on neurotropin levels in fast-twitch and slow-twitch muscles of elderly rats. J Appl Execr Physiol (JAEP).2014; 10(20): 129-38. [Persian] DOI: 10.22080/ JAEP.2015.925.

15- Roostaei M, Gaeini AA, Kordi M. The difference of myostatin gene expression in fast and slow twitch healthy male rat after eight weeks of high intensity interval training. Physiol Execr Phys Act. 2016; 9(1): 1301-06. [Persian] Link

16- Marqueti RC, Durigan JL, Oliveira AJ, Mekaro MS, Guzzoni V, Aro AA, et al. Effects of aging and resistance training in rat tendon remodeling. FASEB J. 2017; 32(1): 353-68. DOI: 10.1096/fj.201700543r

17- Muñoz-Castañeda JR, Herencia C, Pendón-Ruiz de Mier MV, Rodriguez-Ortiz ME, Diaz-Tocados JM, Vergara N, et al. Differential regulation of renal Klotho and FGFR1 in normal and uremic rats. FASEB J. 2017; 31(9): 3858-67. DOI: 10.1096/fj.201700006R.

18- Saghiv M, Sherve C, Ben Sira D, Sagiv M, Goldhammer E. Aerobic training effect on blood s-Klotho levels in coronary artery disease patients. J Clin Exp Cardiol. 2016; 7(8): 464. DOI: 10.4172/2155-9880.1000464.

19- Dolgari R, Amirsasan R, Vakili J. Effects of Pilates training with and without turmeric supplementation on serum Klotho and quality of life in post-menopausal overweight women: A randomized clinical trial. Daneshvar Med. 2019; 27(3): 1-8. [Persian] DOI: 10.22070/DMED.27.142.1

20- Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. Endocr Rev. 1997; 18(1): 4-25. DOI: 10.1210/edrv.18.1.0287.

21- Nourshahi M, Farahmand F, Soleimani M, Rajabi H, Power K. The effect of high intensity interval training preconditioning on Klotho and TNF-α female mice with multiple sclerosis. J Appl Exerc Physiol (JAEP). 2019; 15(30): 15-30. [Persian] DOI: 10.22080/JAEP.2020.17766.1921.

22- Czarkowska B, Zendzian M, Bartlomiejczyk I, Przybylski J, Gorski J. The effect of acute and prolonged endurance exercise on transforming growth factor-beta1 generation in rat skeletal and heart muscle. J physiol pharmacol. 2009; 60(4): 157-62. PMID: 20065510 Link

23- Kuro-o M, Phosphate and klotho. Kidney Int. 2011; 79: S20-S23. DOI: 10.1038/ki.2011.26.

24- Devaraj S, Syed B, Chien A, Jialal I. Validation of an immunoassay for soluble Klotho protein: decreased levels in diabetes and increased levels in chronic kidney disease. Am J Clin Pathol. 2012; 137(3): 479-85. DOI: 10.1309/AJCPGPMAF7SFRBO4.

25- Fatemi S, FallahMohammadi Z. The effect of vitamin D supplementation on the levels of Klotho in the brain tissue of female lewis rats after 6 weeks of swimming. J Sports Sci. 2018; 10(2), 207-19. [Persian]. DOI: 10.22059/JSB.2018.230041.1159

26- Schiaffino S, Mammucari C. Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. Skelet Muscle. 2011; 1(1): 4. DOI: 10.1186/2044-5040-1-4.

27- Amirsasan R, Sari-Saraf V, Pourgholi T, Armanfar M. Comparing the effects of combined endurance-resistance training versus resistance-endurance on growth hormone and insulin-like growth factor-I in non-athlete prepubertal girls. Feyz. 2015; 19(3): 214-22. [Persian] Link

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.1.104]

28- Scudese E, Simão R, Senna G; Vingren JL, Willardson JM, Baffi M, et al. Long rest interval promotes durable testosterone responses in high-intensity bench press. J Strength Cond Res. 2015; 1275–86. DOI: 10.1519/JSC.0000000000001237.

29- Razi H, Birkhold AI, Weinkamer R, Duda GN, Willie BM, Checa S. Aging leads to a dysregulation in mechanically driven bone formation and resorption. J Bone Miner Res 2015; 30(10): 1864-73. DOI: https://doi.org/10.1002/jbmr.2528.

30- Fatemi S, FalahMohammadi Z, Hoseini H, Talebi V. The preventive effect of one course of resistance training with injections of vitamin D3 on the levels of klotho in the brain tissue of female rats with experimental autoimmune encephalomyelitis.Armaghane-danesh. 2018; 23(4): 401-12. [Persian] Link

[DOI: 10.32592/JBirjandUnivMedSci.2021.28.1.104]