

## تأثیر چهار هفته تمرین HIIT بر بیان ژن Tweak و Fn14 عضله EDL موش‌های پیر و بالغ

عبدالرضا کاظمی<sup>۱\*</sup>، علیرضا حق‌پناه<sup>۲</sup>، امیربهادر دخیلی<sup>۳</sup>

۱. دانشیار، فیزیولوژی ورزشی، گروه علوم ورزشی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه ولی‌عصر (عج)، رفسنجان

۲. کارشناس ارشد، فیزیولوژی ورزشی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان

۳. دکتری، فیزیولوژی ورزشی، گروه علوم ورزشی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه ولی‌عصر (عج)، رفسنجان

شماره صفحات: ۱ تا ۱۱

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۱۰/۲۵

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۵/۹

## چکیده

آتروفی عضلانی از پیامدهای سالمندی است و فعالیت ورزشی ممکن است از آن جلوگیری کند. هدف پژوهش حاضر بررسی اثر تمرین تناوبی شدید بر بیان ژن‌های Tweak و Fn14 عضله EDL موش‌های پیرنژاد C57bl/6 است. به این منظور، ۲۸ سر موش C57bl/6 پیر (n=۱۴) تا ۲۴ تا ۲۶ ماه و بالغ (n=۱۴) چهار تا شش ماه در دو گروه تمرین (n=۷) و کنترل (n=۷) قرار گرفت. گروه‌های تمرین پس از یک هفته آشناسازی، در برنامه چهار هفته‌ای تمرین تناوبی شدید روی تردمیل با شدت ۸۵ درصد سرعت بیشینه در هفته اول تا ۹۵ درصد سرعت بیشینه در هفته آخر، در تناوب‌های دو دقیقه‌ای (شش وهله در هفته اول تا ده وهله در هفته آخر) یا یک دقیقه استراحت غیرفعال، مشارکت داده شدند. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، عضله EDL استخراج شد و میزان بیان ژن‌های Tweak و Fn14 اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که پیری اثر معنی‌داری بر وزن عضله EDL دارد (P=۰/۰۳۲)؛ همچنین، پیری موجب افزایش معنی‌دار بیان Tweak و Fn14 شده است (به ترتیب P=۰/۰۰۱ و P=۰/۰۰۲)؛ تمرین ورزشی بیان این ژن‌ها را در عضله EDL هر دو نوع موش بالغ و پیر کاهش داد (P=۰/۰۰۱)؛ از سوی دیگر، با اینکه تمرین ورزشی وزن عضله را مقداری افزایش داد اما این مقدار به لحاظ آماری در هر دو گروه بالغ (P=۰/۱۱۷) و پیر (P=۰/۳۲۱) معنی‌دار نبود؛ بنابراین، افزایش سن با افزایش بیان ژن‌های Tweak و Fn14 همراه است که ممکن است به تغییرات توده عضلانی همراه با افزایش سن مربوط باشد و با توجه به کاهش بیان این ژن‌ها بر اثر تمرینات شدید، این تمرینات ممکن است در دوران سالمندی به منظور حفظ توده عضلانی مؤثر باشد.

کلیدواژه‌ها: تمرین تناوبی شدید، سارکوپنیا، Tweak، گیرنده Fn14

## The effect of high-intensity exercise training on gene expression of tweak and Fn14 in EDL muscle of aged and adult mice

Kazemi, A.R., Haghpanah, A.R., Dakhili, A.B.

1. Assistant Professor, Sport Physiology, Department of Sport Sciences, Faculty of Literatures and Humanities, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Iran
2. Master of Science, Sport Physiology, Faculty of Literatures and Humanities, Islamic Azad University Kerman Branch, Iran
3. PhD, Sport Physiology, Department of Sport Sciences, Faculty of Literatures and Humanities, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Iran

## Abstract

Muscle atrophy is one of the consequences of aging and sports activities may prevent it. The aim of this study was to evaluate the effect of high intensity interval training on gene expression of Tweak and Fn14 in EDL muscle of aged C57bl/6 mice. For this purpose, 28 male C57bl/6 mice aged (n=14) and adult (n=14) were assigned in two groups of training (n=7) and control (n=7). After one-week familiarization, training groups participate in 4 weeks high intensity training program on treadmill, with an intensity of 85% of the maximum speed in the first week up to 95% of the maximum speed in the last week, in 2-minute intervals (6 in the first week to 10 in the last week) with 1 minute rest between intervals. 48 hours after the last training session, the mice were sacrificed. Then gene expressions of Tweak and Fn14 in EDL muscle were measured. The findings show that aging has significant effect on EDL muscle weight (P=0.032). Also the results showed that with increasing age Tweak and Fn14 mRNA expression increased in the EDL muscle (P=0.001 and P=0.002 respectively). On the other hand, training can reduce Tweak and Fn14 gene expression in both old and adult groups (P=0.001). On the other hand, although training slightly increased EDL muscle weight in both adult (P=0.117) and old (P=0.321) groups, this value statistically was not significant. Thus, aging is associated with an increase in Tweak and Fn14 mRNA expression, which could possibly be involved in muscle weight changes associated with aging. Since that high intensity interval training decrease these mRNA expression, can might be utilized HIIT for maintenance aging and adult of muscle mass.

**Keywords:** High Intensity Interval Training, Sarcopenia, Tweak and Fn14.

\*a.kazemi@vru.ac.ir

## مقدمه

آتروفی عضلات اسکلتی یکی از پیامدهای موقعیت‌هایی نظیر پیری، از دست دادن عصب‌ها، بی‌حرکی، بیماری‌های مزمن و درمان‌های گلوکوکورتیکوئیدی با مقادیر زیاد است (۱). کاهش توده عضلانی یا آتروفی زمانی اتفاق می‌افتد که تخریب پروتئین بیش از سنتز آن باشد (۲،۳). در هر دو وضعیت پاتولوژیکی و فیزیولوژیکی، ضعف و آتروفی عضلانی ممکن است به کیفیت پایین زندگی، ناتوانی در انجام کارهای روزانه، خستگی و بیماری‌های ثانویه مانند پوکی استخوان و دیابت منجر شود. کاهش سطح مقطع تارهای عضلانی و در پی آن، اختلال در قدرت، مشخصه اصلی آتروفی عضلانی است (۳). در پژوهشی، کاهش ۲۵ تا ۴۰ درصد در سطح مقطع عرضی<sup>۱</sup> عضلات ران انسان از بلوغ تا سالمندی گزارش شده است (۴)؛ نیز، نشان داده شده است که اندازه تار عضلانی در افراد پیر در مقایسه با جوانان کاهش چشم‌گیری دارد (۵). به کاهش توده و قدرت عضلانی همراه با پیری سارکوپنیا<sup>۲</sup> گفته می‌شود. امکان حفظ سبک زندگی فعال، سالم و مستقل در میان افراد مسن، در صورت بروز آتروفی پیشرونده توده عضلات اسکلتی محدود می‌شود که با کاهش عملکرد همراه خواهد بود (۶). این ضعف عضلانی ممکن است باعث سقوط و افتادن سالمندان شود و نهایتاً به آسیب‌های شدید بینجامد؛ بنابراین، کاهش عملکرد عضلانی، یکی از مهم‌ترین عوامل درگیر در کاهش تحرک و عدم وابستگی در سالمندان است که به کاهش کیفیت زندگی منجر خواهد شد (۷). اگر چه پیشرفت‌های فراوانی برای شناخت سازوکارهای درون‌سلولی ضعف و آتروفی عضلانی و عوامل بالادست در راه‌اندازی برنامه آتروفی عضلانی افراد پیر رخ داده است، این سازوکارها هنوز کاملاً شناخته نشده‌اند؛ به تازگی، سایتوکاین Tweak و گیرنده آن Fn14<sup>۳</sup> به منزله یکی از تنظیم‌کننده‌های اصلی توده عضلات اسکلتی شناخته است (۸). Tweak یک پروتئین چندعملکردی و عضوی از خانواده سایتوکاین‌های TNF است. Tweak به گیرنده Fn14 که پروتئین تراغشایی نوع I و عضوی از خانواده گیرنده TNF است، متصل می‌شود (۹).

مشخص شده است که محور Tweak /Fn14 پا سخ‌های فیزیولوژیکی گوناگونی را شامل بقای سلول، تکثیر، تمایز، رگ‌زایی، مهاجرت و آپوپتوز تنظیم می‌کند (۹). مطالعات اولیه نشان می‌دهد که Tweak تأثیرات مهمی بر سلول‌های عضلانی کشت شده دارد. Tweak موجب تکثیر مایوبلاست‌ها و مهار تمایز آنها به مایوتیوب‌ها در محیط کشت می‌شود؛ علاوه بر این، Tweak مسیرهای سیگنالینگ NF- $\kappa$ B و MAPK و سطوح MyoD را در مایوبلاست‌های کشت شده کاهش می‌دهد (۱۰). مشاهده شده است که بیان دو لیگاز یوبی‌کوئیتین E3 ویژه عضله شامل MuRF1 و آتروزین ۱ در موقعیت‌های مختلف آتروفی عضلانی افزایش می‌یابد. در همین زمینه، پژوهشی نشان داده است که MuRF1 واسطه تجزیه MHC در وضعیت آتروفی است (۱۱). از این رو، افزایش بیان MuRF1 و فعال شدن مسیر یوبی‌کوئیتین پروتئازوم یکی از سازوکارهای

1. Cross Sectional Area  
2. Sarcopenia

3. Fibroblast Growth Factor-  
Inducible 14

مهمی است که از طریق آن، Tweak سبب آتروفی عضلانی می‌شود. Tweak باعث بیان MuRF1 و تحریک کونژوگه شدن یوبی‌کوئیتین با MHC در میوتیوب‌های C2C12 می‌شود (۱۰). علاوه بر این، روشن شده است که سرکوب ژن MuRF1 یا درمان با مهارکننده پروتئازوم، قطر میوتیوب‌ها و سطوح MHC را در میوتیوب‌های کشت شده با Tweak بهبود می‌دهد (۱۲). این مورد اخیر به صراحت نقش محوری Fn14 / Tweak را در آتروفی به واسطه القای پروتئازوم‌های عضلانی نشان می‌دهد. علاوه بر این، گزارش شده است که Tweak سبب فعال شدن NF-κB می‌شود. NF-κB از طریق افزایش بیان سایتوکاین‌های پیش‌التهابی، کموکاین‌ها و اجزای یوبی‌کوئیتین پروتئازوم شامل MuRF1 در آتروفی عضلانی نقش دارد (۱۳). همچنین، نقش Tweak / Fn14 در آتروفی فیزیولوژیک مشخص شده است، به طوری که سطوح پروتئین و رونویسی Fn14 در عضلات اسکلتی موش‌ها در وضعیت از دست دادن عصب و بی‌حرکی القا می‌شود (۱۴).

تغییرات مرتبط با سن در عضله اسکلتی، با کاهش سطح فعالیت و نیز به علت تغییرات متابولیسمی و استرس اکسیداتیو، که به افزایش آسیب‌های رادیکال آزاد در داخل سلول می‌انجامد، به طور معمول تشدید می‌شود (۱۵). از سوی دیگر، شواهد مهمی وجود دارد که نشان می‌دهد، سنتز پروتئین عضله در پاسخ به فعالیت بدنی در افراد جوان و مسن افزایش می‌یابد (۱۶). در همین زمینه، پژوهشی نشان داد که افراد مسن و جوان هر دو افزایش در خور توجهی در MyoD و فاکتور تنظیم‌کننده عضله‌زایی ۴ و کاهش در بیان ژن مایواستاتین پس از فعالیت ورزشی نشان داده‌اند (۱۷). تعدیل مسیرهای وابسته به کلسیم نیز پس از فعالیت‌های ورزشی گزارش شده است (۱۸). علاوه بر این، فعالیت ورزشی ممکن است بیان ژن و پروتئین لیگازهای MuRF1 را در موش‌های پیر کاهش دهد (۱۹). فعالیت بدنی اثر پیری را با افزایش تعداد سلول‌های ماهواره‌ای در تارچه‌های موش‌های پیر و جوان بهبود می‌بخشد (۲۰) و با ایجاد سازگاری‌های فیزیولوژیکی مختلف، عملکرد ورزشی و عضلانی را از قبیل توانایی در حفظ بار کار زیربیشینه برای یک دوره طولانی‌تر، و دست‌یابی به برون‌ده توانی بیشتر در یک مسافت یا زمان ثابت بهبود می‌بخشد (۲۱). فعالیت بدنی به منزله مداخله‌ای مؤثر در کاهش از دست رفتن توده و عملکرد عضلانی نیز شناخته شده است (۲۲) که می‌تواند تغییرات مشخصی را در ویژگی‌های انقباضی تارهای عضلانی به سمت تارهای قوی‌تر ایجاد کند (۲۳). بنابراین، با توجه به اثر مثبت فعالیت ورزشی بر بهبود توده عضلانی و افزایش عملکرد عضلانی در افراد پیر و بالغ، این پرسش پیش می‌آید که آیا فعالیت ورزشی می‌تواند بر میزان بیان ژن‌های Tweak و Fn14 اثر بگذارد؟ از این رو، هدف پژوهش حاضر، بررسی اثر چهار هفته تمرین تناوبی شدید بر بیان ژن‌های Tweak و Fn14 در عضله بازکننده طویل انگشتان در موش‌های پیر و بالغ نژاد C57bl/6 است. در این پژوهش، از موش‌های بالغ و پیر به منظور مشخص کردن روند افزایش سن بر بیان این ژن‌ها و توده عضلانی استفاده شد. با توجه به تغییرات عضلانی از قبیل کاهش تارهای نوع II همراه با پیری، این احتمال هم وجود دارد که بیان این ژن‌ها واکنش چشمگیری به فعالیت ورزشی نشان ندهند. از این رو، به منظور مشخص کردن تأثیرپذیری این ژن‌ها از فعالیت ورزشی، بیان آنها در نتیجه تمرینات ورزشی در عضله موش‌های بالغ نیز تحت مطالعه قرار گرفت.

## روش‌شناسی

پژوهشگران ۲۸ سر موش با ۴ تا ۶ ماهه ( $n=14$ ) و ۲۴ تا ۲۶ ماهه ( $n=14$ ) ماه سن تهیه کردند و آنها را در دو گروه پیر و بالغ با زیرگروه‌های تمرین ( $n=7$ ) و بدون تمرین ( $n=7$ ) به صورت تصادفی قرار دادند. پس از یک هفته آشنایی و سازگاری حیوانات با محیط جدید، موش‌ها به‌طور تصادفی در چهار گروه به شرح ذیل تقسیم شدند: گروه بالغ تمرین: (۱) این گروه شامل هفت سر موش نژاد C57BL/6 چهار تا شش ماهه بود که به مدت چهار هفته و هر هفته پنج جلسه تمرین تناوبی شدید انجام دادند و ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، معدوم شدند. (۲) گروه بالغ بدون تمرین: این گروه شامل هفت سر موش نژاد C57BL/6 چهار تا شش ماهه بود که هیچ‌گونه فعالیت ورزشی انجام ندادند. (۳) گروه پیر تمرین: این گروه شامل هفت سر موش نژاد C57BL/6 ۲۴ تا ۲۶ ماهه بود که به مدت چهار هفته و هر هفته پنج جلسه تمرین تناوبی شدید انجام دادند. (۴) گروه پیر بدون تمرین: این گروه شامل هفت سر موش نژاد C57BL/6 ۲۴ تا ۲۶ ماهه بود که هیچ‌گونه فعالیت ورزشی انجام ندادند. تمام گروه‌ها هم‌زمان با گروه اول قربانی شدند و کلیه آزمایش‌ها درباره آنها انجام پذیرفت. در ابتدای پژوهش، موش‌ها به‌منظور کاهش استرس و نیز آشنایی با دویدن روی تردمیل، در یک برنامه تمرینی یک‌هفته‌ای با سرعت ده تا هجده متر در دقیقه و مدت زمان ده دقیقه شرکت کردند. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه آشناسازی، آزمون ورزشی فزاینده تا مرز خستگی با سرعت ده متر بر دقیقه شروع شد و به‌ازای هر دو دقیقه، دو متر بر سرعت آن افزوده شد. زمان رسیدن به خستگی با ناتوان شدن موش‌ها از دویدن روی تردمیل با وجود ایجاد محرک‌های مختلف از قبیل شوک بادی و ایجاد صدا با زدن ضربه روی درپوش تردمیل مشخص شد (میانگین حداکثر سرعت برای گروه بالغ  $33/66 \pm 2/33$  و گروه پیر  $29/33 \pm 3/26$  متر در دقیقه). تمرین تناوبی شدید بر اساس حداکثر سرعت به‌دست‌آمده طراحی و به مدت چهار هفته و پنج جلسه در هفته بر گروه‌های تمرینی اعمال شد. در ابتدا، تمرین تناوبی با شدتی برابر با ۸۵ درصد حداکثر سرعت شروع و در ادامه، برنامه تناوبی به‌صورت هفتگی ۵ درصد به سرعت افزوده شد و دو هفته آخر با ۹۵ درصد سرعت خاتمه یافت (جدول ۱). هر تناوب شامل دو دقیقه فعالیت با فواصل استراحتی غیرفعال یک‌دقیقه‌ای همراه بود. هفته اول، شامل شش مرحله تمرینی بود که در هفته چهارم به ده مرحله رسید (۲۴).

جدول ۱. برنامه تمرینی چهار هفته‌ای تناوبی شدید

هفته تمرینی				
۴	۳	۲	۱	
۱۰	۱۰	۸	۶	جلسه‌های تمرین / وهله‌های تمرین
۹۵	۹۵	۹۰	۸۵	سرعت میانگین در هفته (درصد سرعت پیشینه)
۲۸	۲۸	۲۶/۴	۲۴/۹	پیر
۳۲	۳۲	۳۰/۳	۲۸/۶	بالغ
میانگین سرعت در هفته تمرینی (متر بر دقیقه)				

۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، موش‌ها با استفاده از گاز CO<sub>2</sub> بی‌هوش شدند و در محیط کاملاً استریل با استفاده از تیغ جراحی و ایجاد برش در قسمت قدامی ساق پای موش، عضله EDL با قطع تاندون پروگزیمال و دیستال خارج شد. عضله بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد شد و جهت انجام آزمایش‌های سلولی - مولکولی در دمای ۸۰- نگه‌داری شد.

**استخراج RNA و سنتز CDNA و Real time-PCR:** جهت استخراج total RNA از عضله بازکننده طویل انگشتان، این عضله به نسبت ۱ به ۱۰ در QIAzol Lysis Reagent هموژن شد. به منظور برداشتن اجزای پروتئینی، محصول در ۴ درجه سانتی‌گراد، ۱۰min، ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شد. سپس، به نسبت ۱ به ۰/۵ با کلروفرم مخلوط و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. محصول در ۴ درجه سانتی‌گراد، ۱۵min، ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شد و بخش معدنی از بخش آبی جدا شد. بخش محتوی RNA برداشته شد و با نسبت ۱ به ۰/۵ با ایزوپروپانول مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق رها شد و سپس در ۴ درجه سانتی‌گراد، ۱۰min، ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شد. Pellet حاوی RNA در اتانول شسته و در ۲۰μL آب RNase-Free حل شد. غلظت RNA (با استفاده از دستگاه (Eppendorff, Germany) برآورد شد و نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ به منزله تخلیص مطلوب تعریف گردید. سنتز cDNA با استفاده از ۱ μg RNA و با استفاده از کیت سنتز cDNA ساخت فرمنتاز و آنزیم Reverse Mulv transcriptase انجام گرفت. جهت اندازه‌گیری سطوح بیان ژن‌های TWEAK و Fn14 از روش کمی Real time-PCR با به کارگیری Primix syber green II استفاده شد (Applied USA Biosystems, duplicate). مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۰μL تهیه شد و هر واکنش به صورت صورت پذیرفت. طراحی اطلاعات پرایمرها بر اساس داده‌های ژن‌های Tweak و Fn14 و β-actin در بانک ژنی NCBI و توسط شرکت ماکرو ژن (Macrogen Inc. Seoul, Korea) به دست آمد. توالی پرایمرهای مورداستفاده در جدول ۲ گزارش شده است، ضمن اینکه از β-actin به مثابه ژن کنترل استفاده شد. برنامه دمایی مورداستفاده در Real time-PCR به این شرح بود: ۹۵ به مدت ۱۰ دقیقه - ۹۵ به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ به مدت ۱ دقیقه (تکرار ۴۰ سیکل). میزان بیان ژن‌های موردنظر نیز با روش  $2^{-\Delta\Delta CT}$  اندازه‌گیری شد.

جدول ۲. توالی پرایمرهای اختصاصی جهت استفاده در Real time-PCR

ژن‌ها	توالی پرایمر	بانک ژن
TWEAK	F= TTACAGTCATCAGCGCTG R= TAGACACCCTTTCCCTCA	NM_011614.3
Fn14	F= TTGGCGCTGGTTTCTAGTTTCC R= TGAATGAATGGACGACGAGTGG	NM_001161746.1
β-actin	F: GCCCTGAGGCTCTTTTCCAG R: TGCCACAGGATTCCATACCC	NM_007393.4

در بخش آمار توصیفی، از شاخص‌های پراکندگی انحراف معیار، میانگین و نمودار و در بخش آمار استنباطی جهت تعیین نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون کولموگروف - اسمیرنوف (KS) استفاده شد. همسان بودن واریانس‌ها نیز با آزمون Leven سنجیده شد. جهت تعیین معنی دار بودن تفاوت بین متغیرها، از آزمون آماری TWO way ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS-20 استفاده شد.

### یافته‌ها

در جدول ۳، تغییرات توده بدنی پیش و پس از دوره تمرین، در گروه‌های مختلف پژوهش گزارش شده است، و در جدول ۴، وزن عضله EDL در گروه‌های پژوهش آمده است.

جدول ۳. میانگین توده بدنی پیش و پس از تمرین در گروه‌های پژوهش

گروه‌ها	توده بدنی (گرم)	
	پس از تمرین	پیش از تمرین
بالغ کنترل	۲۵/۷۳۰±۱/۳۰۳	۲۴±۰/۷۰۷
بالغ تمرین	۲۵/۶۰۰±۲/۴۰۸	۲۳/۸۰۰±۱/۳۰۳
پیر کنترل	۳۰/۶۷۰±۰/۴۴۷	۳۲/۸۰۰±۱/۶۴
پیر تمرین	۳۰/۲۰۰±۳/۳۶۳	۳۰/۷۰۰±۳/۹۶۲

جدول ۴. میانگین تغییرات وزن عضله EDL

گروه‌ها	بالغ کنترل	بالغ تمرین	پیر کنترل	پیر تمرین
وزن EDL (میلی‌گرم)	۱۳/۵۶۷±۰/۵۱۷	۱۴/۴۷۲±۰/۳۴۹	۱۴/۳۴۳±۰/۵۳۹	۱۴/۷۶۸±۱/۱۳۶

پیش از انجام آزمون‌های آماری، به منظور بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها و تجانس واریانس، از آزمون کولموگروف - اسمیرنوف و Levens استفاده شد و نتایج این آزمون برای متغیرهای توده بدنی، میزان بیان ژن‌های Fn14، Tweak و وزن عضله EDL  $p \geq 0.05$  بود؛ بنابراین، تمام متغیرها از توزیع نرمال و تجانس واریانس برخوردار بودند.

جدول ۵. نتایج آزمون تحلیل واریانس دوطرفه بیان ژن Tweak در عضله بازکننده طول انگشتان

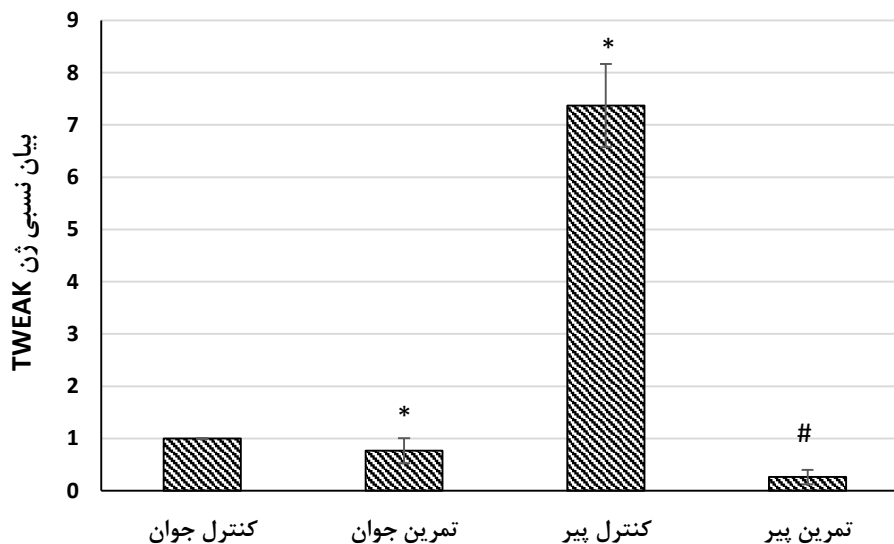
منبع تغییرات	مجموع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	آماره F	میزان معنی داری
مدل	۱۰۹/۱۴۰	۳	۳۶/۳۸۰	۸۳۱/۱۰۸	۰/۰۰۱
عامل تمرین	۳۲/۱۷۵	۱	۳۲/۱۷۵	۷۳۵/۰۴۷	۰/۰۰۱
عامل پیری	۴۸/۳۲۲	۱	۴۸/۳۲۲	۱۱۰۳/۹۲۳	۰/۰۰۱
تمرین* پیری	۲۸/۶۴۳	۱	۲۸/۶۴۳	۶۴۵/۳۵۵	۰/۰۰۱
خطا	۰/۳۵۰	۸	۰/۴۴		
کل	۱۶۶/۲۹۶	۱۲			

همان‌طور که در جدول ۵ ملاحظه می‌شود، نتایج تحلیل واریانس دوطرفه اثر معنی‌دار عامل پیری را بر سطوح بیان ژن **Tweak** در عضله EDL گروه‌های پیر کنترل و تمرین و نیز گروه‌های بالغ کنترل و تمرین پس از چهار هفته تمرین تناوبی شدید نشان می‌دهد ( $P=0/001$ )؛ بنابراین، پیری بر بیان ژن **Tweak** در عضله بازکننده طویل انگشتان موش‌های C57BL/6 اثر دارد. نتایج تحلیل واریانس دوطرفه اثر معنی‌دار عامل پیری را بر سطوح بیان ژن **Fn14** در عضله EDL گروه‌های پیر کنترل و تمرین و نیز گروه‌های بالغ کنترل و تمرین پس از چهار هفته تمرین تناوبی شدید نشان می‌دهد ( $P=0/001$ )؛ بنابراین، پیری بر بیان ژن **Fn14** در عضله بازکننده طویل انگشتان موش‌های C57BL/6 اثر دارد (جدول ۶).

جدول ۶. نتایج آزمون تحلیل واریانس دوطرفه بیان ژن **Fn14** در عضله بازکننده طویل انگشتان

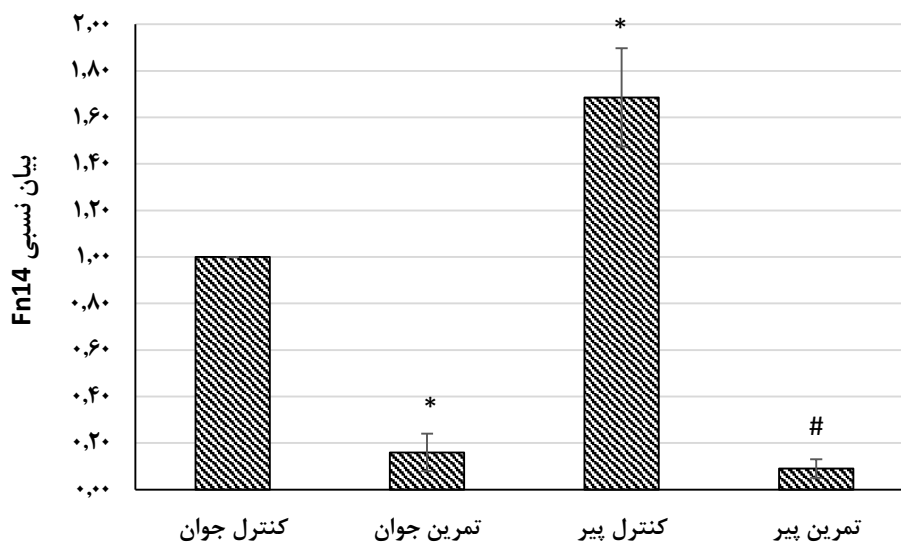
میزان معنی‌داری	آماره F	میانگین مربعات	درجه آزادی	مجموع تغییرات	منبع تغییرات
0/001	115/896	1/722	3	5/165	مدل
0/002	19/152	0/285	1	0/285	عامل تمرین
0/001	299/688	4/452	1	4/452	عامل پیری
0/001	28/849	0/429	1	0/429	تمرین* پیری
		0/015	8	0/109	خطا
			12	11/747	کل

علاوه‌براین، نمودارهای ۱ و ۲ مقایسه ژن‌های **Tweak**، **Fn14** را در گروه‌های مختلف نشان داده‌اند.



نمودار ۱. بیان ژن **Tweak** در گروه‌های مختلف پژوهش.

\*:  $P \leq 0/05$  در مقابل گروه کنترل جوان. #:  $P \leq 0/05$  در مقابل گروه کنترل پیر



نمودار ۲. بیان ژن Fn14 در گروه‌های مختلف پژوهش.  
\* $P \leq 0.05$  در مقابل گروه کنترل جوان. # $P \leq 0.05$  در مقابل گروه کنترل پیر

## بحث

التهاب و افزایش سطوح سایتوکاین‌های پیش‌التهابی عوامل قوی درگیر در کاهش توده عضلانی ناشی از پیری شناخته شده‌اند (۲۵). سایتوکاین‌های التهابی از طریق فعال کردن مسیرهای پروتئولیزی، مهار عمل آنابولیکی فاکتورهای رشدی مختلف، و کاهش ظرفیت بازسازی عضله اسکلتی، سبب آتروفی می‌شوند (۲۵،۲۶). Tweak یکی از سایتوکاین‌های پیش‌التهابی خانواده TNF- $\alpha$  است (۲۷) که اثر خود را از طریق گیرنده Fn14 بر سلول‌های هدف اعمال می‌کند (۹). Tweak در نقش یک واسطه عمل می‌کند که می‌تواند سبب ازدست رفتن توده عضلانی در پاسخ به ازدست رفتن عصب، بی‌حرکتی و گرسنگی شود (۱۴،۲۸). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بیان هر دو ژن Tweak و Fn14 با پیشرفت سن تنظیم افزایشی می‌یابند. برای حمایت از یافته‌های این پژوهش، در زمینه نقش این ژن‌ها در آتروفی ناشی از پیری، می‌توان به گزارش‌های پژوهش تجربی و همکاران (۲۰۱۴) اشاره کرد. آنها نشان دادند که حذف Fn14 آتروفی مرتبط با پیری را تا حد زیادی مهار می‌کند که با سطوح بیشتر پروتئین‌های MHC، تروپونین و  $\alpha$  اکتین سارکومریک همراه است. علاوه بر این، کاهش چشمگیر سطوح پروتئین‌های یوبی کوئیتینه شده که با پیری افزایش می‌یابد، نیز در موش‌های فاقد Fn14 مشاهده شد (۲۹). Tweak / Fn14 با فعال کردن TRAF6 و سپس NF- $\kappa$ B و افزایش MuRF1 در آتروفی مشارکت می‌کند (۱۴). برای اثبات این موضوع می‌توان به یافته‌هایی از مطالعات پیشین اشاره کرد که نشان دادند در موش‌های پیر فاقد Fn14، بیان MuRF1 کاهش می‌یابد (۲۹). همچنین، Tweak فعالیت سیگنالینگ NF $\kappa$ B را در سلول‌های عضله اسکلتی و نیز قلبی افزایش می‌دهد (۳۰). از این رو، گزارش شده است همان‌طور که سن افزایش می‌یابد، فعالیت NF $\kappa$ B در عضلات اسکلتی بیشتر می‌شود، ولی با فقدان Fn14، فعالیت NF $\kappa$ B متصل به DNA کاهش می‌یابد (۲۹).



از آنجا که افزایش بیان این ژن‌ها با تنظیم افزایشی *Tweak / Fn14* هم‌سو است، مسیر *Tweak* / *TRAF6/NF-κB/MuRF1* می‌تواند یکی از مسیرهای احتمالی در سارکوپنیا باشد. در مقابل، هم‌سو با نتایج این پژوهش، که کاهش *Tweak / Fn14* را در گروه‌های تمرین نشان داد، می‌توان گفت تمرین‌های تناوبی شدید، با اثر تعدیلی‌ای که بر این مسیر دارد، توده عضلانی را حفظ می‌کند. برای حمایت از این موضوع می‌توان به مطالعه میتال و همکاران (۱۴) اشاره کرد که گزارش کردند در موش‌های فاقد *Tweak* سطح مقطع عرضی تارهای عضلانی ۱۲ درصد افزایش می‌یابد. افزایش *Fn14 mRNA* نیز در وضعیت ازدست‌رفتن عصب گزارش شده است (۱۴). از طرفی، افزایش سن با تخریب اعصاب حرکتی در تارهای عضلانی نوع دو همراه است (۳۱)؛ بنابراین، یکی از دلایل افزایش *Fn14* مشاهده شده در پژوهش حاضر، ممکن است کاهش حمایت عصبی عضله باشد. از سوی دیگر، تمرین تناوبی شدید بیان *Fn14* را در عضله EDL موش‌های پیر بسیار کاهش داد. همین‌طور، گزارش شده است که تمرین ورزشی عوامل تخریب عصبی را کاهش می‌دهد و عوامل رشد عصبی در نتیجه تمرین‌های ورزشی افزایش می‌یابد (۳۲، ۳۳). علاوه بر تغییرات مشاهده شده در بیان این ژن‌ها در نتیجه افزایش سن و تمرین ورزشی در موش‌های پیر، نتایج نشان داد که تمرین تناوبی پژوهش حاضر می‌تواند بیان این ژن‌ها را در عضلات موش‌های بالغ نیز کاهش دهد، به طوری که بیان هر دو ژن *Tweak* و *Fn14* به طور معنی‌داری در گروه بالغ تمرین نسبت به گروه کنترل جوان کاهش یافته است. این یافته با مطالعات قبلی هم‌سو است که نشان داده‌اند تمرین ورزشی عوامل التهابی (۳۴) و نیز لیگازهای یوبی کوئیتین (۳۵) را در عضلات اسکلتی کاهش می‌دهد. پس، مطابق انتظار در پژوهش حاضر با افزایش ترمیم عصبی، بیان این ژن کاهش یافته است. علاوه بر نقش مشخص شده *Tweak* در تنظیم توده عضلانی، این ژن در متابولیسم عضلانی و بیورژن میتوکندریایی هم درگیر است. در مقایسه با موش‌های سالم، موش‌های فاقد ژن *Tweak* تحمل ورزشی بیشتری نشان دادند که با سطوح بالاتر میتوکندری زیر سارکولمایی و درون میوفیبریلی و بالاتر بودن ظرفیت فسفوریلاسیون اکسایشی همراه بود. *Tweak* بیان *PGC-1α* و دیگر مولکول‌های درگیر در بیورژن میتوکندریایی و متابولیسم اکسایشی را سرکوب می‌کند. از طرفی، گزارش شده است که تمرین‌های تناوبی شدید سبب افزایش بیان *PGC-1α* و بیورژن میتوکندریایی می‌شود (۳۶، ۳۷). احتمالاً بخشی از این سازگاری با تمرین‌های شدید، حاصل کاهش *Tweak* در نتیجه تمرین است.

### نتیجه‌گیری

به طور کلی، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که در نتیجه تمرین‌های ورزشی، بیان ژن‌های *Tweak* و *Fn14* در عضله EDL موش‌های پیر افزایش می‌یابد و این همراه با کاهش در توده عضله EDL است. از سوی دیگر، هرچند در پژوهش حاضر فراخوانی تارهای نوع تند با این نوع تمرین‌های ورزشی مشخص نشد، با توجه به ادبیات موجود و با احتیاط، می‌توان گفت احتمالاً تمرین تناوبی شدید می‌تواند با افزایش فراخوانی تارهای نوع تند، بیان این ژن‌ها را تعدیل کند و به علاوه، با آتروفی عضلانی ناشی از پیری مقابله کند؛ بنابراین،

افراد سالمند می‌توانند با اجرای تمرین با شدت زیاد از کاهش توده عضلانی و اثر مخرب آن بر انجام کارهای زندگی روزمره و ابتلا به بیماری‌های متابولیکی جلوگیری کنند.

### تقدیر و تشکر

پژوهش حاضر از پایان‌نامه کارشناسی ارشد فیزیولوژی ورزشی استخراج شده است. در اینجا، از تمام کسانی که ما را در این پژوهش یاری کردند تقدیر و تشکر می‌کنیم.

### منابع

- Li, Y.P., Chen, Y., John, J., Moylan, J., Jin, B., Mann, D.L., Reid, M.B. (2005). TNF-alpha acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *FASEB Journal*. 19(3):362-70.
- Verhees, K.J., Schols, A.M., Kelders, M.C., Op den Kamp, C.M., van der Velden, J.L., Langen, R.C. (2011). Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  is required for the induction of skeletal muscle atrophy. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 301(5):995-1007.
- Fanzani, A., Conraads, V.M., Penna, F., Martinet, W. (2012). Molecular and cellular mechanisms of skeletal muscle atrophy: an update. *Journal of Cachexia and Sarcopenia Muscle*. 3(3):163-79.
- Klitgaard, H., Mantoni, M., Schiaffino, S., Ausoni, S., Gorza, L., Laurent-Winter, C., Schnohr, P., Saltin, B. (1990). Function, morphology and protein expression of aging skeletal muscle: A cross-sectional study of elderly men with different Ttraining backgrounds. *Acta Physiologica Scandinavia*. 140(1):41-54.
- Dreyer, H.C., Blanco, C.E., Sattler, F.R., Schroeder, E.T., Wiswell, R.A. (2006). Satellite cell numbers in young and older men 24 hours after eccentric exercise. *Muscle and Nerve*. 33(2):242-53.
- Edwards, J.N., Blackmore, D.G., Gilbert, D.F., Murphy, R.M., Launikonis, B.S. (2011). Store-operated calcium entry remains fully functional in aged mouse skeletal muscle despite a decline in STIM1 protein expression. *Aging Cell*. 10(4):675-85.
- Zhao, X., Weisleder, N., Thornton, A., Oppong, Y., Campbell, R., Ma, J., Brotto, M. (2008). Compromised store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in aged skeletal muscle. *Aging Cell*. 7(4):561-8.
- Paul, P.K., Gupta, S.K., Bhatnagar, S., Panguluri, S.K., Darnay, B.G., Choi, Y., Kumar, A. (2010). Targeted ablation of TRAF6 inhibits skeletal muscle wasting in mice. *Journal of Cell Biology*. 191(7):1395-411.
- Burkly, L.C., Michaelson, J.S., Zheng, T.S. (2011). TWEAK/Fn14 pathway: an immunological switch for shaping tissue responses. *Immunological Reviews*. 244(1):99-114.
- Dogra, C., Changotra, H., Mohan, S., Kumar, A. (2006). Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis inhibits skeletal myogenesis through sustained activation of nuclear factor- $\kappa$ B and degradation of MyoD protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 281(15):10327-36.
- Clarke, B.A., Drujan, D., Willis, M.S., Murphy, L.O., Corpina, R.A., Burova, E., Rakhilin, S.V., Stitt, T.N., Patterson, C., Latres, E., Glass, D.J. (2007). The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metabolism*. 6(5):376-85.
- Bhatnagar, S., Mittal, A., Gupta, S.K., Kumar, A. (2012). TWEAK causes myotube atrophy through coordinated activation of ubiquitin-proteasome system, autophagy, and caspases. *Journal of Cellular Physiology*. 227(3):1042-51.
- Peterson, J.M., Bakkar, N., Guttridge, D.C. (2011). NF- $\kappa$ B signaling in skeletal muscle health and disease. *Current Topics in Developmental Biology*. 96:85-119.
- Mittal, A., Bhatnagar, S., Kumar, A., Lach-Trifilieff, E., Wauters, S., Li, H., Makonchuk, D.Y., Glass, D.J., Kumar, A. (2010). The TWEAK-Fn14 system is a critical regulator of denervation-induced skeletal muscle atrophy in mice. *Journal of Cellular Biology*. 188(6):833-49.
- Meng, S.J., Yu, L.J. (2010). Oxidative stress, molecular inflammation and sarcopenia. *International Journal of Molecular Science*. 11(4):1509-26.
- Sheffield-Moore, M., Yeckel, C.W., Volpi, E., Wolf, S.E., Morio, B., Chinkes, D.L., Paddon-Jones, D., Wolfe, R.R. (2004). Postexercise protein metabolism in older and younger men following moderate-intensity aerobic exercise. *American Journal of Physiology-Endocrinology Metabolism*. 287(3):513-22.
- Raue, U., Slivka, D., Jemiolo, B., Hollon, C., Trappe, S. (2006). Myogenic gene expression at rest and after a bout of resistance exercise in young (18–30 yr) and old (80–89 yr) women. *Journal of Applied Physiology*. 101(1):53-9.
- Cunha, T.F., Bacurau, A.V., Moreira, J.B., Paixão, N.A., Campos, J.C., Ferreira, J.C., Leal, M.L., Negrão, C.E., Moriscot, A.S., Wisløff, U., Brum, P.C. (2012). Exercise training prevents oxidative stress and ubiquitin-proteasome system overactivity and reverse skeletal muscle atrophy in heart failure. *PLoS One*. 7(8):1-11.
- Gielen, S., Sandri, M., Kozarez, I., Kratzsch, J., Teupser, D., Thiery, J., Erbs, S., Mangner, N., Lenk, K., Hambrecht, R., Schuler, G., Adams, V. (2012). Exercise training attenuates MuRF-1 expression in the skeletal muscle of patients with chronic heart failure independent of age the randomized leipzig exercise intervention in chronic heart failure and aging catabolism study. *Circulation*. 125(22):2716-27.
- Shefer, G., Rauner, G., Yablonka-Reuveni, Z., Benayahu, D. (2010). Reduced satellite cell numbers and myogenic capacity in aging can be alleviated by endurance exercise. *PLoS One*. 5(10):1-11.
- Gibala, M.J., Little, J.P., van Essen, M., Wilkin, G.P., Burgomaster, K.A., Safdar, A., Raha, S., Tarnopolsky, M.A. (2006). Short-term sprint interval versus traditional endurance training: similar initial adaptations in human skeletal muscle and exercise performance. *The Journal of Physiology*. 575(Pt 3):901-11.

22. Snijders, T., Verdijk, L.B., van Loon, L.J. (2009). The impact of sarcopenia and exercise training on skeletal muscle satellite cells. *Ageing Research Reviews*. 8(4):328-38.
23. Ferreira, J.C., Bacurau, A.V., Bueno, C.R., Cunha, T.C., Tanaka, L.Y., Jardim, M.A., Ramires, P.R., Brum, P.C. (2010). Aerobic exercise training improves Ca<sup>2+</sup> handling and redox status of skeletal muscle in mice. *Experimental Biology Medicine* (Maywood). 235(4):497-505.
24. Thomas, C., Bishop, D., Moore-Morris, T., Mercier, J. (2007). Effects of high-intensity training on Mct1, Mct4, and Nbc expressions in rat skeletal muscles: influence of chronic metabolic alkalosis. *American Journal of Physiology-Endocrinology Metabolism*. 293(4):E916-22.
25. Vinciguerra, M., Musaro, A., Rosenthal, N. (2010). Regulation of muscle atrophy in aging and disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 694:211-33.
26. Li, H., Malhotra, S., Kumar, A. (2008). Nuclear factor-kappa B signaling in skeletal muscle atrophy. *Journal of Molecular Medicine* (Berl). 86(10):1113-26.
27. Chicheportiche, Y., Bourdon, P.R., Xu, H., Hsu, Y.M., Scott, H., Hession, C., Garcia, I., Browning, J.L. (1997). TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 272(51):32401-10.
28. Kumar, A., Bhatnagar, S., Paul, P.K. (2012). TWEAK and TRAF6 regulate skeletal muscle atrophy. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 15(3):233-9.
29. Tajrishi, M.M., Sato, S., Shin, J., Zheng, T.S., Burkly, L.C., Kumar, A. (2014). The TWEAK-Fn14 dyad is involved in age-associated pathological changes in skeletal muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 446(4):1219-24.
30. Shi, J., Jiang, B., Qiu, Y., Guan, J., Jain, M., Cao, X., Bauer, M., Su, L., Burkly, L.C., Leone, T.C., Kelly, D.P., Liao, R. (2013). PGC1alpha plays a critical role in TWEAK-induced cardiac dysfunction. *PLoS One*. 8(1):e54054.
31. Gomes, A.V., Waddell, D.S., Siu, R., Stein, M., Dewey, S., Furlow, J.D., Bodine, S.C. (2012). Upregulation of proteasome activity in muscle RING finger 1-null mice following denervation. *FASEB Journal*. 26(3):2886-99.
32. Arbat-Plana, A., Cobiañchi, S., Herrando-Grabulosa, M., Navarro, X., Udina, E. (2017). Endogenous modulation of TrkB signaling by treadmill exercise after peripheral nerve injury. *Neuroscience*. 340:188-200.
33. English, A.W., Wilhelm, J.C., Sabatier, M.J. (2011). Enhancing recovery from peripheral nerve injury using treadmill training. *Annals of Anatomy*. 193(4):354-61.
34. Gleeson, M., Bishop, N.C., Stensel, D.J., Lindley, M.R., Mastana, S.S., Nimmo, M.A. (2011). The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nature Reviews Immunology*. 11(9):607-15.
35. Moreira, J.B., Bechara, L.R., Bozi, L.H., Jannig, P.R., Monteiro, A.W., Dourado, P.M., Wisløff, U., Brum, P.C. (2013). High- versus moderate-intensity aerobic exercise training effects on skeletal muscle of infarcted rats. *Journal of Applied Physiology*. 114(8):1029-41.
36. Little, J.P., Safdar, A., Bishop, D., Tarnopolsky, M.A., Gibala, M.J. (2011). An acute bout of high-intensity interval training increases the nuclear abundance of PGC-1 $\alpha$  and activates mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 300(6):R1303-10.
37. Gurd, B.J., Perry, C.G., Heigenhauser, G.J., Spriet, L.L., Bonen, A. (2010). High-intensity interval training increases SIRT1 activity in human skeletal muscle. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*. 35(3):350-7.