

# Effects of Concurrent Training and Vitamin D Consumption on Sarcopenia and Apoptosis Factors in Aging Male Rats

Samad Safarzadeh Gargari<sup>1\*</sup>, Mohamad Ali Azarbayjani<sup>2</sup>, Safar Safarzadeh Gargari<sup>1</sup>, Bahram Azari Gargari<sup>1</sup>, Sina Iismaili<sup>1</sup>

1. Department of Exercise Physiology, Urmia University, East Azarbayjan, Jolfa, Hadishahr  
2. Department of Sport Physiology, Islamic Azad University, Tehran Markaz

(Received: 2019/04/19

Accept: 2019/07/30)

## Abstract

**Background:** Exercise training and antioxidant consumption is one of the important factors in preventing the sarcopenia and apoptosis in aging muscles. The aim of the present study was to investigate the effects of aerobic exercise and vitamin D supplementation on apoptosis and sarcopenia in aging rats.

**Materials and methods:** In the current experimental study, 50 aging rats (Age: 22-20 month old; Weight: 20±220 g) were randomly divided into five groups of 10 rats: control (C), Salin (S), vitamin D (VD), training (T), and vitamin D + training (VDT). Exercise groups ran on treadmill four days a week for eight weeks with a specific speed and 10% incline and received 0.05 vitamin D injection on a daily basis. BAX, BCL2, follistatin, and myostatin proteins were assessed 24 hr after the last exercise and in anesthetic state on soleus muscle. All data were analyzed using one-way ANOVA and Scheffé at the significance level of  $P < 0.05$ .

**Results:** BAX and myostatin significantly decreased in VDT and T groups compared to control group ( $p = 0.013$  for myostatin and  $P = 0.03$  for BAX in VDT group,  $P = 0.017$  for myostatin and  $P = 0.027$  for BAX in T group). Also, follistatin and BCL2 increased significantly in these groups ( $P = 0.01$  for follistatin and  $P = 0.01$  for BCL2 in VDT group,  $P = 0.005$  for follistatin and  $P = 0.024$  for BCL2 in T group). BAX/BCL2 ratio decreased significantly between groups but no significant difference was observed in myostatin and follistatin ratio between groups ( $P > 0.05$ ).

**Conclusion:** It seems that eight concurrent aerobic training sessions can decrease apoptosis factors such as BAX and BCL2 and sarcopenia consisting of myostatin and follistatin variables in rat muscles and provided that these training be accompanied by vitamin D consumption, it may result in prevention of muscle apoptosis and sarcopenia in aging rats.

**Keywords:** Cell death; Sarcopenia; Aerobic training; Vitamin D

\* Corresponding author: Samad Safarzadeh Gargari

E-mail: safarzadeh.gargari@yahoo.com

# تاثیر تمرین‌های تداومی همراه با مصرف مکمل ویتامین D بر عوامل سارکوپنی

## و آپوپتوزی رت‌های سالمند

صمد صفرزاده‌گرگری<sup>۱\*</sup>، محمدعلی آذربایجانی<sup>۲</sup>، صفر صمدزاده‌گرگری<sup>۱</sup>، بهرام آذریگرگری<sup>۱</sup>، سینا اسمعیلی<sup>۱</sup>

۱- گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه ارومیه، آذربایجان شرقی، جلفا، هادیش  
۲- گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران مرکز

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۱/۳۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۲/۰۵

### چکیده:

**سابقه و هدف:** فعالیت ورزشی و مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها یکی از عوامل پیشگیری از بروز سارکوپنی و آپوپتوزی در عضلات افراد سالمند به شمار می‌رود. هدف از این مطالعه تعیین تاثیر تمرین‌های هوازی و مصرف مکمل ویتامین D بر عوامل آپوپتوزی و سارکوپنی در رت‌های سالمند است. مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۵۰ سر رت نر مسن (۲۲ تا ۲۰ ماهه) ( $220 \pm 20$  گرم وزن) به صورت تصادفی به ۵ گروه (۱۰ سری شامل: کنترل (C)، سالین (S)، ویتامین (VD) (D)، تمرین (T) و تمرین تداومی + ویتامین (VD+T) تقسیم شدند. گروه‌های تمرینی به مدت هشت هفته و چهار روز در هفته با سرعت  $20\text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$  و شیب ثابت ۱۰ درصد و مدت ۳۰ تا ۶۰ دقیقه روی تردمیل دویدند و ویتامین D نیز روزانه به مقدار ۰/۵ میکروگرم تزریق شد. میزان پروتئین‌های BAX، BCL-۲، فولیستاتین و میوستاتین، ۲۴ ساعت بعد از آخرین تمرین از عضله تمامی رت‌ها و در حالت بی‌هوشی ارزیابی شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون آنوای یک راهه و آزمون تعقیبی شفه در سطح معناداری ۰/۰۵ استفاده شد.

**نتایج:** میزان پروتئین‌های BAX و میوستاتین در گروه‌های VDT و T نسبت به گروه کنترل در حد معناداری کاهش یافته بود ( $P=0/013$ ، برای میوستاتین و  $P=0/03$ ، برای BAX در گروه VDT و  $P=0/017$  برای میوستاتین و  $P=0/027$  برای BAX در گروه T). همچنین میزان پروتئین‌های BCL-۲ و فولیستاتین در این گروه‌ها در حد معناداری افزایش یافته بود ( $P=0/01$ ، برای فولیستاتین و  $P=0/01$ ، برای BCL-۲ در گروه VDT و  $P=0/005$ ، برای فولیستاتین و  $P=0/024$ ، برای BCL-۲ در گروه T). نسبت  $BAX/BCL-2$  نیز کاهش معناداری داشت، ولی در نسبت میوستاتین بر فولیستاتین تفاوت معناداری بین گروه‌ها مشاهده نشد ( $P>0/05$ ).

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد که هشت هفته تمرین‌های هوازی سبب کاهش عوامل آپوپتوزی شامل پروتئین BAX و BCL-۲ و عوامل سارکوپنی (میوستاتین و فولیستاتین) در عضلات رت‌های سالمند می‌شود و اگر انجام این تمرین‌ها همراه با دریافت ویتامین D باشد شاید از ایجاد سارکوپنی یا آپوپتوز عضلانی در رت‌های سالخورده جلوگیری می‌کند.

**واژگان کلیدی:** مرگ سلولی، سارکوپنی، تمرین‌های هوازی، ویتامین D.

### مقدمه:

سن باشد، عضلات سالمند با کاهش تکثیر سلول‌های ماهوارهای، به آسیب عضلات منجر می‌شود. فولیستاتین به عنوان عامل تمایز و رشد و میوستاتین به عنوان عامل منفی در رشد عضلات اسکلتی عمل می‌کند. با افزایش سن، فعالیت میوستاتین به صورت منظم افزایش یافته و سبب آتروفی عضلانی در رت‌ها می‌شود (۱). یکی دیگر از عوامل مرتبط با توده عضلانی، فولیستاتین است. مطالعه‌های اخیر نشان داده‌اند افزایش توده عضلانی در اثر انجام تمرین‌های

کاهش حجم عضلات در اثر افزایش سن، سارکوپنی نام دارد. سارکوپنی با از دست دادن تدریجی توده و قدرت عضلانی و کاهش سلول‌های ماهوارهای، میزان متابولیسم و اکسیژن مصرفی بیشینه همراه است. ارتباط بین آپوپتوز عضلات اسکلتی و سارکوپنی چندان مورد تحقیق قرار نگرفته است. یکی از عوامل دخیل در سارکوپنی ممکن است مربوط به فعالیت میوستاتین با افزایش

نویسنده مسئول: صمد صفرزاده‌گرگری

پست الکترونیکی: safarzadeh.gargari@yahoo.com

تحقیق‌ها تاثیر تمرین‌های هوازی و مصرف مکمل ویتامین D بر عوامل آپوپتوز و سارکوپنی را به طور مجزا بررسی کرده‌اند و تحقیقی در مورد تاثیر تمرین‌های هوازی که همراه با مصرف مکمل ویتامین D باشد کمتر مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است و به جهت اینکه طبق پژوهش‌های انجام گرفته، افزایش میزان پروتئین میوستاتین با عوامل پیش آپوپتوزی (BAX) همراه است، سبب آتروفی عضلات می‌شوند. از طرف دیگر انجام تمرین‌های هوازی و یا مصرف مکمل ویتامین D هر کدام می‌توانند سبب افزایش فولیستاتین و تنظیم مثبت پروتئین BCL2 شده و متعاقب آن سبب افزایش حجم و توده عضلانی در افراد سالمند شود، ولی با این حال ترکیب این دو (تمرین + ویتامین) کمتر مورد تحقیق قرار گرفته که نیازمند تحقیق‌های بیشتری است، بنابراین این مطالعه بر آن شد تا تاثیر تمرین‌های هوازی همراه با مصرف مکمل ویتامین D بر میزان پروتئین‌های آپوپتوزی و سارکوپنی در عضله قلبی رت‌های سالمند را بررسی کند. این مطالعه در سال ۱۳۹۶ در دانشگاه علوم پزشکی کرمان انجام شد.

#### مواد و روش‌ها:

در یک مطالعه تجربی ۵۰ سر رت نر مسن (۲۰-۲۲ ماهه) (وزن  $20 \pm 22$  گرم) از مرکز حیوانات دانشگاه شیراز تهیه شدند و به دانشگاه علوم پزشکی کرمان برای انجام تحقیق انتقال داده شدند. حجم نمونه‌ها نیز بر اساس اندازه و با استفاده از فرمول Cochran محاسبه شد.

رت‌ها در قفس‌های پلی پروپیلن،  $30 \times 30 \times 16$  cm تحت شرایط استاندارد و کنترل دمایی  $20 \pm 2$  C<sup>o</sup> و چرخه متناوب روشنایی/تاریکی ۱۲ ساعته با دسترسی آزادانه به آب و غذا (شرکت غذای دام پارس، تهران، ایران) نگهداری شدند. همه آزمایش‌های مربوط به حیوانات با توجه به دستورالعمل اخلاقی و مجوز معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان با کد اخلاق K.MU.IR.1396.1562.REC انجام شد. رژیم غذایی رت‌ها (شرکت غذای دام پارس، تهران، ایران) از ذرت زمین، یونجه، کنجاله سویا، گندم، ویتامین‌ها، مواد معدنی، جوش شیرین و نمک بر اساس ۵۵ درصد کربوهیدرات، ۱۷/۵ درصد پروتئین، ۱۹/۵ درصد چربی (ماده آلی محلول در اتر: EE)، ۵۶/۰ کلسیم، ۰/۶۲ درصد تی فسفر، ۶/۶ درصد فیبر خام، انرژی متابولیزه شدن  $3/16$  kcal/g (ME)، انرژی دفیوژن  $3/56$  کیلو کالری بر گرم تشکیل شده بود. این اطلاعات توسط شرکت تولید کننده ارائه شده است (۱۷).

رت‌ها پس از سه روز آشنایی با محیط آزمایشگاه به طور تصادفی به پنج گروه  $n=10$  مطابق با مداخلات ویتامین D و فعالیت تمرینی منظم به گروه کنترل، گروه ویتامین D، گروه تمرین، گروه تمرین + ویتامین D و گروه سالیین تقسیم شدند. گروه‌های تمرین به مدت هشت هفته با تردمیل در سرعت و شیب‌های مشخص مورد آزمون قرار گرفتند. مصرف ویتامین D3 به صورت  $0/5$  میکروگرم روزانه با تزریق درون صفاقی با غلظت (milli-per units international) 300000 ml/UI استفاده شد. (DITHRECOL از شرکت کاسپین ویتامین؛ تهران، ایران). برای رقیق‌سازی ویتامین D3 از نرمال سالیین و دی متیل سولفوکساید استفاده شد. با توجه به لزوم بررسی تاثیر حلال مذکور، یک گروه بنام دی متیل سولفوکساید + سالیین (DMSO) تعریف شد که روزانه فقط آن‌را دریافت کردند.

**پروتکل تمرینی:** رت‌ها در هفته اول با سرعت هشت متر بر دقیقه و شیب ۱۰ درجه به مدت ۳۰ دقیقه روی تردمیل تمرین کردند، در هفته دوم با سرعت ۱۲ متر بر دقیقه با شیب و زمان مشابه، در هفته سوم با سرعت ۱۶ متر بر دقیقه با شیب مشابه به مدت ۴۵ دقیقه و در چهارمین هفته با سرعت ۲۰ متر بر دقیقه با شیب مشابه به مدت ۴۵ دقیقه تمرین داده شدند. در هفته‌های پنجم تا هشتم، رت‌ها در سرعت ۲۰ متر بر دقیقه با زاویه ده درجه به مدت ۶۰ دقیقه هر روز تحت تمرین قرار گرفتند (۱۴).

**حجم نمونه و روش اندازه‌گیری:** ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و پس از ناشتایی شبانه، نمونه برداری‌ها انجام شد، تمامی نمونه‌های بافت عضله قلبی استخراج شده از رت‌ها خیلی سریع با سرم فیزیولوژیکی سرد شست‌وشو داده و بلافاصله در داخل تانک ازت یا یخچال  $-80$  درجه سانتی‌گراد برای

ورزشی ممکن است مربوط به تنظیم میوستاتین در افراد سالمند باشد. مطالعه‌ها روی مدل‌های انسانی و حیوانی نشان داده است که میزان آپوپتوز سلول‌های عضلانی با افزایش سن افزایش یافته و با کاهش قدرت و توده عضلانی مرتبط است. مسیرهای مختلف آپوپتوزی در عضلات درگیر هستند که با مسیرهای میانجی‌گری داخل میتوکندری می‌توانند سبب سارکوپنی شود (۲). نشان داده شده است که افزایش در نسبت BAX/BCL2 از بروز سارکوپنی در عضلات رت‌های مسن جلوگیری می‌کند، همچنین نشان داده شده است افزایش پیام‌های پروآپوپتوتیکی داخل میتوکندری از قبیل پروتئین BAX یکی از مکانیسم‌های اصلی برای کاهش توده عضلانی و آتروفی مرتبط با سن است (۳). برای کاهش آثار سارکوپنی، روش‌های مختلفی از قبیل فعالیت بدنی، تجویز اسید آمینه، داروهای بازدارنده میوستاتین، تستسترون درمانی، محدودیت کالری و روش شبه التراسوند غیر تهاجمی ذکر کرده‌اند (۱). میوستاتین سبب فعال شدن فسفاتیدیل سرین خارج غشای سلولی شده که آن هم به طور بالقوه سبب ایجاد سیگنال‌های آپوپتوزی می‌شود. نتایج نشان داده است که میوستاتین از طریق فعالسازی کاسپاز سبب ایجاد آپوپتوز می‌شود. مسافری و همکاران نشان دادند که تمرین‌های هوازی با شدت ۶۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی سبب فعال شدن مسیر Erk/AKT/mTOR/foliatin و کاهش فعالیت مسیر-myso-tatin/Murfi/2, proteasome subunits میشود (۵). بنابراین پژوهشگران همواره به دنبال اتخاذ راهکارهای مناسب برای پیشگیری از آپوپتوز و بیماری‌های مختلف عضلانی از جمله سارکوپنی در افراد سالمند هستند. در طول چند دهه گذشته، پژوهشگران گزارش کرده‌اند که تمرین‌های منظم و با شدت متوسط می‌تواند آپوپتوز را در کروموزم‌های افراد بزرگسال کاهش دهد (۶-۸). در تحقیق دیگری نشان داده شده است که تمرین‌های استقامتی طولانی مدت می‌تواند بیان ژن پروتئین‌های BAX و BCL-2 و کاسپاز ۳ قلبی را تغییر دهد و آپوپتوز قلبی را به وسیله فشار اکسایشی تحریک کند (۹). به نظر میرسد مکانیسم‌های سازگاری مولکولی و ژنتیکی القا شده توسط تمرین‌های تناوبی و مصرف مکمل ویتامین D سبب فعال شدن مجموعه‌ای از مسیرهای سیگنالیگ سلولی متفاوت و ویژگی‌های شوند (۱۰). کمبود ویتامین D با آتروفی شدن تارهای نوع دو ارتباط دارد. ویتامین D سبب رشد عضلات و افزایش میزان انقباض‌پذیری آن می‌سود، ولی نتایج برخی از مطالعه‌ها متناقض است به طوری که پژوهشگران نشان دادند ارتباط مثبتی بین سطوح سرمی ۲۵ هیدروکسی ویتامین D با عملکرد عضلانی و حجم توده عضلانی در افراد مسن وجود دارد. مطالعه‌ها در افراد با سنین ۸۸ تا ۵۵ سال نشان داد افرادی که غلظت سرمی ویتامین D آن‌ها کمتر از ۲۵ نانو مول بر لیتر و غلظت هورمون پارتیروئید آن‌ها بالا بود ( $4 \text{ pmol/l}$ ) به میزان  $2/5$  برابر قدرت گرفتن و  $2/48$  برابر حجم توده عضلانی آن‌ها نسبت به افراد دارای غلظت پایین هورمون پارتیروئید، کمتر گزارش شده است (۱۱). از یک سو نشان داده شده است که مصرف ویتامین D و انجام تمرین با مدت و شدت معین (چهار هفته پنج روز در هفته دو جلسه در هر روز) نمی‌تواند به طور معناداری سطح عامل رشد عصبی را افزایش دهد (۱۲). از سوی دیگر، مصرف مکمل به تنهایی سبب افزایش معنادار سطوح عامل رشد عصبی می‌شود. علاوه بر این، ترکیب آن با ورزش به طور برجسته‌ای از کاهش سطوح عامل رشد عصبی (NGF) در جسم مخطط موش‌ها جلوگیری می‌کند. ویتامین D سبب افزایش تارهای نوع دو در افراد سالمند می‌شود. مطالعه‌ها نشان داده است که ارتباط مثبتی بین سطوح ویتامین D و هماهنگی عصبی عضلانی در افراد بالای ۶۵ سال وجود دارد. همچنین پژوهشگران گزارش کرده‌اند که ویتامین D روی رشد عضله قلبی و انقباض‌پذیری آن موثر و ثابت شده است که سارکوپنی سبب افزایش عوامل التهاب‌زا شده و ویتامین D به‌عنوان آنتی‌اکسیدان می‌تواند سبب افزایش عملکرد عضلات اسکلتی در افراد سالمند شود. اگرچه تمرین‌های مقاومتی سبب افزایش حجم و قدرت عضلانی می‌شود، ولی ممکن است سبب بروز آسیب‌های عضلانی یا فشار خون بالا در افراد سالمند شود (۱۳). بنابراین تمرین‌های هوازی استفاده شد و با توجه به اینکه بیشتر

1 ii -Nerve growth factor

به تنهایی سبب کاهش معناداری در متغیرهای BAX و میوستاتین عضلات نعلی رت‌ها در مقایسه با گروه کنترل شده بود ( $P=0/013$ )،  $0/82 \pm 0/07$  برای میوستاتین و  $0/03 \pm 0/01$ ،  $P=0/03$  برای BAX در گروه تمرین + ویتامین D و  $0/07 \pm 0/01$ ،  $P=0/07$  برای میوستاتین و  $0/27 \pm 0/01$ ،  $P=0/27$  برای BAX در گروه تمرین. همچنین میزان پروتئینهای فولیستاتین و BCL2 در گروه تمرین + ویتامین D و گروه تمرین سبب افزایش معناداری نسبت به گروه کنترل شده بود ( $P=0/01$ )،  $0/46 \pm 0/05$  برای فولیستاتین و  $0/01 \pm 0/01$ ،  $P=0/01$  برای BCL2 در گروه تمرین + ویتامین D و  $0/05 \pm 0/01$ ،  $P=0/05$  برای BCL2 در گروه تمرین + ویتامین D و  $0/84 \pm 0/02$ ،  $P=0/24$  برای فولیستاتین و  $0/29 \pm 0/01$ ،  $P=0/29$  برای BCL2 در گروه تمرین. میزان پروتئینهای BAX و میوستاتین در گروه ویتامین D نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری نشان داد، ولی در مقایسه با سایر گروهها معنادار نبود. همچنین میزان پروتئین BCL2 در این گروه نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری داشت، ولی میزان پروتئین فولیستاتین افزایش معناداری نشان داد که در مقایسه با سایر گروهها این افزایش، کمتر بود (جدول ۱).

جدول (۱): میزان شاخص‌ها برحسب گروه‌های مورد مطالعه  
\*اختلاف معناداری در مقایسه با گروه کنترل

### بحث:

نتایج مطالعه حاضر در رابطه با تعیین تاثیر هشت هفته تمرین‌های تداومی بر شاخص‌های آپوپتوزی عضله اسکلتی شامل BAX، BCL2 و نسبت

گروه	Bax	Bcl-2	Bax/bcl-2	میوستاتین	فولیستاتین	میوستاتین/فولیستاتین
پلاسیبو	$0/05 \pm 0/23$	$0/08 \pm 0/41$	$0/06 \pm 0/2$	$0/47 \pm 0/12$	$0/17 \pm 0/13$	$0/33 \pm 0/14$
کنترل	$0/05 \pm 0/2$	$0/11 \pm 0/41$	$0/12 \pm 0/5$	$0/06 \pm 0/2$	$0/04 \pm 0/16$	$0/39 \pm 0/14$
گروه ویتامین D	$0/02 \pm 0/18$	$0/043 \pm 0/1$	$0/071 \pm 0/2$	$0/094 \pm 0/07$	$0/085 \pm 0/18$	$0/05 \pm 0/23$
گروه تمرین	$0/018 \pm 0/16$	$0/05 \pm 0/11$	$0/221 \pm 0/933$	$0/087 \pm 0/2$	$0/057 \pm 0/47$	$0/02 \pm 0/096$
گروه تمرین + ویتامین D	$0/01 \pm 0/12$	$0/02 \pm 0/189$	$0/015 \pm 0/66$	$0/082 \pm 0/2$	$0/046 \pm 0/35$	$0/028 \pm 0/079$

بر BCL2 و شاخص‌های سارکوپنی شامل میوستاتین، فولیستاتین و نسبت میوستاتین بر فولیستاتین در رت‌های نر نژاد ویستار نشان داد که بعد از دو ماه تمرین هواری، میزان پروتئینهای عامل رشد عضله شامل BCL2 و فولیستاتین و همچنین میزان پروتئینهای تنظیم‌کننده منفی حجم عضله شامل BAX و میوستاتین در عضله نعلی گروههای تمرین، ویتامین D و تمرین + ویتامین D به ترتیب به طور معناداری بیشتر و کمتر از گروه کنترل بود. در چندین مطالعه نیز نشان داده شده است که فعالیت ورزشی منظم میزان پروتئین BCL2-عضله اسکلتی را افزایش می‌دهد و نسبت BAX به BCL2 را به سمت یک محیط ضد آپوپتوزی تغییر میدهد. برای نمونه McMilan و همکاران نیز در مطالعه خود اشاره کردند که شش هفته تمرین روی نوار گردان، سبب کاهش معنادار نسبت BAX به BCL2 در آزمودنی‌های گروه تمرین در مقایسه با گروه کنترل شده بود (۱۵)، (۱۶) پروتئینهای BCL2-که به عنوان پروتئینهای ضد آپوپتوزی عمل میکنند، یکپارچگی غشای میتوکندری را حفظ کرده و آزاد شدن سیتوکروم c به درون سیتوزول و در نتیجه فعال شدن CASPASE 3 را تنظیم میکنند. کای لو و همکاران (۱۷) ثابت کردند که انجام تمرینات استقامتی به مدت هشت هفته سبب کاهش آپوپتوز قلیبی موشها از طریق افزایش غلظت آنزیمهای سوپراکسید دیس موتاز و گلوکوتاتیون پراکسیداز (GPx) و کاهش غلظت مالونیل دی آلدیید میشود. همچنین نشان دادند که انجام تمرین‌های استقامتی و HIIT سبب افزایش بیان ژنهای AMPK, P38mapk, Akt, PI3k که هر کدام

استفاده‌های طولانی مدت نگاهداری شدند. برای هموزنیزه کردن بافت مورد نظر را وزن کرده تا متناسب با آن بافر را اضافه کنیم، بافر مورد نظر برای این بافت ۲PBS است، سپس مخلوط بافر و بافت همراه با یخ توسط دستگاه هموزنیزه و در چندین سکیل خرد شد. این مخلوط را در داخل سانتریفیوژ با دمای ۴ درجه، دور ۱۲ هزار و به مدت ۱۰ دقیقه قرار داد شد. بعد از خارج کردن تیوب‌ها از سانتریفیوژ، محلول بالای تیوب‌ها (سوپرناتان) را برداشته و برای سنجش پروتئین کل آن داخل لوله‌های آزمایش دیگری قرار می‌دهیم، برای سنجش توتال پروتئین از روش استاندارد ford brad (روش رنگ سنجی) استفاده شد. برای اندازه‌گیری میزان پروتئینهای BAX و BCL2 با استفاده از کیت‌های تجاری Eliza ساخت شرکت BIOTECH DAY CRYSTAL کشور چین با مشخصات E0034Ra برای پروتئین BAX و E0037 برای پروتئین BCL2-2 با استفاده از طول موج ۴۵۰ نانومتر استفاده شد. سطوح پروتئین عضلات دوقلو و نعلی با استفاده از وسترن بلات با توجه به روش کاستیل و همکاران به ترتیب با آنتی بادیهای ویژه میوستاتین و فولیستاتین (R-19-N 8-GDF، R-6885-sc و H-114 sc-30194، بیوتکنولوژی سانتاکروز، سانتاکروز، آمریکا) سطوح پروتئین با استفاده از GADPDH (32233-sc 6C5 ریزت تکنولوژی سانتاکروز آمریکا) نرمال‌سازی شد. پروتئین عضلات با استفاده از بافر تریز-تریون ۳ استخراج شد. نمونه‌ها با ژل پلی آکرلامید جدا شده سپس به پیلتهای حاوی نیتروسلولز منتقل شدند و با آنتی بادی‌های اولیه انکوبه شدند. بعد از واکنش پلتهای با PBS و

Tween 20 شسته شده و بار دوم با استفاده از آنتی بادی‌های کونژوگه شده پراکسیداز، انکوبه شدند. از روش آمار توصیفی و استنباطی در این تحقیق استفاده شد. در بخش آمار توصیفی، با استفاده از میانگین و انحراف معیار داده‌های پژوهش توصیف شدند. در بخش آمار استنباطی نیز با روش آماری تحلیل واریانس یک راهه در سطح معناداری  $P \leq 0/05$  بررسی شد. در صورت مشاهده تفاوت معنادار، برای تعیین محل تفاوت از آزمون تعقیبی شفه برای مقایسه تک تک گروهها استفاده شد. آزمون Levenes برای یکسان‌سازی داده‌ها استفاده شد. تمامی محاسباتها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد.

### نتایج:

نتایج آزمون آنوای یک راهه نشان داد که در نسبت پروتئینهای میوستاتین بر فولیستاتین بین گروههای پژوهش اختلاف معناداری مشاهده نشده است ( $P=0/21$ )، ولی در نسبت پروتئینهای آپوپتوزی (BAX/BCL2) بین گروهها اختلاف معناداری مشاهده شد. همچنین نشان داده شد که در میزان پروتئینهای BAX، BCL2-2، فولیستاتین و میوستاتین اختلاف معناداری بین گروهها مشاهده شده است. از سوی دیگر، نتایج این مطالعه نشان داد که تمرین‌های هواری همراه با مصرف مکمل ویتامین D و تمرین هواری

2 phosphate bafer salin

3 i- Tris-Triton buffer

می‌تواند سلول را از محیط کاتابولیک خارج کند (۲۰). در پژوهش حاضر نسبت میوستاتین بر فولیستاتین کاهش یافته بود که با توجه به تحقیق‌های انجام گرفته که ذکر شد، کاهش میوستاتین و افزایش فولیستاتین، با کاهش در نسبت آن‌ها همراه خواهد بود که امری بدیهی و واضح است. همچنین با مصرف مکمل ویتامین D، این نسبت نیز بیشتر کاهش نشان داده بود. سالمندی ممکن است با آسیب‌های اکسیداتیو همراه باشد، رت‌های سالمند در مقایسه با رت‌های جوان به میزان ۵۹/۳ درصد از سطوح آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو شامل SOD2، کمتری برخوردارند. از آنجا که SIRT1 سبب افزایش SOD2 از طریق فعال کردن  $1 \alpha$ -PGC می‌شود (۲۱) پژوهش حاضر نشان داد پس از هشت هفته تمرین تداومی، میزان پروتئین میوستاتین و فولیستاتین در هر دو گروه تمرین و تمرین + ویتامین به ترتیب کاهش و افزایش یافته بود. یکی از مکانیسم‌های سلولی آن می‌تواند به فواید آنتی‌اکسیداتیو تمرین و مصرف مکمل ویتامین D مرتبط باشد. انجام تمرین‌های هوازی به مدت طولانی در سالمندان سبب افزایش آنزیم کاتالاز شده و مارکرهای استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهد. همچنین مصرف مکمل ویتامین D، سبب افزایش تکثیر و تمایز فاکتورهای میوزیک و متعاقب آن رشد عضله از طریق کاهش بیان ژن میوستاتین (تنظیم کننده منفی رشد عضله) و افزایش بیان ژن فولیستاتین می‌شود (۲۲). گزارش شده است که شکل فعال ویتامین D ( $1,25(OH)_2D_3$ ) بیان ژن‌های I-IGF میوستاتین را کاهش می‌دهد، ولی میزان پروتئین‌های فولیستاتین و II-IGF را افزایش داده بود. فولیستاتین از افزایش میزان میوستاتین جلوگیری میکند؛ در نتیجه سبب افزایش حجم عضله خواهد شد و در اثر تمرین‌های هوازی نیز میزان پروتئین فولیستاتین افزایش یافته و متعاقب آن نیز از سطوح پروتئین میوستاتین کاسته خواهد شد (۲۳) و این یکی از دلایل افزایش میزان فولیستاتین و کاهش میزان میوستاتین در عضله اسکلتی در اثر تمرین و مصرف مکمل ویتامین D است.

#### نتیجه‌گیری:

به نظر می‌رسد هشت هفته تمرین‌های هوازی سبب کاهش عوامل آپوپتوزی و سارکوپنی در عضلات رت‌های سالمند شده بود. همچنین اگر این گونه از تمرین‌ها با دریافت ویتامین D همراه باشد، آثار سودمند آن به مراتب بیشتر خواهد بود، بنابراین ممکن است با انجام تمرین‌ها به مدت طولانی از آتروفی و آسیب عضلانی کاسته شده و متعاقب آن از بروز سارکوپنی در رت‌های سالمند جلوگیری کرد یا آن‌را به تعویق انداخت.

#### تشکر و قدردانی:

نویسندگان این مقاله از تمامی پرسنل دانشگاه علوم پزشکی کرمان و همچنین از همکارانی‌های خود که در اجرای این تحقیق همکاری کردند، سپاسگزاری می‌کند. این مقاله هیچ گونه تعارضی بین نویسندگان ندارد.

در سنتز بافت عضله اسکلتی و ایجادکننده هایپرتروفی درگیر هستند، میشود. افزایش سیگنال‌های پروآپوپتوزی داخل میتوکندری توسط پروتئین BAX یکی از مکانیسم‌های اصلی به شمار می‌آید که به کاهش حجم سلولی و آتروفی عضلانی در سالمندان منجر می‌شود. بالا رفتن میزان پروتئین BAX و کاسپاز ۳ و نسبت BAX بر BCL-2 در عضلات اسکلتی سالمندان توسط برخی محققان گزارش شده است. آن‌ها نشان دادند که تنظیم منفی در مسیر سیگنالی BCL-2 به فعال شدن کاسپاز ۳ منجر شده و آپوپتوز داخلی را در عضلات اسکلتی مرتبط با سن افزایش میدهد. همچنین یافته‌های سانگ و همکاران (۱۸، ۲) نشان داد که سطوح پروتئین BCL-2 میتوکندری، ۲۰ درصد در رت‌های سالمند (۲۲ ماهه) نسبت به رت‌های جوان کاهش داشت، ولی سطوح پروتئین BAX ۱۱ درصد افزایش داشت. به هر حال نسبت BAX بر BCL-2 در عضله نعلی ۹۸ درصد نسبت به رت‌های جوان افزایش یافته بود. تمرین هوازی سبب مهار میوستاتین درون سلولی شده است و در نتیجه، فعالیت مسیر mTOR-AKT را افزایش می‌دهد که نتیجه آن سنتز پروتئین انقباضی است. به علاوه انقباض‌های عضلانی متوالی در تمرین هوازی بیان  $1 \alpha$ -PGC را افزایش می‌دهد که به نوبه خود از طریق مهار FOXO3 سبب کاهش تجزیه پروتئین عضلانی می‌شود؛ بنابراین مهار میوستاتین و افزایش  $1 \alpha$ -PGC ناشی از تمرین‌های هوازی به احتمال به تعادل مثبت پروتئین عضله منجر خواهد شد؛ به طوری که فانگ و همکاران (۱۹) نشان دادند که با افزایش میزان فولیستاتین، سرعت دیدن نیز در افراد سالمند افزایش یافته بود، ولی رشیدالمیر و همکاران نشان دادند هشت هفته تمرین‌های هوازی و مقاومتی بیان ژن میوستاتین را در گروه‌های تمرین هوازی و مقاومتی تغییر نداد، ولی سبب کاهش معناداری در نسبت فولیستاتین بر میوستاتین در گروه‌های تمرینی شده بود که نتایج آن‌ها با نتایج تحقیق حاضر در نسبت پروتئین‌ها همخوانی دارد. از دلایل غیر معناداری رشیدالمیر و همکاران در میزان میوستاتین را به رشد عضلات توسط اعضای  $\beta$ -TGF نسبت داده‌اند که سبب غیر فعال شدن انت‌های آمینی پروتئین میوستاتین و فعال شدن قسمت انتهایی کربوکسیل آن میشود. میوستاتین در سلول‌های عضلانی دو عملکرد جداگانه دارد. افزایش میزان FOXO1 یکی از مسیرهای مهم در افزایش تجزیه پروتئین و در نهایت آپوپتوز است اما یکی دیگر از عملکرد آن کاهش مقدار mTOR به عنوان سنتز پروتئین سلولی است و در این تحقیق میزان میوستاتین کاهش معناداری داشت. افزایش عوامل مثبت یا منفی در بازخورد به بعضی از عوامل از قبیل  $\beta$ PI3K، GSK3 و 1-MuRF به بیان ژن میوستاتین در سلول‌های عضلانی تاثیر خواهد گذاشت. یکی از دلایل احتمالی در کاهش این پروتئین می‌تواند مربوط به تعادل مثبت ایجاد شده در رشد عضلات باشد (۱۹) در تحقیق حاضر میزان پروتئین فولیستاتین افزایش معناداری داشت. فولیستاتین می‌تواند از اتصال میوستاتین به گیرنده نوع فعال خود (نوع دو) جلوگیری کند. بنابراین افزایش معنادار فولیستاتین در اثر تمرین‌های هوازی

#### منابع:

- Marfe G, Tafani M, Pucci B, Di Stefano C, Indelicato M, Andreoli A, et al. RETRACTED ARTICLE: The effect of marathon on mRNA expression of anti-apoptotic and pro-apoptotic proteins and sirtuins family in male recreational long-distance runners. BMC physiology. 2010;10(1):7.
- Li F-H, Liu Y-Y, Qin F, Luo Q, Yang H-P, Zhang Q-G, et al. Photobiomodulation on Bax and Bcl-2 Proteins and SIRT1/PGC-1 $\alpha$  Axis mRNA Expression Levels of Aging Rat Skeletal Muscle. International Journal of Photoenergy. 2014;2014.

- Dirks A, Leeuwenburgh C. Apoptosis in skeletal muscle with aging. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 2002;282(2):R519-R27.
- Liu TC-Y, Liu Y-Y, Wei E-X, Li F-H. Photobiomodulation on stress. International Journal of Photoenergy. 2012;2012.
- siyahkojiyan M, bolboli L, jafari A. effects of 12 weeks aerobic training on some of the skeletal apoptosis index rat males. tabriz medical science journal. 2017.39(6) 35-43.
- nabiyuni, divsalar, adeleh, & safayinegad. 2012. effects of honey bee poison on leukemia lymphoblastic cancer cells. journal of faze medical science of kashan university.16(2)7-121.
- Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial

- protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 2000;102(1):33-42.
8. Ghavami S, Hashemi M, Kadkhoda K, Alavian SM, Bay GH, Los MJ. Apoptosis in liver diseases-detection and therapeutic applications. *Medical science monitor*. 2005;11(11):RA337-RA45.
  9. Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon H-U, Kimchi A. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death & Differentiation*. 2009;16(7):966-75.
  10. Bischoff HA, Stähelin HB, Dick W, Akos R, Knecht M, Sallis C, et al. Effects of vitamin D and calcium supplementation on falls: a randomized controlled trial. *Journal of bone and mineral research*. 2003;18(2):343-51.
  11. Abiri B, Vafa M. Nutrition and sarcopenia: A review of the evidence of nutritional influences. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2017;1-11.
  12. Koundourakis NE, Avgoustinaki PD, Malliaraki N, Margioris AN. Muscular effects of vitamin D in young athletes and non-athletes and in the elderly. *Hormones*. 2016;15(4):471-88.
  13. Ko IG, Jeong JW, Kim YH, Jee YS, Kim SE, Kim SH, et al. Aerobic exercise affects myostatin expression in aged rat skeletal muscles: a possibility of antiaging effects of aerobic exercise related with pelvic floor muscle and urethral rhabdosphincter. *International neurourology journal*. 2014;18(2):77.
  14. Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen Ø. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation*. 2007;14(6):753-60.
  15. McMillan EM, Graham DA, Rush JW, Quadrilatero J. Decreased DNA fragmentation and apoptotic signaling in soleus muscle of hypertensive rats following 6 weeks of treadmill training. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2012.
  16. Siahkohian M, Asgharpour-Arshad M, Bolboli L, Jafari A, Hesar FS. Effect of 12-weeks aerobic training on some indices of skeletal muscle apoptosis in male rats. *Majallah-i pizishki-i Danishgah-i Ulum-i Pizishki va Khadamat-i Bihdashti-i Darmani-i Tabriz*. 2018;39(6):35-43.
  17. Lu K, Wang L, Wang C, Yang Y, Hu D, Ding R. Effects of high-intensity interval versus continuous moderate-intensity aerobic exercise on apoptosis, oxidative stress and metabolism of the infarcted myocardium in a rat model. *Molecular medicine reports*. 2015;12(2):2374-82.
  18. Song W, Ko KJ, Shin SJ, Ryu DS. Penile abscess secondary to neglected penile fracture after intracavernosal vasoactive drug injection. *The world journal of men's health*. 2012;30(3):189-91.
  19. Favier FB, Benoit H, Freyssenet D. Cellular and molecular events controlling skeletal muscle mass in response to altered use. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*. 2008;456(3):587-600.
  20. Hansen J, Brandt C, Nielsen AR, Hojman P, Whitham M, Febbraio MA, et al. Exercise induces a marked increase in plasma follistatin: evidence that follistatin is a contraction-induced hepatokine. *Endocrinology*. 2011;152(1):164-71.
  21. Olmos Y, Valle I, Borniquel S, Tierrez A, Soria E, Lamas S, et al. Mutual dependence of Foxo3a and PGC-1 $\alpha$  in the induction of oxidative stress genes. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(21):14476-84.
  22. saremi DE, shavandi DN, vafapoor H, effects of resistance training with vitamin D consumption on IGF-I and muscle performance in postmenopausal women. *journal f paghohandeh*. 2013. 13(2): 57-63.
  23. Cipriani C, Pepe J, Piemonte S, Colangelo L, Cilli M, Minisola S. Vitamin d and its relationship with obesity and muscle. *International journal of endocrinology*. 2014;2014.