

تأثیر چهار هفته تمرین تناوبی شدید بر بیان ژن **MST1** و **MAFbx** عضله **EDL** موش‌های پیر

عبدالرضا کاظمی^{۱*} - طاهره دهش^۲

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

۲. کارشناسی ارشد، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

(تاریخ دریافت: ۲۷ / ۰۳ / ۱۳۹۷، تاریخ تصویب: ۲۵ / ۰۷ / ۱۳۹۷)

چکیده

هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر تمرین تناوبی شدید بر بیان ژن‌های **MST1** و **MAFbx** در عضله **EDL** موش‌های پیر **C57bl/6** بود. بدین‌منظور، ۲۸ سر موش **C57bl/6** پیر ($n=14$) و بالغ ($n=14$) در دو گروه تمرین و کنترل قرار گرفتند که گروه‌های تمرین بعد از یک هفته آشناسازی در برنامه ۴ هفته تمرین تناوبی شدید شرکت کردند و ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی قربانی شدند و عضله **EDL** استخراج و به‌وسیله روش **Real-time Pcr** بیان ژن‌های **MST1** و **MAFbx** اندازه‌گیری شد. یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که پیری به‌طور معناداری بیان ژن **MST1** و **MAFbx** را افزایش می‌دهد (به ترتیب $P=0/001$ ، $P=0/028$). از طرف دیگر، ۴ هفته تمرین تناوبی شدید سبب کاهش معنادار بیان ژن **MST1** ($P\leq 0/05$) و کاهش غیرمعنادار **MAFbx** ($P\geq 0/05$) در موش‌های پیر شد. علاوه بر این کاهش این دو ژن در گروه بالغ غیرمعنادار بود. همچنین کاهش معناداری در وزن عضله **EDL** در موش‌های پیر مشاهده شد ($p=0/032$) هرچند تمرین تناوبی شدید در دوران پیری توانسته بود میزان آتروفی را کند، کند. علاوه بر این نشان داده شد که پیری و تمرین بر **MST1** اثر تعاملی دارند ($P=0/001$)، ولی اثر تعاملی این دو عامل بر **MAFbx** مشاهده نشد ($P=0/185$). بنابراین، بالا رفتن سن همراه با افزایش در بیان ژن‌های **MST1** و **MAFbx** است که احتمالاً می‌توانند در تغییرات توده عضلانی همراه با افزایش سن درگیر باشند. با توجه به اینکه تمرینات با شدت بالا بیان این ژن‌ها را کاهش می‌دهد، ممکن است بتوان از این تمرینات در دوران سالمندی به‌منظور حفظ توده عضلانی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی

تمرین تناوبی شدید، سالمندی، سارکوپنیا، **MST1**، **MAFbx**.

مقدمه

سایتوکاین‌های التهابی به‌عنوان عوامل درگیر در کاهش توده عضلانی با افزایش سن در نظر گرفته شده‌اند (۷). هرچند اغلب تجزیه پروتئین‌های سلولی از طریق مسیرهای اصلی شامل پروتئازهای سیستمین وابسته به کلسیم (کالپین‌ها)، پروتئاز اسید آسپارتیک-سیستئین (کاسپیزها)، اتوفازی-لیوزومی^۵ و مسیر یوبی کوئیتین پروتئازوم واسطه‌گری می‌شوند، بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که تجزیه پروتئین به‌واسطه یوبی کوئیتین نقش شایان توجهی در آتروفی عضلانی دارد (۸). دو لیگاز یوبی کوئیتین E3 شامل muRF1 و MAFbx (همچنین آتروژین ۱ نامیده می‌شود) در مدل‌های مختلف آتروفی عضلات اسکلتی در هر دو جوندگان و انسان‌ها تنظیم افزایشی می‌یابند (۳).

خانواده کیناز شبه Ste20 پستانداران (MST) به‌طور گسترده در بافت‌های مختلفی بیان می‌شود و شامل چهار عضو MST1، MST2، MST3، MST4 و MST4 است. نشان داده شده است که کیناز MST1 در شرایط استرسی مختلف شامل فشار اکسایشی و فعال شدن کاسپازها (۹) افزایش می‌یابد. به‌عنوان یکی از عوامل اصلی آبشار پیام‌رسانی هیپو^۸ (۱۰)، رونویسی MST1 در عضلات اسکلتی مختلف و عضله قلبی مشخص شده است (۱۱). در عضله قلبی نشان داده شده است که کیناز MST1 هم محل و قادر به فسفوریلاسیون تروپونین I قلبی در شرایط *in vivo* است (۱۲). نشان داده شده است که در عضلات مختلط سطح پروتئین MST1 در مراحل اولیه پس از تولد زیاد است و در بزرگسالی به‌طور شایان توجهی کاهش می‌یابد. به‌علاوه مشخص شده است که بدون عصب شدن MST1 موجب آتروفی عصبی در عضلات تندانقباض می‌شود. این افزایش

کاهش توده عضلانی یا آتروفی زمانی اتفاق می‌افتد که تخریب پروتئین بیش از سنتز آن باشد (۱، ۲). مطالعات اخیر نشان می‌دهد که عضلات اسکلتی به وضعیت‌های آتروفی مختلف به‌وسیله فعال شدن شبکه پیچیده‌ای از مسیرهای بیوشیمیایی و رونویسی، منجر به بیان دسته‌ای از ژن‌ها به نام آتروژن‌ها می‌شوند. بسیاری از آتروژن‌ها اجزای سیستم یوبی کوئیتین پروتئازوم هستند که مکانیسمی را برای تجزیه انتخابی پروتئین‌های تنظیمی و ساختاری فراهم می‌آورند (۳). در هر دو مورد وضعیت‌های پاتولوژیکی و فیزیولوژیکی، ضعف و آتروفی عضلانی می‌تواند موجب کیفیت زندگی پایین، ناتوانی در انجام کارهای روزانه، خستگی و ایجاد بیماری‌های ثانویه مثل پوکی استخوان و دیابت شود. کاهش سطح مقطع تارهای عضلانی و متعاقب آن اختلال در قدرت، مشخصه اصلی آتروفی عضلانی است. همچنین، آتروفی عضلانی به‌وسیله تغییر در ترکیب تار عضلانی ویژگی می‌یابد (۲). در واقع، پیری تئوری تغییرات تخریبی پیش‌رونده در سلول‌ها و بافت‌های گوناگون است که شانس از بین رفتن آنها را افزایش می‌دهد. برای مثال، در پژوهشی کاهش ۲۵ تا ۴۰ درصد در سطح مقطع عرضی (CSA) عضلات ران در طول عمر مشاهده شد (۴). در همین زمینه نشان داده شده است که افراد پیر در مقایسه با افراد جوان کاهش چشمگیری در اندازه تار عضلانی دارند (۵، ۶). کاهش توده و قدرت عضلانی همراه با پیری سارکوپنیا^۲ خوانده می‌شود. هرچند عقاید بسیاری در خصوص علل سارکوپنیا مانند اختلال در محیط آنابولیکی/کاتابولیکی در گردش خون، افزایش بدعملکردی میتوکندریایی، آسیب اکسایشی و افزایش در غلظت

6. Ubiquitin Proteasome Pathway
7. The mammalian Ste20-like kinase
8. Hippo signaling cascade

1. Gbss Sectional Area
2. Sarcopenia
3. Calpains
4. Caspase
5. Autophagy Lysosome

نوع II شروع می‌شود و از سوی دیگر نشان داده شده است که ارتباط مستقیمی بین میزان فعالیت عصبی عضلانی و تارهای عضلانی وجود دارد (۱۴) و این فعالیت عصبی عضلانی که با پیری در عضلات تندتنش کاهش می‌یابد، در نتیجه در پژوهش حاضر سعی شد تا از برنامه‌ی تمرینی با شدت بالا استفاده شود تا از این طریق تارهای عضلانی نوع II فراخوان شوند تا به‌واسطه‌ی افزایش فعالیت عصبی عضلانی که همراه با پیری در عضلات تندتنش کاهش می‌یابد، تأثیر فعالیت عصبی عضلانی افزایش‌یافته به‌واسطه‌ی تمرینات تناوبی با شدت بالا بر بیان ژن‌های منتخب را بررسی کنیم.

روش پژوهش

برای بررسی فرضیات پژوهش حاضر و رسیدن به اهداف، ۲۸ سر موش با ۴ تا ۶ ماه (n=۱۴) و ۲۴ تا ۲۶ (n=۱۴) ماه سن از مرکز تحقیقات فناوری بن یاخته‌ی تهران تهیه شد که در دو گروه پیر و بالغ با زیرگروه‌های تمرین (n=۷) و بدون تمرین (n=۷) به‌صورت تصادفی قرار گرفتند. حیوانات در شرایط کنترل‌شده‌ی نور (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، شروع روشنایی ۷ صبح و شروع خاموشی ۷ عصر) دما (۱±۲۲ سانتی‌گراد)، و رطوبت طبیعی در آزمایشگاه مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان نگهداری شدند. در گروه HU یک عدد موش صحرایی در هر قفس نگهداری شد و تمامی موش‌های صحرایی در هر دو گروه آزادانه به آب و غذای استاندارد دسترسی داشتند. نگهداری و دستکاری حیوانات براساس کنوانسیون حمایت از حیوانات ایران و کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کرمان بود.

پس از یک هفته‌ی آشناسازی و سازگاری حیوانات با محیط جدید موش‌ها به‌طور تصادفی در چهار گروه به شرح

در MST1 با افزایش بیان آتروژین ۱ و LC3 از طریق فعال کردن FOXO3a همراه است (۱۳).

از سوی دیگر نشان داده شده است که فعالیت ورزشی و تغذیه‌ی مناسب می‌توانند سرعت اختلالات عصبی عضلانی را کاهش دهند (۱۴). شواهد بسیاری نشان می‌دهند، سنتز پروتئین عضله در پاسخ به فعالیت بدنی در افراد جوان و مسن افزایش می‌یابد (۱۵). در همین زمینه، پژوهشی نشان می‌دهد که افراد مسن و جوان هر دو افزایش چشمگیری در MyoD و فاکتور تنظیمی عضله‌زایی ۴ و کاهش بیان ژن مایواستاتین پس از فعالیت ورزشی نشان داده‌اند (۱۶). علاوه‌بر این، فعالیت ورزشی می‌تواند بیان ژن و پروتئین لیگازهای MuRF1 را کاهش دهد.

همان‌طور که اشاره شد، پیری از شرایطی است که کاهش توده‌ی عضلانی در آن بارز است، اما تا به حال میزان بیان ژن MST1 در آتروفی ناشی از پیری و همچنین اثر فعالیت ورزشی بر بیان آن در عضلات پیر بررسی نشده است. شناخت مکانیسم‌های درگیر در آتروفی و بازسازی عضله به توسعه‌ی روش‌های درمانی جدید برای مقابله با وضعیت‌ها و بیماری‌هایی مانند دیستروفی عضلانی، آتروفی ناشی از بی‌حرکتی و پیری کمک خواهد کرد. چندین مسیر سیگنالینگ کاتابولیکی و آنابولیکی مرتبط با تغییر اندازه‌ی عضله هستند (۱۷). شواهد بسیار قوی نشان می‌دهد که اندازه‌ی عضله باز از طریق تعادل بین سنتز و تخریب پروتئین مشخص می‌شود. بنابراین، با توجه به اثر مثبت فعالیت ورزشی بر بهبود توده‌ی عضلانی و افزایش عملکرد عضلانی در افراد پیر، این سؤال پیش می‌آید که آیا فعالیت ورزشی می‌تواند بر بیان ژن‌های MST1 و MAFbx اثر بگذارد؟ از این‌رو، هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر ۴ هفته‌ی تمرین تناوبی شدید بر میزان بیان ژن‌های MST1 و MAFbx در عضله‌ی بازکننده‌ی طولی انگشتان موش‌های پیر بود. با توجه به اینکه در سالمندی فرایند سارکوپنیا از تارهای عضلانی

۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه آشناسازی آزمون ورزشی فزاینده تا مرز خستگی انجام گرفت که با سرعت ده متر بر دقیقه شروع شد و به ازای هر دو دقیقه، دو متر بر سرعت آن افزوده شد. زمان رسیدن به خستگی با عدم توانایی موش‌ها در دویدن روی تردمیل با وجود ایجاد محرک‌های مختلف مانند شوک بادی و ایجاد صدا با زدن ضربه روی درپوش تردمیل مشخص شد (میانگین حداکثر سرعت برای گروه بالغ $2/33 \pm 33/66$ و گروه پیر $3/26 \pm 29/33$). تمرین تناوبی شدید براساس سرعت حداکثر به دست آمده طراحی و به مدت ۴ هفته و ۵ 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 به صورت 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 یک دقیقه همراه بود. هفته اول شامل شش مرحله تمرینی بود که در هفته چهارم به ده مرحله رسید (۱۸).

زیر تقسیم شدند: گروه بالغ تمرین (ADT)؛ این گروه شامل ۷ سر موش نژاد C57BL/6 ۴ تا ۶ ماهه بودند که به مدت ۴ هفته و هر هفته ۵ جلسه تمرین تناوبی شدید انجام دادند و ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی قربانی شدند. گروه بالغ بدون تمرین (ADC)؛ این گروه شامل ۷ سر موش نژاد C57BL/6 ۴ تا ۶ ماهه بودند که هیچ‌گونه فعالیت ورزشی انجام نمی‌دادند. گروه پیر تمرین (AGT)؛ این گروه شامل ۷ سر موش نژاد C57BL/6 ۲۴ تا ۲۶ ماهه بودند که به مدت ۴ هفته و هر هفته ۵ جلسه تمرین تناوبی شدید انجام دادند. گروه پیر بدون تمرین (AGC)؛ این گروه شامل ۷ سر موش نژاد C57BL/6 ۲۴ تا ۲۶ ماهه بودند که هیچ‌گونه فعالیت ورزشی انجام نمی‌دادند. تمامی گروه‌ها همزمان با گروه اول قربانی شدند و کلیه مراحل و آزمایش‌ها روی آنها انجام پذیرفت. در ابتدای پژوهش موش‌ها به منظور کاهش استرس و همچنین آشنایی با دویدن روی تردمیل، در یک برنامه تمرینی به مدت یک هفته با سرعت ۱۰ تا ۱۸ متر در دقیقه و مدت زمان ده دقیقه شرکت کردند.

جدول ۱. برنامه تمرینی ۴ هفته‌ای اینتروال شدید

هفته تمرینی			
۴	۳	۲	۱
۱۰	۱۰	۸	۶
۹۵	۹۵	۹۰	۸۵
۲۸	۲۸	۲۶/۴	۲۴/۹
۳۲	۳۲	۳۰/۳	۲۸/۶

جلسات تمرینی/ وهله‌های تمرین
سرعت میانگین در هفته (درصد سرعت بیشینه)
پیر میانگین سرعت در هفته تمرینی (متر بر دقیقه)
بالغ

پروگزیمال و دیستال استخراج شد. بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد شد و به منظور انجام آزمایش‌های سلولی مولکولی در یخچال ۸۰- نگهداری شد.

۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی موش‌ها با استفاده از گاز CO₂ 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

Thermo fisher scientific, Fermentas,) cDNA Reverse Mulv (USA, cat NO: K1621 و آنزیم transcriptase انجام گرفت.

به منظور اندازه گیری سطوح بیان ژن های MST1 و MAFbx از روش کمی Real time-PCR با استفاده از Primix syber green II (Applied USA) انجام گرفت (Biosystems,). مخلوط واکنش در حجم نهایی 20 μL و هر واکنش به صورت duplicate صورت پذیرفت. طراحی پرایمرها بر اساس اطلاعات ژن های MST1 و MAFbx و β-actin در بانک ژنی NCBI و توسط شرکت ماکرو ژن (Macrogen Inc. Seoul, Korea) انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۲-۳ گزارش شده است، ضمن اینکه از β-actin به عنوان ژن کنترل استفاده شد. برنامه دمایی مورد استفاده در Real time-PCR شامل ۹۵ به مدت ۱۰ دقیقه- ۹۵ به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ به مدت ۱ دقیقه (تکرار ۴۰ سیکل) بود. میزان بیان ژن های مورد نظر نیز با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ اندازه گیری شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA و Real time-PCR

به منظور 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 C، ۱۰ min، ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شد. سپس به نسبت ۱ به ۰/۵ با کلروفورم مخلوط و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. محصول در ۴ C، ۱۵ min، ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ و بخش معدنی و آبی از هم جدا شدند. بخش محتوی RNA برداشته شده و با نسبت ۱ به ۰/۵ با ایزوپروپانول مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق رها و سپس در ۴ C، ۱۰ min، ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شد. RNA حاوی Pellet در اتانول شست و شو و در 20 μL آب RNase-Free حل شد. غلظت RNA (با استفاده از دستگاه Eppendorff, Germany) مورد سنجش واقع شد و نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ به عنوان تخلیص مطلوب تعریف شد. سنتز cDNA با استفاده از 1 μg RNA و با استفاده از کیت سنتز

جدول ۲. توالی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر

ژن ها	توالی پرایمر	بانک ژن
MST1	F=AACTGACAGGTGTTGGATGATCTC R=ACTCCAGGTAAAGCAGAAACAAGC	NM_008243.3
MAFbx	F=CTGGGATCTCAGAGGGATTTGACC R=TCTCCACCAGAGATCCTGGATG	NM_026346.3
β-actin	F: GCCCTGAGGCTCTTTTCCAG R: TGCCACAGGATTCCATACCC	NM_007393.4

واریانسها با آزمون Leven سنجیده شد. برای تعیین معنادار بودن تفاوت بین متغیرها از آزمون آماری One way ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد. به منظور تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار SPSS-20 استفاده شد.

روش آماری

در بخش آمار توصیفی از شاخص های پراکندگی انحراف معیار، میانگین و نمودار و در بخش آمار استنباطی به منظور تعیین نرمال بودن توزیع داده ها از آزمون کولموگروف - اسمیرنوف (KS) استفاده شد. همچنین همسان بودن

یافته‌ها

در جدول ۲ تغییرات توده بدنی پیش و پس از دوره تمرینی در گروه‌های مختلف پژوهش و در جدول ۳ وزن عضله EDL در گروه‌های پژوهش ارائه شده است. 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 MST1، MAFbx و وزن عضله EDL $P \geq 0.05$ بود، بنابراین تمامی متغیرها از توزیع نرمال و تجانس واریانس برخوردارند.

همان‌طور که در جدول ۴ ملاحظه می‌شود، نتایج آنالیز واریانس دوطرفه اثر معناداری را در عامل پیری بر سطوح بیان ژن MST1 در عضله EDL گروه‌های پیر کنترل و تمرین با گروه‌های بالغ کنترل و تمرین پس از ۴ هفته تمرین تناوبی شدید نشان می‌دهد ($P=0.0001$). از این رو فرض صفر رد می‌شود؛ بنابراین، پیری بر بیان ژن MST1 در عضله بازکننده طویل انگشتان موش‌های C57BL/6 اثر دارد.

جدول ۲. میانگین توده بدنی پیش و پس از تمرین در گروه‌های پژوهش

توده بدنی (گرم)		گروه‌ها
پس از تمرین	پیش از تمرین	
۲۵/۱±۷۳/۳۰۳	۰±۲۴/۷۰۷	بالغ کنترل
۲۵/۲±۶۰/۴۰۸	۲۳/۱±۸۰/۳۰۳	بالغ تمرین
۳۰/۰±۶۷/۴۴۷	۳۲/۱±۸۰/۶۴	پیر کنترل
۳۰/۳±۲۰/۳۶۳	۳۰/۳±۷۰/۹۶۲	پیر تمرین

جدول ۳. میانگین تغییرات وزن عضله EDL

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

جدول ۴. نتایج آزمون تحلیل واریانس دوطرفه بیان ژن MST1 در عضله بازکننده طویل انگشتان

منبع تغییرات	مجموع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	آماره F	مقدار معناداری
مدل	۰/۰۰۰۰۶۳	۳	۰/۰۰۰۰۲۱	۳۱/۶۱۴	۰/۰۰۰۱
عامل تمرین	۰/۰۰۰۰۰۷	۱	۰/۰۰۰۰۰۷	۱۳۱/۹۹۳	۰/۰۱۲
عامل پیری	۰/۰۰۰۰۳۸	۱	۰/۰۰۰۰۳۸	۱۰/۶۲۳	۰/۰۰۰۱
تمرین* پیری	۰/۰۰۰۰۱۷	۱	۰/۰۰۰۰۱۷	۵۸/۱۲۱	۰/۰۰۱
خطا	۰/۰۰۰۰۰۵	۸	۰/۰۰۰۰۰۱	۲۶/۰۹۷	
کل	۰/۰۰۰۱۵۵	۱۲			

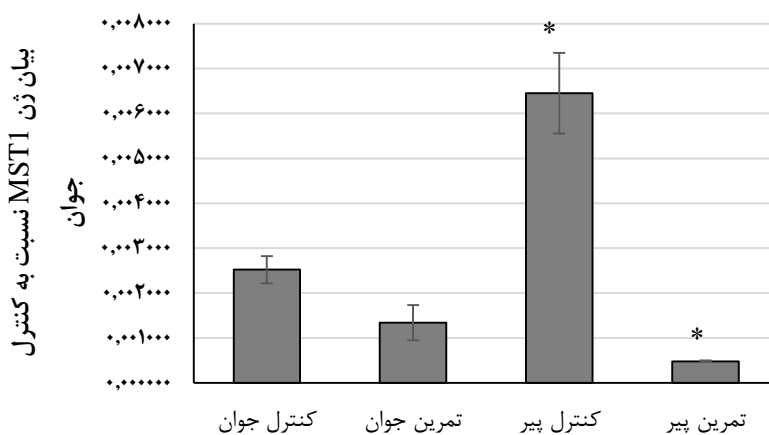
فرض صفر رد می‌شود؛ بنابراین، پیری بر بیان ژن MAFbx در عضله بازکننده طویل انگشتان موش‌های C57BL/6 اثر دارد.

علاوه بر این نمودارهای ۱ و ۲ مقایسه ژن‌های MST1 و MAFbx را در گروه‌های مختلف نشان می‌دهند.

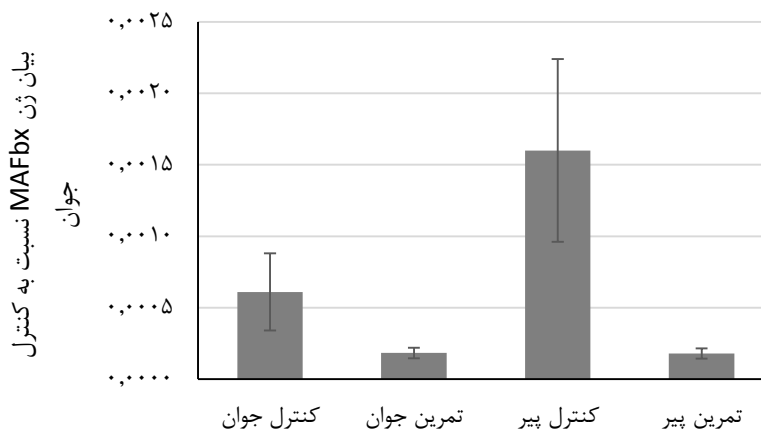
همان‌طور که در جدول ۵ ملاحظه می‌شود، نتایج آنالیز واریانس دوطرفه اثر معناداری را در عامل پیری بر سطوح بیان ژن MAFbx در عضله EDL گروه‌های پیر کنترل و تمرین با گروه‌های بالغ کنترل و تمرین پس از ۴ هفته تمرین تناوبی شدید نشان می‌دهد ($P=0.028$). از این رو

جدول ۵. نتایج آزمون تحلیل واریانس دوطرفه بیان ژن MAFbx در عضله بازکننده طویل انگشتان

منبع تغییرات	مجموع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	آماره F	مقدار معناداری
مدل	۰/۰۰۰۰۰۴	۳	۰/۰۰۰۰۰۱	۳/۷۷۲	۰/۰۵۹
عامل تمرین	۰/۰۰۰۰۰۱	۱	۰/۰۰۰۰۰۱	۲/۰۶۶	۰/۱۸۹
عامل پیری	۰/۰۰۰۰۰۳	۱	۰/۰۰۰۰۰۳	۷۱/۱۴۲	۰/۰۲۸
تمرین* پیری	۰/۰۰۰۰۰۱	۱	۰/۰۰۰۰۰۱	۲/۱۰۸	۰/۱۸۵
خطا	۰/۰۰۰۰۰۳	۸	۰/۰۰۰۰۰۱		
کل	۰/۰۰۰۰۱۲	۱۲			



نمودار ۱. بیان ژن MST1 در گروه‌های مختلف پژوهش. * $P<0.05$ در مقابل گروه کنترل جوان. # $P<0.05$ در مقابل گروه کنترل پیر



نمودار ۲. بیان ژن MAFbx در گروه‌های مختلف پژوهش

بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که در دوران پیری بیان ژن‌های MST1 و MAFbx به‌طور معناداری در عضله بازکننده طولی انگشتان افزایش می‌یابد. علاوه بر این، تمرین می‌تواند بیان هر دو ژن را کاهش دهد؛ هرچند اثر تمرین بر ژن MST1 معنادار بود. همچنین، کاهش معناداری در وزن عضله EDL در موش‌های پیر مشاهده شد. هرچند تمرین تناوبی شدید در دوران پیری توانسته بود میزان آتروفی را کمتر کند. از این‌رو، تغییرات در وزن عضله EDL در هر دو وضعیت پیری و تمرین با تغییرات ژن‌های آتروفیکی MST1 و MAFbx همسو بود.

افزایش فشار اکسایشی ایجادشده در عضلات پیر می‌تواند دلیل افزایش MST1 باشد. نشان داده شده است که کیناز MST1 در شرایط استرسی مختلف شامل فشار اکسایشی (۱۹) و فعال شدن کاسپازها افزایش می‌یابد. پژوهش‌های قبلی به‌طور قوی نشان داده‌اند که در طول پیری به‌دلیل بدعملکردی میتوکندری، تجمع گونه‌های اکسیژنی فعال (ROS) در بافت‌های مختلف از جمله عضله اسکلتی افزایش (۲۰) و ظرفیت اکسیدانی با افزایش سن برای مقابله با استرس اکسایشی کاهش می‌یابد (۲۱).

از سوی دیگر، افزایش بیان MST1 می‌تواند یکی از مکانیسم‌های درگیر در افزایش MAFbx باشد. Foxo3 که یکی از عوامل پایین‌دست MST1 است، می‌تواند بیان عوامل آتروژنیکی متفاوت را تنظیم کند. Foxo3 با اتصال به ناحیه پروموتور ژن MAFbx بیان آن را تنظیم افزایشی می‌کند. MST1 از طریق فسفوریله کردن serin7 در Foxo3 می‌تواند موجب افزایش و انتقال هسته‌ای آن در عضلات اسکلتی شود (۱۳). مشخص شده است که تحت شرایط استرس اکسایشی در نورون‌های عصبی، MST1 با فسفوریله کردن Foxo3 موجب انتقال آن به هسته شده و فعال‌سازی ژن‌های پیش‌آپوپتوزی را در پی دارد (۲۲). برای

اثبات این موضوع می‌توان به پژوهش وی و همکاران (۲۰۱۳) اشاره کرد. آنها کاهش ۴۰ درصد را در بیان MAFbx در موش‌های فاقد ژن MST1 مشاهده کردند، پس احتمالاً MST1 از طریق تعدیل مسیرهای پایین‌دست Foxo بیان MAFbx را کنترل می‌کند.

وی و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که بیان MST1 و نقش آتروفیکی آن در شرایط بدون عصب شدن در عضلات تند انقباض بیشتر است. در همین راستا، به‌طور بالقوه‌ای گزارش شده است که افزایش سن همراه با تخریب نورون‌های حرکتی در تارهای عضلانی نوع دو است. از بین رفتن عصب تارهای عضلانی بیان پروتئولیزهای یوبی کوئیتین را (۲۳) در عضله افزایش می‌دهد. از این‌رو، این تخریب عصبی همراه با پیری می‌تواند دلیل افزایش MST1 باشد.

همچنین، شواهد نشان می‌دهد که بیان سایتوکاین‌های التهابی از قبیل IL-1 β و TNF- α با افزایش سن در عضلات اسکلتی افزایش می‌یابد و همبستگی بین مارکرهای التهاب سیستمیک و کاهش توده عضلانی و قدرت در سالمندی وجود دارد و نسبت به افراد بالغ بیان سایتوکاین‌های التهابی در افراد پیر بالاتر است (۲۴). TNF- α می‌تواند هم مستقیماً به‌واسطه افزایش فعالیت و بیان مسیر پروتئولیزی وابسته به یوبی کوئیتین یا از طریق افزایش آپوپتوز آتروفی عضلانی را در دوران سالمندی ایجاد کند (۲۵). نشان داده شده است که MST1 بخشی از اثرات TNF- α در آپوپتوز سلول‌ها را واسطه‌گری می‌کند (۲۶). TNF- α از طریق مسیرهای p38 MAPK و NF κ B بیان MAFbx و MuRF1 را در عضلات اسکلتی افزایش می‌دهد (۲۷). بنابراین می‌توان گفت که افزایش التهاب دوران سالمندی می‌تواند یکی از مکانیسم‌های افزایش MST1 باشد و با توجه به اینکه MAFbx پایین‌دست MST1 وجود دارد، TNF- α از طریق مسیر MST1 بیان MAFbx را در

دوران سالمندی افزایش می‌دهد.

همان‌طور که اشاره شد، ۴ هفته تمرین تناوبی شدید بیان ژن‌های MST1 و MAFbx را در هر دو گروه‌های پیر و بالغ کاهش داده است. با توجه به اینکه تا به حال پژوهشی در زمینه اثر فعالیت ورزشی بر بیان MST1 انجام نگرفته است مکانیسم‌های احتمالی این کاهش مشخص نشده‌اند، ولی این احتمال وجود دارد که تمرین ورزشی از طریق تنظیم کاهشی عوامل مذکور بر بیان این ژن‌ها اثر گذاشته است. به‌طور مثال، نشان داده شده است که تمرینات شدید بیان سایتوکاین‌های پیش‌التهابی را کاهش و ضدالتهابی را افزایش می‌دهد (۲۸). در مقایسه تمرینات با شدت متوسط نشان داده شده است که تمرینات شدید به دلیل اثر ضدالتهابی بیشتر، در کاهش خطرهای بیماری‌های مزمن قلبی عروقی و متابولیکی اثربخشی بالاتری دارند (۲۹). علاوه بر این، یافته‌های حاصل از پژوهش‌های مختلف نشان می‌دهد که تمرینات ورزشی منظم موجب تقویت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و تقلیل فشار اکسایشی در بافت‌های مختلف از جمله عضله اسکلتی و در وضعیت‌های فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی گوناگون مانند پیری می‌شود (۳۰). همچنین احتمالاً تمرین ورزشی استفاده‌شده در پژوهش حاضر از طریق بهبود وضعیت عصب رسانی، بیان MST1 و در پی آن MAFbx را کاهش داده است. در همین زمینه قبلاً کاهش عوامل تخریب عصبی به دنبال تمرینات با شدت بالا گزارش شده است (۳۱).

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که پیری به‌طور معناداری وزن عضله EDL را تحت تأثیر قرار داده است و همان‌طور که آنالیز واریانس یکطرفه نشان داد، اختلاف معناداری بین گروه بالغ و پیر کنترل وجود دارد و همسو با

نتایج تحقیقات پیشین توده عضلانی در موش‌های پیر کاهش یافته است (۳۲).

از سوی دیگر، نتایج نشان داد که ۴ هفته تمرین تناوبی شدید تا حدودی آتروفی عضلانی را در موش‌های پیر کنترل کرده است. هرچند در پژوهش حاضر سازوکارهای درگیر در آتروفی عضلانی ارزیابی نشد، ولی احتمالاً تمرین ورزشی استفاده‌شده در پژوهش حاضر از طریق کاهش در بیان MST1 و MAFbx میزان آتروفی را کاهش داده است.

علاوه بر اثر فعالیت ورزشی بر کاهش این ژن‌های بررسی‌شده تمرین ورزشی می‌تواند از مسیرهای مستقل دیگری اثرات خود را اعمال کند. به‌طور مثال، تمرین ورزشی با تأثیرات ضدالتهابی خود (۲۸) یا تقویت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی می‌تواند از افزایش بیان پروتئازوم‌های عضلانی ناشی از افزایش ROS جلوگیری کند (۳۳).

با توجه به نتایج پژوهش حاضر می‌توان گفت که MST1 و MAFbx می‌توانند یکی از مکانیسم‌های درگیر در سارکوپنیا باشند و فعالیت ورزشی به‌واسطه تغییر در عوامل بالادستی یا پایین‌دستی آنها می‌تواند اثرات این ژن‌ها را بر کاهش توده عضلانی ناشی از افزایش سن تعدیل کند. بنابراین، افراد سالمند برای بالا بردن سلامت عصبی عضلانی خود نیازمند اجرای تمرینات با شدت بالا باشند تا از تأثیرات مخرب کاهش توده عضلانی بر انجام کارهای زندگی روزمره و ابتلا به بیماری‌های متابولیکی جلوگیری کنند.

تقدیر و تشکر

پژوهش حاضر مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد فیزیولوژی ورزشی است، بدین‌وسیله از تمامی کسانی که ما را در این پژوهش یاری کردند، تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع و مآخذ

1. Verhees KJ, Schols AM, Kelders MC, Op den Kamp CM, van der Velden JL, Langen RC. Glycogen synthase kinase-3 β is required for the induction of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011;301(5):C995-C1007.
2. Fanzani A, Conraads VM, Penna F, Martinet W. Molecular and cellular mechanisms of skeletal muscle atrophy: an update. *J cachexia, sarcopenia and muscle*. 2012;3(3):163-79.
3. Paul PK, Gupta SK, Bhatnagar S, Panguluri SK, Darnay BG, Choi Y, et al. Targeted ablation of TRAF6 inhibits skeletal muscle wasting in mice. *J cell biol*. 2010;191(7):1395-411.
4. Lexell J, Taylor CC, Sjöström M. What is the cause of the ageing atrophy?: Total number, size and proportion of different fiber types studied in whole vastus lateralis muscle from 15- to 83-year-old men. *J neurolo sci*. 1988;84(2-3):275-94.
5. Dreyer HC, Blanco CE, Sattler FR, Schroeder ET, Wiswell RA. Satellite cell numbers in young and older men 24 hours after eccentric exercise. *Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine*. 2006;33(2):242-53.
6. Verdijk LB, Koopman R, Schaart G, Meijer K, Savelberg HH, van Loon LJ. Satellite cell content is specifically reduced in type II skeletal muscle fibers in the elderly. *American J Physiol Endocrinol and Metab*. 2007;292(1):E151-E7.
7. Rowan SL, Rygiel K, Purves-Smith FM, Solbak NM, Turnbull DM, Hepple RT. Denervation causes fiber atrophy and myosin heavy chain co-expression in senescent skeletal muscle. *PloS one*. 2012;7(1):e29082.
8. Bialek P, Morris C, Parkington J, St. Andre M, Owens J, Yaworsky P, et al. Distinct protein degradation profiles are induced by different disuse models of skeletal muscle atrophy. *Physiol genomic*. 2011;43(19):1075-86.
9. Graves JD, Draves KE, Gotoh Y, Krebs EG, Clark EA. Both phosphorylation and caspase-mediated cleavage contribute to regulation of the Ste20-like protein kinase Mst1 during CD95/Fas-induced apoptosis. *J Bioll Chem*. 2001;276(18):14909-15.
10. Zhao B, Li L, Guan K-L. Hippo signaling at a glance. *J Cell Sci*. 2010;123(23):4001-6.
11. Watt KI, Judson R, Medlow P, Reid K, Kurth TB, Burniston JG, et al. Yap is a novel regulator of C2C12 myogenesis. *Biochem biophys res commun*. 2010;393(4):619-24.
12. You B, Yan G, Zhang Z, Yan L, Li J, Ge Q, et al. Phosphorylation of cardiac troponin I by mammalian sterile 20-like kinase 1. *Biochem J*. 2009;418(1):93-101.
13. Wei B, Dui W, Liu D, Xing Y, Yuan Z, Ji G. MST1, a key player, in enhancing fast skeletal muscle atrophy. *BMC biol*. 2013;11(1):12.
14. Aagaard P, Suetta C, Caserotti P, Magnusson SP, Kjær M. Role of the nervous system in sarcopenia and muscle atrophy with aging: strength training as a countermeasure. *Scan j med sci sports*. 2010;20(1):49-64.
15. Sheffield-Moore M, Yeckel C, Volpi E, Wolf S, Morio B, Chinkes D, et al. Postexercise protein metabolism in older and younger men following moderate-intensity aerobic exercise. *Am J Physiol Endocrin Metab*. 2004;287(3):E513-E22.

16. Raue U, Slivka D, Jemiolo B, Hollon C, Trappe S. Myogenic gene expression at rest and after a bout of resistance exercise in young (18–30 yr) and old (80–89 yr) women. *J Appl Physiol*. 2006;101(1):53-9.
17. Chopard A, Hillock S, Jasmin BJ. Molecular events and signalling pathways involved in skeletal muscle disuse-induced atrophy and the impact of countermeasures. *J cell mol med*. 2009;13(9b):3032-50.
18. Thomas C, Bishop D, Moore-Morris T, Mercier J. Effects of high-intensity training on MCT1, MCT4, and NBC expressions in rat skeletal muscles: influence of chronic metabolic alkalosis. *Am J Physiol Endocrin Metab*. 2007;293(4):E916-E22.
19. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *cell*. 1999;96(6):857-68.
20. Cencioni C, Spallotta F, Martelli F, Valente S, Mai A, Zeiher AM, et al. Oxidative stress and epigenetic regulation in ageing and age-related diseases. *Inter J mol sci*. 2013;14(9):17643-63.
21. Jackson MJ, McArdle A. Age-related changes in skeletal muscle reactive oxygen species generation and adaptive responses to reactive oxygen species. *J physiol*. 2011;589(9):2139-45.
22. Lehtinen MK, Yuan Z, Boag PR, Yang Y, Villén J, Becker EB, et al. A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span. *Cell*. 2006;125(5):987-1001.
23. Gomes AV, Waddell DS, Siu R, Stein M, Dewey S, Furlow JD, et al. Upregulation of proteasome activity in muscle RING finger 1-null mice following denervation. *FASEB J*. 2012;26(7):2986-99.
24. Deschenes MR, Roby MA, Eason MK, Harris MB. Remodeling of the neuromuscular junction precedes sarcopenia related alterations in myofibers. *Exp gerontol*. 2010;45(5):389-93.
25. Pistilli EE, Jackson JR, Alway SE. Death receptor-associated pro-apoptotic signaling in aged skeletal muscle. *Apoptosis*. 2006;11(12):2115.
26. Ohtsubo H, Ichiki T, Imayama I, Ono H, Fukuyama K, Hashiguchi Y, et al. Involvement of Mst1 in tumor necrosis factor- α -induced apoptosis of endothelial cells. *Biochem biophys res commun*. 2008;367(2):474-80.
27. Adams V, Mangner N, Gasch A, Krohne C, Gielen S, Hirner S, et al. Induction of MuRF1 is essential for TNF- α -induced loss of muscle function in mice. *J mol biology*. 2008;384(1):48-59.
28. Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(9):607.
29. Balducci S, Zanuso S, Nicolucci A, De Feo P, Cavallo S, Cardelli P, et al. Effect of an intensive exercise intervention strategy on modifiable cardiovascular risk factors in subjects

- with type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled trial: the Italian Diabetes and Exercise Study (IDES). *Arch inter med.* 2010;170(20):1794-803.
30. Marosi K, Bori Z, Hart N, Sárga L, Koltai E, Radák Z, et al. Long-term exercise treatment reduces oxidative stress in the hippocampus of aging rats. *Neuroscience.* 2012;226:21-8.
31. Ghadiri-hormati L, Aminaei M, dakhili A, Asadishekaari M. The Effect of High-Intensity Exercise Training on Gene Expression of Semaphorin 3A in Extensor Digitorum Longus Muscles of Aged C57bl/6 Mice. *Sci J Ilam Uni Med Sci.* 2017;25(1):92-102.
32. Morissette M, Stricker J, Rosenberg M, Buranasombati C, Levitan E, Mittleman M. Effects Of Myostatin Deletion In Aging Mice. *Aging Cell.* 2009;8(5):573-83.
33. Li Y, Chen Y, John J, Moylan J, Jin B, Mann D. Tnf-A Acts Via P38 Mapk To Stimulate Expression Of The Ubiquitin Ligase Atrogin1/Mafbx In Skeletal Muscle. *FASEB J.* 2005;19(3):362-70.

The Effect of 4 Weeks of High Intensity Training on Gene Expression of MST1 and MAFbx in EDL Muscle of Aged Mice

Abdolreza Kazemi*¹- Taherh Dahesh²

1. Associate Professor, Department of Sport Sciences, Faculty of Literature and Humanities, Vali E Asr University, Rafsanjan, Iran 2. MSc, Department of Exercise Physiology, Faculty of Literature and Humanities, Islamic Azad University, Kerman, Iran

(Received: 2018/06/17; Accepted: 2019/10/17)

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of high intensity interval training on gene expressions of MST1 and MAFbx in EDL muscles of aged C57bl/6 mice. 28 C57bl/6 mice (14 aged and 14 adults) were assigned to two groups of training and control. After one week of familiarization, training groups participated in 4 weeks of high intensity training program. 48 hours after the last training session, the mice were sacrificed, their EDL muscles were extracted. Then, gene expressions of MST1 and MAFbx were measured with Real Time PCR technique. The results showed that aging significantly increased gene expressions of MST1 and MAFbx ($P=0.001$ and $P=0.028$ respectively). On the other hand, 4 weeks of high intensity interval training significantly reduced MST1 gene expression ($P\leq 0.05$) and insignificantly reduced MAFbx ($P\geq 0.05$) in aged mice. Furthermore, decrease of these two genes in adult group was not significant. Also, a significant decrease was observed in EDL muscle weight in aged mice ($P=0.032$) although high intensity interval training could slow down the atrophy in the aged. In addition, aging and training had an interactive effect ($P=0.001$) but this interactive effect of these two factors was not observed on MAFbx ($P=0.185$). Thus, aging is associated with an increase in MST1 and MAFbx gene expressions which could be possibly involved in muscle mass changes associated with aging. Since high intensity interval training decreases these gene expressions, it can be used to maintain muscle mass in the aged.

Keywords

Aging, high intensity interval training, MAFbx, MST1, sarcopenia.

* Corresponding Author: Email: a.kazemi@vru.ac.ir; Tel: +989133982706