

The effect of aerobic training on Klotho protein and a selected of inflammatory indices in kidney of Male Rats

Akbar Moein, Hojatollah Nikbakht*, Farshad Ghazalian

Physiology Department of Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

(Received: 2017/04/3 Accept: 2017/08/8)

Abstract

Background: Considering the importance of the Klotho gene and cytokine proteins and the existence of some research on the effect of exercise on these proteins, the present study was carried out to examine the effect of aerobic training on Klotho protein, interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha inflammatory factors in rats.

Materials and Methods: For this purpose 12 male rats with an average weight $170\pm 5\text{g}$ and the age of eight weeks were divided into two groups: control ($N=6$) and experimental ($N=6$) groups. The experimental groups trained on a treadmill for 8 weeks and 3 sessions per week. 48 h after the last training session, both groups of rats were slaughtered ethically and kidney tissue was extracted. Klotho, IL-6 and TNF- α proteins of kidney tissues were measured and counted using by the western blot method.

Findings: The Klotho protein ($P=0.05$) significantly increased in training rats compared with the control group. Also the IL-6 protein ($P=0.05$) significantly decreased in training rats compared with the control group. While the TNF- α protein ($P=0.42$) did not show a significant difference.

Conclusion: Aerobic training might increase the Klotho protein, on the other hand can also decrease the levels of IL-6 protein secreted by the kidney. So it can be said that probably aerobic training may delay aging symptoms and may decrease in inflammatory responses.

Keywords: Aerobic training, Klotho, TNF- α , IL6

*Corresponding author: Hojatollah Nikbakht
Email: hojnik1937@yahoo.com

اثر هشت هفته تمرین هوازی بر پروتئین کلوتو و منتخبی از شاخصهای التهابی بافت کلیه در موشهای صحرائی نر

اکبر معین، حجت الله نیکبخت*، فرشاد غزالیان

واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۱/۱۴ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۵/۱۷

چکیده:

سابقه و هدف: با توجه به اهمیت ژن کلوتو و پروتئین‌های سایتوکاین و وجود بعضی تحقیقات مبنی بر تأثیر ورزش بر آنها، تحقیق حاضر به منظور تعیین اثر یک دوره تمرین هوازی بر پروتئین کلوتو و عوامل التهابی اینترلوکین ۶ و عامل نکروز تومور آلفا در موشهای صحرائی نر انجام شد.

مواد و روش بررسی: تحقیق به روش تجربی انجام گرفت. برای این منظور ۱۲ سر موش صحرائی نر با میانگین وزن 25.0 ± 9 گرم و سن ۸ هفته انتخاب و به دو گروه کنترل ($N=6$) و آزمایشی ($N=6$) تقسیم شدند. گروه آزمایشی به مدت ۸ هفته و ۳ جلسه در هفته به تمرین هوازی روی تردمیل پرداختند. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، موشهای هر دو گروه به روش اخلاقی کشتار و بافت کلیه آنها استخراج شد. سپس پروتئین‌های کلوتو، $IL-6$ و $TNF-\alpha$ بافت کلیه به روش وسترن بلات اندازه گیری و شمارش شدند.

یافته‌ها: پروتئین کلوتو ($P < 0.05$) در گروه موش‌های تمرین کرده افزایش معناداری نسبت به گروه کنترل نشان داد. پروتئین $IL-6$ ($P < 0.05$) نیز در گروه موشهای تمرین کرده کاهش معنی داری را نسبت به گروه کنترل نشان داد. این در حالی بود که مقادیر پروتئین $TNF-\alpha$ اختلاف معنی داری نداشت ($P < 0.042$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که تمرین هوازی می‌تواند موجب افزایش پروتئین کلوتو گردد، از سویی می‌تواند از میزان $IL-6$ ترشحی بافت کلیه نیز بکاهد. بنابراین می‌توان گفت احتمالاً تمرین هوازی می‌تواند علائم کهنسالی را به تأخیر انداخته و واکنش التهابی را کاهش دهد.

واژگان کلیدی: تمرین هوازی، کلوتو، اینترلوکین ۶، عامل نکروز تومور آلف

* نویسنده مسئول: حجت الله نیکبخت

پست الکترونیک: hojnik1937@yahoo.com

مقدمه:

سطوح mRNA و پروتئین به میزان زیادی در کلیه بیماران مبتلا به نقص مزمن کلیوی کاهش می‌یابد، و تجمع کلوتو در مایع مغزی نخاعی در بزرگسالان پیر مبتلا به آلزایمر نسبت به افراد همسن با عملکرد شناختی طبیعی کمتر است. در مجموع، این اطلاعات نشان می‌دهد کاهش کلوتو مرتبط با سن ممکن است در پیشرفت اختلال مغزی و کلیوی مرتبط با پیری از راه القاء فشار اکسایشی و التهاب در محور کلیوی مغزی درگیر باشد (۵، ۶).

با توجه به اینکه تحقیقات مختلف آثار تأخیری کلوتو بر پیری و همچنین ارتباط آن با التهاب را گزارش کرده‌اند، و از سویی فعالیت‌های ورزشی نیز با عوامل التهابی ارتباطی دوسویه دارند، بررسی تأثیر فعالیت ورزشی بر پروتئین کلوتو از جنبه آثار پیشگیری کننده آن بر روند کهنسالی و همچنین بررسی ارتباط فعالیت ورزشی، کلوتو و عوامل التهابی هدف پژوهش حاضر می‌باشد.

مواد و روشها:

تحقیق به روش تجربی انجام گرفت. تعداد ۱۲ سر موش صحرایی نر ۸ هفته‌ای با میانگین وزن 25.0 ± 0.9 گرم هفته از مرکز علوم حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران، کرج تهیه شدند و پس از انتقال به محیط آزمایشگاه و آشنایی با محیط جدید و نحوه فعالیت روی نوارگردان مورد آزمون قرار گرفتند.

موش‌های مورد آزمایش در این پژوهش در دوره‌ی ۸ هفته‌ای، به صورت انفرادی در قفس‌های پلی کربنات شفاف $15 \times 15 \times 20$ سانتی متر و در محیطی با دمای 22 ± 2 درجه‌ی سانتی گراد و چرخه‌ی روشنایی به تاریکی $12:12$ ساعت و رطوبت 50 ± 5 درصد نگهداری شدند.

تغذیه موش‌های صحرایی به صورت پلت که حاوی ترکیب مشخصی از انواع مواد مغذی مورد نیاز حیوان است، انجام شد. غذای آزمودنی‌های این پژوهش، بر اساس وزن کشی هفتگی با ترازوی استاندارد ویژه و با توجه به جیره‌ی طبیعی ۱۰ گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن در روز، غذا در هر قفس گذاشته شد. در همه‌ی مراحل پژوهش، آب مورد نیاز هر حیوان به صورت آزاد در بطری ویژه‌ی حیوانات آزمایشگاهی در اختیار آنها قرار داده شد (۷).

قبل از اجرای پروتکل تمرینی، ابتدا تمرینات آشناسازی گروه تمرین هوازی شامل راه رفتن و دویدن روی نوارگردان مخصوص حیوانات آزمایشگاهی (ساخت شرکت پیشرو اندیشه صنعت- مدل آذرخش)، با سرعت ۱۶ متر در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه یا تا هنگام رسیدن به سطح پایدار اکسیژن مصرفی انجام پذیرفت (۸).

پس از آشناسازی موش‌ها با دویدن روی نوارگردان، برنامه تمرینات هوازی شروع شد. تمرین هوازی فزاینده (دویدن روی نوارگردان) به مدت ۸ هفته و هفته ای ۳ جلسه ۲۷ الی ۳۲ دقیقه و با شدت ۶۰ تا ۸۰ درصد حجم اکسیژن مصرفی بیشینه (VO_2max) (سرعت ۸ تا ۲۵ متر در دقیقه) و بدون شیب انجام شد (۹). تمرینات هر جلسه شامل سه دقیقه گرم کردن با سرعت ۸ متر در دقیقه بود و سپس سه دقیقه دویدن با سرعت ۱۶ متر

کلوتو ژنی است که با ساخت پروتئین همنام، کارکردهای مختلفی را به عهده دارد. این ژن در سال ۱۹۹۷ به صورت تصادفی توسط کورو و همکاران وی کشف و به نام الهه عمر در یونان باستان نام‌گذاری شد. حذف این ژن در موش‌ها، باعث ایجاد تظاهرات مشابه فرایند افزایش سن مانند کلسیفیکاسیون عروق و تغییرات متابولیسم کلسیم-فسفات و همچنین کاهش طول زندگی آنها شد. در پژوهش‌های مختلف صورت گرفته بر روی این پروتئین، کاهش آن در موارد زیر مشخص شده است: افزایش سن، دیابت، بیماری پرفشاری خون، نارسایی مزمن کلیوی، ایسکمی کلیه و بیماری گلوومونفریت (۱).

سایتوکاین‌ها نیز یکی دیگر از عوامل مؤثر در پیری می‌باشند. سایتوکاین‌ها گروهی از پروتئین‌ها هستند که نقش اصلی را در پاسخ‌های التهابی به محرک‌های پاتولوژیک مانند التهاب و آسیب بافتی ایفا می‌کنند. تولید سایتوکاین‌ها به وسیله دامنه‌ای از محرک‌های فیزیولوژیک مانند ورزش تنظیم می‌شود. سایتوکاین‌هایی مانند اینترلوکین ۶ (IL-6)، عامل نکروز کننده‌ی توموری (TNF- α) و اینترلوکین ۱۵ به هنگام ورزش بیشترین اثر را بر توده‌ی عضلانی دارد (۲).

از سویی یک رابطه‌ی دو طرفه بین کلوتو و التهاب وجود دارد. التهاب سیستمیک و موضعی (هر دو) می‌تواند بیان ژن کلوتوی کلیه را کاهش دهد. بنابراین بیان ژن کلوتوی کلیه در استرس التهابی حاد با واسطه‌ی لیپوپولی‌ساکارید به طور منفی تنظیم می‌شود (۳). کلوتوی کلیه در موش‌ها، با اشکال مختلف بیماری التهابی روده و عامل نکروز توموری آلفا سرکوب و مهار می‌گردد. علاوه بر این کلوتوی کلیه، در آسیب‌های کلیوی حاد و مزمن از راه التهاب کلیوی کاهش می‌یابد. ایسکمی ناشی از آسیب کلیوی و آلومینوری نیز باعث کاهش میزان کلوتو در پلاسما و ادرار می‌گردد (۳). همچنین، به تازگی القاء کننده ضعیف آپوپتوزی شبه TNF (TWEAK) به عنوان یک میانجی التهابی توبولی کلیوی از راه تعامل با گیرنده Fn14 (Fibroblast growth factor-inducible 14) شناخته شده است. در طی آسیب کلیوی TWEAK ممکن است نقش افزوده‌ای شامل فعال‌سازی غیر کانونی NFkB و در نتیجه بیان CCL2 (Chemokine) 21 ligand (C-C motif) داشته باشد، البته نه در اشتراک با TNF. TWAEK و TNF (هر دو) می‌توانند آسیب سلولی توبولی و نکروز را افزایش دهند. به علاوه TNF و TWEAK میانجی‌های التهابی و آترواسکلوروز هستند که یکی از عوامل کلیدی در بیماران مبتلا به CKD می‌باشد، و میزان بالایی از مرگ و میر را به همراه دارد (۴).

تحقیقات اخیر نگرش جدیدی نسبت به تغییرات پاتوفیزیولوژی در محور مغز-کلیه در فرایند کهنسالی با نقش حیاتی فشار اکسایشی و التهاب مرتبط با کهنسالی فراهم کرده است. بسیاری از پژوهشگران پیشنهاد کرده‌اند اثر ضد پیری پروتئین کلوتو با عملکرد ضد اکسایشی آن، از راه افزایش بیان عوامل FOXO و عامل هسته‌ای اریتروتیوید ۲ مرتبط با فاکتور ۲ و اثر ضد التهابی آن از راه معنات فعالیت عامل التهابی RIG-I به واسطه NFkB و AP-1 مرتبط است. نتایج کارآزمایی بالینی نشان داد بیان کلوتو در

هفته	سرعت (متر بر دقیقه)	مدت (دقیقه)	درصد شیب
اول	۱۰	۱۰	صفر
دوم	۱۲	۱۵	صفر
سوم	۱۴	۲۰	صفر
چهارم	۱۶	۲۵	صفر
پنجم	۱۸	۳۰	صفر
ششم	۲۰	۳۵	صفر
هفتم	۲۲	۴۰	صفر
هشتم	۲۴-۲۵	۴۵	صفر

کلیه محاسبات به کمک رایانه و با استفاده از نرم افزار SPSS 16 انجام گرفت.

یافته‌ها:

تعداد ۱۲ نمونه و در هر گروه ۶ نمونه انجام گرفت. میزان شاخص‌ها بر حسب گروه‌ها در جدول شماره یک ارائه گردیده است و نشان می‌دهد که به دنبال ۸ هفته تمرین هوازی، پروتئین کلوتو در موش‌های تمرین کرده افزایش معناداری ($P < 0.05$) دارد، در حالی که تغییر معناداری در این پروتئین در گروه کنترل مشاهده نگردید. همچنین کاهش معناداری در پروتئین IL-6 ($P < 0.05$) در موش‌های تمرین کرده در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. این در حالی بود که در مقایسه با گروه کنترل، پروتئین TNF- α ($P < 0.05$) در گروه تمرین کرده اختلاف معناداری نداشت. میزان همبستگی معناداری نیز بین سه متغیر وابسته در جدول شماره ۳ ارائه شده است. مشاهده نشد.

بحث:

این تحقیق افزایش معنی‌داری در پروتئین کلوتو و کاهش معنی‌دار پروتئین IL-6 و عدم تفاوت مقادیر پروتئینی TNF α را نشان داد. از سویی بین تغییرات پروتئین کلوتو و عوامل التهابی نیز همبستگی معناداری مشاهده نشد.

نتایج تحقیق حاضر در خصوص تغییرات پروتئین کلوتو با بیشتر یافته‌های قبلی هم‌خوانی داشت (۱۱-۱۳، ۱۷، ۱۹، ۲۱ و ۳۹) ولی ساز و کار این تغییرات هنوز به خوبی روشن نشده است.

در مطالعه‌ای که کلوتوی گردشی در گروه افراد تمرین کرده‌ی مبتلا به CAD (Coronary artery disease) در برابر مبتلایان به CAD تمرین نکرده و هم‌تایان سالم خود، به طور معناداری بیشتر بود (۳۹). در تحقیق دیگری نیز مستفیدی و همکاران (۲۰۱۶) بر روی ورزشکاران جوان فوتبالیست انجام دادند، افزایش معنادار پروتئین کلوتو سرمی را در افراد ورزشکار در مقایسه با افراد سالم غیر ورزشکار مشاهده نمودند (۱۱).

در تحقیق دیگری سمبا و همکاران (۲۰۱۲) ۱۲۷۰ آزمودنی ۶۵ سال به بالا مورد آزمون قرار گرفتند و افراد با کلوتوی پلاسما کم‌تر دارای قدرت میچ کمتری بودند. این یافته‌ها با سارکوپنی که در مدل موشهای کلوتو مشاهده شد هم‌خوانی دارد. اگرچه نمی‌توان کلوتوی پلاسما را به عنوان یک عامل پیش بین مستقل در مورد کاهش قدرت دانست ولیکن یک رقیب قوی خطر مرگ و میر می باشد. مشارکت کنندگان با غلظت پائین کلوتو در معرض خطر مرگ و میر بالاتری بودند (۱۷).

تحقیق حاضر با تحقیق کراسو و همکاران (۲۰۱۱) نیز هم‌خوانی داشت که طی آن مشاهده گردید مقادیر کلوتو پلاسما در افراد سالخورده با شیوع ناتوانی در فعالیتهای روزانه ارتباط معکوس و معناداری دارد (۱۳). مکانیسم احتمالی که کلوتو می‌تواند بر خطر ناتوانی اثرگذار باشد، اثر فقدان کلوتو بر عضله اسکلتی است. موشهای ترانسژنیک فاقد ژن کلوتو به‌طور شاخصی آتروفی عضلانی را نشان داده‌اند. قطر میوفیبرها در موشهای کلوتو ۲۰ تا ۳۰ درصد نسبت به موشهای وحشی کمتر بود. در عضلات اسکلتی مقادیر SOD2RNA (Sod2 Superoxide dismutase 2) و پروتئین آن با

دقیقه، و در ادامه هر دقیقه دو متر به سرعت اضافه گردید تا به فلات برسد و در طول ۸ هفته نیز به تدریج سرعت و مدت زمان دویدن موش‌ها روی نوارگردان اضافه گردید تا به سقف ۲۵ متر در دقیقه برسند. در انتهای هر جلسه تمرینی، پس از سرد کردن، موش‌ها از روی نوارگردان برداشته شدند (۸).

موش‌های صحرایی ۴۸ ساعت پس از اتمام آخرین جلسه تمرین، در حالی که سیر بودند (۴ ساعت قبل از کشته شدن غذا از قفس برداشته، اما به آب دسترسی داشتند) با تزریق داخل صفاقی ترکیبی از ماده بیهوشی کتامین (۵۰-۳۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و زایلازین (۵-۳ میلی-گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن بیهوش و کشته شدند و بافت کلیه آنها پس از انجماد سریع به کم نیتروژن مایع، در دمای ۵۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. عصاره ی پروتئین از بافت کلیه‌ی موش به‌وسیله‌ی هموژنایزر مکانیکی در بافر (Tris-HCL 100Mm, NaCL 300Mm, NPHO 2%، SDS 2% و دئوکسی کولین اسید ۱٪) با کوکتل مهار کننده‌ی پروتئاز (NAVO2 2Mm و NaF 10Mm) انجام پذیرفت. عصاره‌ی پروتئین‌ها با تکنیک الکتروفورز (ژل SDS-PAG، پلی آکریلامید-سدیم دو دسیل سولفات) و انتقال غشای اینتروسولوز جدا سازی گردید. ارزیابی برادفورد (Bio Rad) نیز برای تعیین غلظت پروتئین‌ها به کار رفت (۱۰).

از آزمون کولموگروف اسمیرنوف برای تعیین طبیعی بودن توزیع داده‌ها استفاده گردید. همچنین بر اساس نتایج حاصل و با توجه به پارامتریک بودن داده‌ها از آزمون تی مستقل به منظور مقایسه میزان پروتئینهای کلوتو، IL-6 و TNF- α در موش‌های تمرین کرده استقامتی و موش‌های گروه کنترل استفاده شد. به منظور بررسی همبستگی میان تغییرات پروتئین کلوتو با پروتئینهای IL-6 و TNF- α نیز از ضریب همبستگی پیرسون استفاده شد.

جدول ۲. نتایج آنالیز آماری به روش تی همبسته مربوط به متغیرهای تحقیق.

گروهها شاخصها	کلوتو	IL6	TNF- α
کنترل (N1=6)	۱.۰۰۰±۰.۰	۱.۰۰۰±۰.۰	۱.۰۰۰±۰.۰
آزمایش (N2=6)	۰.۷۵۲±۱.۴۶۹	۰.۴۴۷±۰.۰۹۸	۰.۹۶۳±۰.۰۶۲

جدول ۳. میزان همبستگی میان متغیرهای کلوتو، TNF- α و IL-6.

متغیر	کلوتو	IL-6	TNF- α
کلوتو	۱	-۰.۰۳۶	-۰.۵۰۲
TNF- α	-۰.۵۰۲	۰.۵۶۷	۱
IL-6	-۰.۰۳۶	۱	۰.۵۶۷

واکنش شده و باعث کاهش میل ترکیبی لیگاند درونزای TGF- β 1 می‌گردد (۲۲).

بیشتر تحقیقات بیان‌گر آن است که تمرینات استقامتی منجر به افزایش TGF- β 1 به ویژه در عضلات اسکلتی و قلبی می‌گردد (۱۸) لذا افزایش هم‌زمان TGF- β 1 و پروتئین کلوتو به دنبال تمرینات استقامتی از سویی و اثر بازدارنده کلوتو بر پیام‌رسانی TGF- β 1 از سویی دیگر با یکدیگر متناقض بوده و نیازمند بررسی بیشتر اثر این دو بر یکدیگر می‌باشد.

هم‌چنین نشان داده شده است کلوتو به‌طور مستقیم به اعضای مختلف خانواده Wnt در سلولهای روده کوچک و فولیکولهای موی موشها متصل و مانع فعالیت آنها می‌شود (۲۰). پروتئینهای خانواده Wnt همانند TGF- β 1 در افزایش فیبروز عضلانی ناشی از کهنسالی نقش دارند (۲۱). کلوتو با هدف قرار دادن مسیرهای پیام‌رسانی Wnt و TGF- β 1 قادر به کاهش فیبروز کلیوی پس از انسداد حالب (پیشابراه) می‌باشد (۲۲) و به عنوان یک درمان پیشنهادی برای کاهش فیبروز طی بیماری مزمن کلیوی مطرح شده است (۲۵) با تعمیم اثر آنتی فیبروتیک کلوتو به بافت عضلانی، پروتئین کلوتو به عنوان یک کاندیدای جالب توجه برای کاهش توده عضلانی وایسته به سن مطرح می‌گردد (۲۱).

تحقیق ماسوسورا و همکاران (۲۰۱۴) نیز در خصوص تاثیر تمرینات هوازی بر سطوح کلوتو پلازما و سختی شریانی، نتایجی مشابه با تحقیق حاضر را به همراه داشت. به دنبال یک دوره تمرین هوازی در زنان یائسه ۵۰ تا ۷۶ ساله مقادیر کلوتو پلازما افزایش و سختی شریانی به عنوان یک عامل خطرزای قلبی عروقی و سالخوردگی کاهش یافت (۲۷). در موش‌ها کلوتو ترشحی از کلیه، مانع پیام‌رسانی TGF- β 1 می‌شود که فشار اکسایشی و بازآرائی را القاء می‌کند. بنابراین این یافته‌ها نشان می‌دهد که کلوتو به عنوان یک عامل هورمونی که حفاظت عروقی را افزایش می‌دهد، عمل می‌کند. گزارش شده است که اختلال عملکرد در التهاب، فشار اکسایشی عروقی، کلسیفه شدن عروقی و بازآرائی ناشی از سختی شریانی، افزایش می‌یابد. هم‌چنین نشان داده شده است CKD منجر به کاهش مقادیر کلوتو گردشی و افزایش سختی شریانی می‌گردد. در مطالعات مقطعی همبستگی بین مقادیر غلظت کلوتو پلازما و سختی شریانی مشاهده شده است. در مجموع این یافته‌ها نشان می‌دهد که کلوتوی درون‌زا ممکن است از طریق

مقادیر پروتئین در موشهای تواریخته (بیان، پیش از حد کلوتو) گونه‌های نتیجه‌ای وحشی و جهش یافته کلوتو همبستگی دارد. مطالعات اخیر نشان داده است که در مقایسه با گونه‌های وحشی موش‌ها، مسیر لیزوزومی- اتوفازی در موشهای جهش یافته کلوتو فعال‌تر است. در مقایسه با موش‌های گونه وحشی، در عضلات اسکلتی موشهای فاقد کلوتو سه برابر بیان بیشتر گیرنده پروتئین γ -آمینو بوتیرات نوع A- پروتئینی که با فعال سازی مسیر اتوفازی (لیزوزومی همراه است) مشاهده شد. سرکوب فشار اکسایشی در عضله اسکلتی از طریق ممانعت مسیر پیام‌رسانی انسولین/IGF-1 و فعال سازی مسیر اتوفازی- لیزوزومی دو مسیر بیولوژیکی هستند که کلوتو در پاتوژنز سارکوپنی به کار می‌گیرد (۱۴). در مسیر اتوفازی- لیزوزومی، ماکرومولکولها و ارگانلها در اتوفازوزوم جذب شده و پس از تغییر در لیزوزوم دچار تجزیه لیزوزومی بعدی می‌گردد. در مسیر یوبی کوئیتین پروتوزوم، پروتئینها با یوبی کوئیتین‌های چندگانه آمیخته شده و سپس در کمپلکس پروتوزومی تجزیه می‌شوند. پیام‌رسانی انسولین/IGF-1 هر دو مسیر را از طریق پروتئین کیناز B و FOXO (Forkhead box O3) در عضلات اسکلتی تنظیم می‌کند. اعتقاد بر این است که کلوتو گردشی پلازما مسیر پیام‌رسانی انسولین/IGF-1 را تنظیم می‌کند، گرچه ساز و کار بیولوژیک آن باید شناخته شود (۱۴). کلوتو هم‌چنین اثر چند بُعدی بر استئوپروز، بیماریهای قلبی عروقی و شناخت دارد (۱۹).

پروتئین ترشحی کلوتو به‌طور مستقیم مانع فعالیت عامل پیش فیبروزی TGF- β 1 و مسیر Wnt در بافت کلیوی می‌گردد (مسیر پیام‌رسانی Wnt در تعیین سرنوشت سلولی، مهاجرت سلولی، قطبیت سلولی، الگوهای عصبی و اندام‌زایی در طول دوره جنینی نقش اساسی بر عهده دارد) (۲۳) و می‌تواند به‌طور بالقوه دارای نقش مشابه در بافت عضله باشد. این نقش کلوتو را به عنوان تنظیم کننده فیبروز عضلانی در ارتباط با افزایش سن، معرفی می‌نماید. TGF- β 1 نه تنها تنظیم کننده فیبروز بافتی است، بلکه به نظر می‌رسد مانع فعالیت سلول‌های ماهواره‌ای و تمایز سلول‌های میوبلاست باشد. شواهد بیانگر آنست که عضلات مسن حاوی مقادیر بالاتر TGF- β 1 بوده و ممانعت از پیام‌رسانی TGF- β 1 بازسازی عضلات را افزایش می‌دهد. شکل ترشحی کلوتو مستقیماً با گیرنده‌های نوع II TGF- β 1 وارد

تمرین همزمان، تفاوت معنی‌داری در مقادیر $TNF-\alpha$ ، $IL-6$ و CRP نسبت به گروه کنترل مشاهده نکردند (۳۵). با توجه به اینکه تمرینات هوازی در این تحقیق ۱۶ هفته به طول انجامید، تفاوت در پروتکل تمرینی ممکن است بیانگر تفاوت یافته‌ها در این تحقیق با تحقیق حاضر باشد. گرچه این مغایرت در مورد $IL-6$ دیده شد و نتایج مربوط به $TNF-\alpha$ در دو تحقیق همخوانی داشت.

مقرنسی و همکاران تغییرات ناشی دو نوع تمرین مقاومتی و هوازی را بر برخی از سایتوکاین‌های پیش التهابی شامل $ICAM-1$ ، $TNF-\alpha$ و $IL-1$ در موش‌های صحرایی نر را مورد بررسی قرار دادند و پس از ۲۴ هفته تمرین هوازی کاهش معنی‌داری در هیچ یک از متغیرها مشاهده نکردند. در حالی که پس از ۳۶ هفته تمرین هوازی هر سه متغیر تغییرات کاهشی معنی‌داری را نشان دادند (۳۶).

از سوی دیگر تحقیق حاضر همبستگی معناداری بین تغییرات پروتئین کلوتو و عوامل التهابی $IL-6$ و $TNF-\alpha$ نیافت، که با بیشتر تحقیقات انجام شده در این زمینه مغایر بود. تحقیقاتی که ارتباط معناداری بین این کلوتو و عوامل التهابی را گزارش کردند، مسیرهای پیام‌رسانی متفاوتی را بررسی نمودند که به برخی از آنها می‌پردازیم.

اخیراً معلوم شده است کلوتو، غالباً به واسطه‌ی تعدیل فشار اکسایشی میتوکندریایی و آپوپتوز، تأثیر حفاظتی بر کلیه دارد. ژائو و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه‌ای کاهش معنادار $mRNA$ و همچنین پروتئین کلوتوی کلیه را در موش‌های دیابتی در مقایسه با گروه‌های کنترل بر اساس جنس و سن نشان دادند که با گزارش‌های اخیر در مورد کاهش مشابه کلوتوی کلیه موش‌های دیابتی شده با القاء استرپتوزوتوکسین هم‌خوانی داشت. همچنین، کاهش کلوتو به دلیل دو رویکرد فارماکولوژیک برای تضعیف شدت هایپرگلیسمی (انسولین و فلوریزیدین) بر مقادیر کلوتوی بازسازی شده با هایپرگلیسمی مرتبط است. در این مطالعه نقش جدیدی نیز برای کلوتو به عنوان تنظیم‌کننده عامل هسته‌ای کاپا بی ($NF-\kappa B$) در مسیر فعال‌سازی غیر کانونی ویژه شامل فسفوریلاسیون $RelA$ (Serine) گزارش شد. این نتایج پیشنهاد می‌کند کلوتو نه تنها باعث مقاومت نسبت به فشار اکسایشی می‌شود بلکه می‌تواند در برابر فعال‌سازی نابجای مسیر فعال‌سازی $NF-\kappa B$ نقش محافظتی داشته باشد. به این دلیل موش‌های فاقد کلوتو افزایش فنوتیپ کهنسالی را نشان دادند. لذا کلوتو علاوه بر ایجاد مقاومت نسبت به فشار اکسایشی، کارکرد ضد التهابی نیز دارد (۳۷). شواهد نشان می‌دهند فعال‌سازی $RelA$ برای سرکوب کلوتو، القاء شده توسط $TNF-\alpha$ و $TWEAK$ از راه‌های زیر ضروری است:

گزارش شده است که کلوتو ترشچی مانع پیام‌رسانی $TGF-\beta 1$ در کلیه می‌شود (۲۲). به علاوه کلوتوی مغز، تولید اندوتلین-۱ ($ET-1$) را افزایش می‌دهد. $TGF-\beta 1$ و $ET-1$ تحت تأثیر فعالیت ورزشی هستند (۲۲، ۳۶). افزایش ناشی از تمرین کلوتو، می‌تواند تولید $TGF-\beta 1$ و $ET-1$ را افزایش دهد. به علاوه مطالعات مختلفی پیشنهاد نموده‌اند که ساز و کار مربوط به سختی شریانی ناشی از فعالیت ورزشی به واسطه بهبود عملکرد اندوتلیالی، سرکوب فشار اکسایشی و التهاب، تنظیم می‌شود. کلوتو تحت تأثیر شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک، هم در رونویسی و هم در سطوح پس از رونویسی

ارتقاء عملکرد اندوتلیالی و سرکوب التهاب، فشار اکسایشی، کلسیفه شدن و بازآرایی در تنظیم سختی شریانی مؤثر باشد (۲۷).

بررسی در مورد تغییرات حاد عوامل التهابی به طور گسترده‌ای انجام شده و قریب به اتفاق این تحقیقات افزایش عوامل التهابی در حین ورزش و بلافاصله پس از ورزش را گزارش کرده‌اند (۲۹-۳۵) که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر تفاوتی نداشت. همچنین نتایج در خصوص سازگاری‌های مزمن واکنش التهابی ناشی از فعالیت هوازی متفاوت است. به طور مثال، ترتیبیان و همکاران (۱۳۹۰) اثر تمرین هوازی و مکمل مولتی‌ویتامین بر شاخص‌های التهابی بیماری‌های قلبی عروقی را بررسی نمودند. در این تحقیق ۳۰ زن چاق غیر ورزشکار ۳۵ تا ۵۰ ساله در سه گروه کنترل، تمرین هوازی و تمرین هوازی همراه با مصرف مکمل مولتی‌ویتامین با یکدیگر مقایسه شدند. در پایان دوره تمرین هوازی که ۹ هفته به طول انجامید، مقادیر $TNF-\alpha$ در پلاسما زنان گروه تمرین هوازی به طور معناداری کاهش یافت (۳۱) که با نتایج تحقیق حاضر مغایرت داشت. تفاوت میان آزمودنی‌های تحقیق فوق و همچنین تفاوت در پروتکل تمرینی با تحقیق حاضر از دلایل احتمالی این مغایرت می‌باشد. همچنین در بررسی تأثیر یک دوره تمرین هوازی به مدت دو ماه، بر میزان لپتین، $TNF-\alpha$ و $IL-6$ در ۳۷ دانشجوی مرد غیر ورزشکار (۱۸ نفر گروه چاق و ۱۹ نفر گروه لاغر) مقادیر $TNF-\alpha$ در گروه چاق افزایش غیر معنی‌دار و در گروه لاغر کاهش معنی‌داری را نشان داد. مقادیر $IL-6$ نیز در کلیه گروه‌ها، بدون تغییرات معنی‌دار بود (۳۰). به نظر می‌رسد متغیر شاخص توده بدن که بیانگر وضعیت افراد از لحاظ تناسب قد و وزن می‌باشد از عوامل تأثیر گذار بر عوامل التهابی باشد. در پژوهشی که توسط عابدی و همکاران (۱۳۹۲) انجام شد اثر ۱۲ هفته تمرین ترکیبی (هوازی-مقاومتی) بر پروتئین واکنشگر C (CRP) سرمی و $IL-6$ پلاسما در مردان غیرفعال مورد بررسی قرار گرفت، سطوح CRP و نسبت دور کمر به دور لگن در گروه تمرینی به طور معناداری پایینتر بود، در حالی که سطوح $IL-6$ ، شاخص توده بدن و وزن بدون تغییر باقی ماند (۳۳). به نظر می‌رسد با توجه به اینکه آزمودنی‌ها تمرینات هوازی و مقاومتی را به صورت ترکیبی انجام دادند، تمرینات مقاومتی مانع از کاهش سطوح $IL-6$ پلاسما گردیده است. در مطالعه فیروز سلطانی و همکاران (۱۳۹۲) در مورد تأثیر هشت هفته فعالیت هوازی بر میزان ویسفاتین، $IL-6$ و $TNF-\alpha$ در موش‌های ماده نژاد اسپراگوداولی، پروتئین‌های ویسفاتین و $IL-6$ به دنبال یک دوره هشت هفته‌ای تمرین هوازی کاهش معناداری داشته ولیکن در مقادیر $TNF-\alpha$ تغییر معناداری مشاهده نشد (۳۴) که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت و می‌توان آن را به مشابه بودن شدت و مدت تمرین و همچنین استفاده از آزمودنی‌های مشابه در هر دو تحقیق نسبت داد. نکته حائز اهمیت آنکه $TNF-\alpha$ یکی از محرک‌های افزایش $IL-6$ می‌باشد (۳۵)، لذا کاهش مقادیر $IL-6$ علیرغم عدم تغییر در $TNF-\alpha$ بیانگر آن است که ساز و کار دیگری در تغییرات $IL-6$ دخیل بوده که نیازمند بررسی مسیرهای پیام‌رسانی مرتبط با تغییرات این دو پروتئین می‌باشد. لیباردی و همکاران (۲۰۱۲) با بررسی تأثیر سه نوع تمرین استقامتی، مقاومتی و همزمان (کانکارت) بر $TNF-\alpha$ ، $IL-6$ و CRP در هیچ یک از گروه‌های تمرین مقاومتی، تمرین استقامتی و

می‌گردد. هم‌چنین در این تحقیق مشاهده شد بیان بیش از حد کلتوتو تولید $TNF-\alpha$ ناشی از IL-6 را کاهش می‌دهد (۴۰).

بیشتر تحقیقات تغییرات کاهش پروتئین‌های IL-6 و $TNF-\alpha$ ناشی از تمرینات هوازی نشان داده اند که بیانگر سازگاری مثبت نسبت به بروز التهاب در ورزشکاران رشته‌های استقامتی و هوازی می‌باشد، گرچه در مواردی نیز عدم تغییر این پروتئین‌ها مشاهده شده است (۳۰، ۳۱).

لذا با توجه به نتایج تحقیق حاضر و دیگر تحقیقات همسو می‌توان نتیجه گیری نمود که تمرینات هوازی احتمالاً می‌تواند باعث افزایش کلتوتو و کاهش عوامل التهابی به ویژه IL-6 می‌گردد.

هم‌چنین علیرغم دامنه‌ی قابل توجه تحقیقات بر کلتوتو و نقش ضد التهابی آن، غالب تحقیقات بر کلتوتوی ترشحی متمرکز بوده و لازم است تحقیقات بیشتری روی کلتوتوی غشائی نیز انجام پذیرد.

تشکر و قدردانی:

این مقاله برگرفته از رساله آقای اکبر معین، دانش‌آموخته دکترای تربیت بدنی - فیزیولوژی ورزشی دانشگاه آزاد اسلامی تهران - واحد علوم و تحقیقات است. از جناب آقای دکتر محمدرضا اردلان که ایده نگارش این رساله با راهنمایی ایشان شکل گرفت و سرکار خانم دکتر پوران کریمی که در آنالیز داده‌ها نهایت همکاری را داشتند، کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

منابع:

- Maltese, G., Karalliedde, J. The Putative Role of the Anti ageing Protein Klotho in Cardiovascular and Renal Disease, *International Journal of Hypertension* 2012; Article ID 757469, 5 pages.
- Agha Alinejad, H., Molanori Shamsi M. Exercise Induced Release of Cytokines From Skeletal Muscle: Emphasis on IL-6. *Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism* 2010; 12(2): 181-190.
- Izquierdo M C, Perez-Gomez M V, Sanchez-Nino M D, Sanz A B, Ruiz Andres O, Poveda J, et al. Klotho, phosphate and inflammation/ageing in chronic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2012; 27: 6-10.
- Moreno JA, Izquierdo MC, Maria D. Sanchez-NiNo M D, Alvarez B S, Larrea C L, Et al. The Inflammatory Cytokines TWEAK and $TNF\alpha$ Reduce Renal Klotho Expression through NF κ B. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22(7): 1315-1325.
- Zeng Y, Wang PH, Zhang M, Du JR. Aging-related renal injury and inflammation are associated with downregulation of Klotho and induction of RIG-I/NF- κ B signaling pathway in senescence-accelerated mice. *Aging Clin Exp Res* 2016; 28(1): 69-76.
- Liu F, Wu S, Ren H, Gu J. Klotho suppresses RIG-I-mediated senescence-associated inflammation. *Nat Cell Biol* 2011; 13(3): 254-262.
- Choobineh, S., Dabidi Roshan, V. The effect of endurance training on some indices of homeostasis and

قرار می‌گیرد. نشان داده شده است که γ -PPAR (گیرنده فعال تکثیر کننده پراکسیزومی) به عنوان یک عامل رونویسی درگیر در آدیپوژنز، هموستاز گلوکز و التهاب، باعث افزایش mRNA کلتوتو و بیان پروتئین کلتوتو می‌گردد. آنژیوتانسین II باعث کاهش مقادیر mRNA کلتوتو و بیان پروتئین کلتوتو در کلیه می‌گردد و مسدود نمودن گیرنده نوع I آنژیوتانسین II (AT1R) کلتوتو گردشی در انسان را افزایش می‌دهد. فشار اکسایشی نیز مقادیر mRNA کلتوتو و بیان پروتئین را در لوله‌های کلیه موش کاهش می‌دهد و رادیکال‌های روبنده (scavenger) باعث افزایش mRNA کلتوتو و بیان پروتئین کلتوتو می‌شود. به علاوه مطالعات قبلی، پیشنهاد نموده‌اند که فعالیت‌های ورزشی γ -PPAR را افزایش داده و AT1R و فشار اکسایشی را کاهش می‌دهند. بنابراین فعالیت‌های ورزشی ممکن است کلتوتو را از طریق افزایش γ -PPAR و کاهش AT1R افزایش دهد (۲۴). از سوی دیگر کلتوتو با سرکوب RIG-I (retinoic-acid-inducible gene-I) که میانجی فعال سازی IL-6 و NF κ B است، بر التهاب ناشی از RIG-I تأثیر می‌گذارد (۳۸). در تحقیق دیگری که توسط ژیا و همکاران (۲۰۱۶) انجام شد، نشان داده شد پراواستاتین (pravastatin) که به عنوان یکی از داروهای کاهش دهنده کلسترول برای کاهش خطر بیماری‌های عروقی استفاده می‌شود، باعث افزایش بیان کلتوتو در اندوتلیال ورید انسانی (HUVECs) و از سوی دیگر کاهش بیان IL-6 در HUVECs

blood lipids in elderly female rats. *Research on Sport Science* 2009; 22: 29-43. (Full text in Perisan).

- Gleeson, T., Baldwin, K M. Cardiovascular response to treadmill exercise in untrained rats. *J. Appl. Physiol* 1981; 50: 1206-1211.
- Liu F, Wu S, Ren H, Gu J. Klotho suppresses RIG-I-mediated senescence-associated inflammation. *Nat Cell Biol* 2011; 13(3): 254-262.
- Faramoushi M, Amir Sasan R, Sari Sarraf V, Karimi P. Cardiac fibrosis and down regulation of GLUT4 in experimental diabetic cardiomyopathy are ameliorated by chronic exposures to intermittent altitude. *Journal of Cardiovascular and Thoracic Research* 2016; 8(1): 26-33.
- Mostafidi, E, Moeen A, Nasri H, Ghorbani Hagjo A, Ardalan M. Serum Klotho Levels in Trained Athletes. *Nephro-Urology Monthly*. 2016 8(1), e 30245.
- Foster PP., Rosenblatt KP., Kuljiš RO. Exercise-Induced Cognitive Plasticity, Implications for Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's disease. *Frontiers in Neurology* 2011; 2:28.
- CRASTO CL, SEMBA RD, SUN K, CAPPOLA, AR, Bandinelli S, Ferrucci L. Relationship of low-circulating "anti-aging" klotho hormone with disability in activities of daily living among older community-dwelling adults. *Rejuvenation research* 2012; 15: 295-301.
- YAMAMOTO, M., CLARK, J. D, PASTOR, J. V, GURNANI, P., NANDI, A., KUROSU, H., et al. Regulation of oxidative stress by the anti-aging

- hormone klotho. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280: 38029-38034.
15. Hsieh C-C, Kuro-o M, Rosenblatt KP, Brobey R, Papaconstantinou J. The ASK1-Signalosome regulates p38 MAPK activity in response to levels of endogenous oxidative stress in the Klotho mouse models of aging. *Aging (Albany NY)* 2010; 2(9): 597-611.
16. Reynolds K, Brobey R K, German D, Sonsalla P K, Gurnani P, Pastor J, et al. Klotho Protects Dopaminergic Neuron Oxidant-Induced Degeneration by Modulating ASK1 and p38 MAPK Signaling Pathways. *PLOS ONE* 2015; 10(10): e0139914.
17. 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 In Chianti study. *European journal of applied physiology* 2012; 112(4): 1215-1220.
18. KURO-O M, Phosphate and klotho. *Kidney International* 2011; 79: S20-S23.
19. Semba RD, Cappola A R, Sun K, Bandinelli, S, Dalal M, Crasto C, et al. Plasma klotho and cardiovascular disease in adults. *Journal of the American Geriatrics Society* 2011; 59(9): 1596-1601.
20. Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* 2008; 4(2): 68-75.
21. Phelps M, Pettan-Brewer, C, Ladiges, W, Yablonka-Reuveni, Z. Decline in muscle strength and running endurance in klotho deficient C57BL/6 mice. *Biogerontology* 2013; 14(6): 9447-9452.
22. Czarkowska B, Zendzian M, Bartłomiejczyk 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* 2007; 60(4): 157-162.
23. Cadigan KM, Liu YI. Wnt signaling: complexity at the surface. *J Cell Sci* 2006; 119: 395-402.
24. Andrew S. Brack, Michael J. Conboy, Sudeep Roy, Mark Lee, Calvin J. Kuo, Charles Keller, Thomas A. Rando. Increased Wnt Signaling During Aging Alters Muscle Stem Cell Fate and Increases Fibrosis. *Science* 2007; 807-810.
25. Zhou L, Liu, Y. Wnt/ β -catenin signaling and renin-angiotensin system in chronic kidney disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 2016; 25(2): 100-106.
26. Sanchez-Niño MD, Sanz AB, Ortiz A. Klotho to treat kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2013; 24:687-9.
27. Matsubara T, Miyaki A, Akazawa N, Choi Y, Tanahashi K, Kumagai H, et al. Aerobic exercise training increases plasma Klotho levels and reduces arterial stiffness in postmenopausal women. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2014; 348-355.
28. Cappelli K, Felicetti M, Capomaccio S, Pieramati C, Silvestrelli M, Verini-Supplizi A. Exercise-induced up-regulation of MMP-1 and IL-8 genes in endurance horses. *BMC physiology* 2009; 9-12.
29. Helge JW, Stallknecht B, Pedersen BK, Galbo H, Kiens B and Richter EA. The effect of graded exercise on IL-6 release and glucose uptake in human skeletal muscle. *J Physiol* 2003; 546: 299-305.
30. Steensberg A, Febbraio MA, Osada T, Schjerling P, Van Hall G, Saltin B, et al. Interleukin-6 production in contracting human skeletal muscle is influenced by pre-exercise muscle glycogen content. *J Physiol.* 2001; 537: 633-639.
31. Tartibian B, Godrat-Garebagh Z, Gaeini A, Tolouei-Azar J. Influence of 9-Weeks Aerobic Exercise and Multivitamin Supplement on Inflammation Biomarkers as Cardiovascular Risk Factor in Non-athletic Obese Women. *ZJRMS* 2013; 15 (3): 30-35.
32. Boghrabadi V, Piri M, Sadeghi H, Sankian M. Effects of aerobic training on leptin, tumor necrosis factor- α and interleukin-6 levels in obese and lean men. *koomesh* 2009; 11(1): 33-40. (Full text in Persian).
33. Abedi B. The effects of 12-wk combined aerobic/resistance training on C-reactive protein (CRP) serum and interleukin-6 (IL-6) plasma in sedentary men. *yafte* 2012; 14(4): 95-106. (Full text in Persian).
34. Soltani F, Daryanoosh F, Salesi M, Mohamadi M, Jafari H, Soltani A. The Effect of Eight Weeks of Aerobic Exercises on Visfatin, IL-6 and TNF- α in Female Sprague Dawley Rats. *ZUMS Journal* 2013; 21(89): 30-39. (Full text in Persian).
35. Libardi CA, De Souza GV, Cavaglieri CR, Madruga VA, Chacon-Mikahil MP. Effect of resistance, endurance, and concurrent training on TNF- α , IL-6, and CRP. *Med Sci Sports Exerc* 2010; 44(1): 50-56.
36. Mogharnasi M, Gaeini A, Sheikholeslami V D Comparing the effects of two training methods of aerobic and anaerobic on some pre-inflammatory cytokines in adult male rats. *Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism* 2010; 11; 191-198. (Full text in Persian).
37. Zhao Y, Banerjee S, Dey N, LeJeune W S, Sarkar P S, Brobey R, et al. Klotho Depletion Contributes to Increased Inflammation in Kidney of the db/db Mouse Model of Diabetes via RelA (Serine)536 Phosphorylation. *Diabetes* 2011; 60(7): 1907-1916.
38. Richard D. Semba, Luigi Ferrucci, Kai Sun, Eleanor Simonsick, Randi Turner, Iva Miljkovic, Tamara Harris, Ann V. Schwartz, Keiko Asao, Stephen Kritchevsky, Anne B. Newman, for the Health ABC Study; Low Plasma Klotho Concentrations and Decline of Knee Strength in Older Adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2016; 71(1): 103-108.
39. Saghiv M, Sherve C, Ben-Sira D, Sagiv M, and Goldhammer E, Aerobic Training Effect on Blood S-Klotho Levels in Coronary Artery Disease Patients. *J Clin Exp Cardiol* 2016; 7:8
40. Xia W, Zhang A, Jia Zh, Gu J, and Chen H. Klotho Contributes to Pravastatin Effect on Suppressing IL-6 Production in Endothelial Cells. *Mediators of Inflammation* 2016; 6.