

علوم زیستی ورزشی - پاییز ۱۳۹۹
دوره ۱۲، شماره ۳، ص: ۳۶۲ - ۳۴۷
تاریخ دریافت: ۳۰ / ۰۱ / ۹۹
تاریخ پذیرش: ۰۷ / ۰۷ / ۹۹

تأثیر لیگاسیون عصب نخاعی (SNL) بر بیان ژن‌های TRAF6 و MuRF1 عضله نعلی موش‌های نر ویستار پس از یک دوره تمرین تناوبی شدید

عبدالرضا کاظمی*^۱ - علیرضا سعید^۲

۱. دانشیار فیزیولوژی ورزشی، گروه علوم ورزشی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه ولی عصر (عج)، رفسنجان، ایران. ۲. الف) دانشجوی کارشناس ارشد، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران، ب) مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان ایران

چکیده

هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر لیگاسیون عصب نخاعی (SNL) بر بیان ژن‌های TRAF6 و MuRF1 عضله نعلی موش‌های نر ویستار پس از یک دوره تمرین تناوبی شدید بود. بدین منظور، ۲۴ سر موش نر ویستار در ۲ گروه ۱۲ تایی کنترل (C) و تمرین (HIT) قرار گرفتند. گروه تمرین بعد از یک هفته آشناسازی برنامه ۴ هفته تمرین تناوبی شدید را انجام دادند. سپس به طور تصادفی در دو گروه ۶ تایی تمرین (HIT) و گروه لیگاسیون عصب نخاعی (HIT-SNL) قرار گرفتند. همزمان گروه کنترل نیز به دو گروه ۶ تایی کنترل (C) و لیگاسیون عصب نخاعی (C-SNL) تقسیم شدند. ۴ هفته پس از SNL موش‌ها قربانی شدند و عضله نعلی استخراج و به وسیله روش کمی‌سازی داده‌ها Real-time Pcr بیان ژن‌ها اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که کاهش فعالیت به شکل SNL اثر معناداری بر بیان ژن‌های TRAF6 و MuRF1 دارد (به ترتیب $P=0/0001$ و $P=0/0001$). همچنین انجام تمرین ورزشی شدید قبل از SNL به طور چشمگیری بیان TRAF6 و MuRF1 را کاهش می‌دهد (به ترتیب $P=0/0003$ و $P=0/0001$). علاوه بر این، یافته‌ها نشان می‌دهد که SNL اثر معناداری بر نسبت وزن عضله نعلی به طول درشت‌نی داشته است ($P=0/01$). از طرف دیگر، انجام تمرینات HIT قبل از SNL سبب افزایش معنادار در این نسبت شد ($P=0/03$). نتایج نشان داد کاهش فعالیت به شکل SNL با افزایش بیان ژن‌های TRAF6 و MuRF1 همراه است که احتمالاً می‌تواند در تغییر توده عضلانی نیز درگیر باشد. با توجه به اینکه انجام تمرینات با شدت بالا بیان این ژن‌ها را کاهش می‌دهد، این تمرینات می‌توانند به منظور حفظ توده عضلانی مطلوب‌تر قبل از بی‌فعالیتی بدنی به کار روند.

واژه‌های کلیدی

تمرین تناوبی شدید، لیگاسیون عصب نخاعی، TRAF6، MuRF1.

مقدمه

سطوح مطلوب فعالیت بدنی با بهبود کیفیت زندگی و همچنین ارتقای سلامتی مرتبط است و برای داشتن زندگی خوب، افراد نیازمند انجام فعالیت بدنی منظم و کافی در زندگی روزانه‌اند (۱). فعالیت بدنی مانند ورزش، فعالیت‌های تفریحی و بدنی مانند پیاده‌روی، باغبانی، شستن ظرف و انجام دیگر کارهاست. با این حال، معمولاً در بیماران دچار درد مزمن نظیر بیماران مبتلا به نوروپاتی محیطی، کاهش فعالیت بدنی امری شایع به‌نظر می‌رسد که این حالت به‌شدت سبب کاهش کیفیت زندگی بیمار شده (۲) و موجب ایجاد عوارضی مانند چاقی، کاهش ظرفیت عملکرد تنفسی، قلبی-عروقی، آتروفی عضلانی و کاهش توده عضلانی اسکلتی می‌شود (۳).

کاهش توده عضلانی یا آتروفی زمانی اتفاق می‌افتد که تخریب پروتئین بیش از سنتز آن باشد (۴، ۵). هرچند آتروفی پیامد فرایندهای فیزیولوژیکی معینی مانند بی‌فعالیتی است، ولی به‌عنوان یکی از ویژگی‌های اصلی در بسیاری از بیماری‌ها مورد توجه قرار می‌گیرد. 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 از طریق تغییر در ترکیب تار عضلانی نمود می‌یابد (۵). آتروفی عضله اسکلتی در بیماری‌های گوناگون (دیابت ملیتوس، سرطان، سندروم نقص ایمنی اکتسابی، عفونت و بیماری مزمن انسداد ریوی)، همچنین آتروفی پس از آسیب (بدون عصب شدن و آسیب تاندون) و بعد از بی‌حرکی طولانی‌مدت (گچ‌گیری و بستری شدن طولانی‌مدت)، بعد از بی‌باری (و حتی در نتیجه بی‌تمرینی و کاهش سطوح فعالیت پس از یک دوره فعالیت ورزشی (۶) ایجاد می‌شود. عوامل مولکولی زیادی در آتروفی عضلانی ناشی از موارد مذکور مؤثرند.

دو لیگاز ویژه عضله درگیر در فرایند یوبی‌کوئیتیناسیون پروتئین‌های عضله اسکلتی به نام‌های MuRF1 و MAFbx/Atrogin1 به‌عنوان آنزیم‌های تحریک‌کننده تجزیه پروتئین عضله به‌واسطه UPS در سال ۲۰۰۱ مطرح شده‌اند. به‌طوری‌که در غیاب آنها آتروفی عضله به‌شدت کم می‌شود. در واقع، MuRF1 از طریق تعدادی از محرک‌های آتروفی مانند عدم استفاده/غیرفعال، گرسنگی و درمان با گلوکوکورتیکوئید

القا شده و به‌عنوان آتروژن‌ها شناخته شده است (۴). MuRF1 به پروتئین میوفیبریلی تیتین و زنجیره سنگین میوزین (MHC) متصل می‌شود. در همین زمینه مهار MuRF1 به‌واسطه siRNA کاهش میزان MHC را متوقف کرد (۵).

عوامل مرتبط با گیرنده عامل نکروزدهنده تومور (TRAFs) شامل خانواده پروتئین‌های آداپتور حفاظت‌شده درگیر در تحریک آبشارهای پیام‌رسانی مختلفی‌اند که در میان پروتئین‌های شناخته‌شده این خانواده، پروتئین آداپتور گیرنده TNF α (TRAF6) دارای چندین ویژگی مجزاست که با سایر اعضای خانواده TRAF به اشتراک گذاشته نشده‌اند (۷). سایتوکاین‌های التهاب‌آور مختلف و عوامل مشتق از تومور برای فعال کردن مسیرهای پایین‌دستی p38 MAPK و NF κ B که آتروفی عضلانی را واسطه‌گری می‌کنند، نیازمند TRAF6 هستند (۸،۹). علاوه بر این، مشخص شده است که TRAF6 تنظیم‌کننده اصلی آتروفی عضله اسکلتی در تحریک فیزیولوژیکی (بدون عصب شدن) است (۷). تخریب MyHC به‌طور چشمگیری در عضلات بدون عصب‌شده موش‌های فاقد ژن TRAF6 متوقف می‌شود. این نتیجه با گزارش‌هایی که نشان دادند MuRF1 پروتئین‌های فیلامان‌های ضخیم شامل MyHC در عضلات اسکلتی را هدف قرار می‌دهد، سازگار است (۱۰).

پائول و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که TRAF6 در عضلات بدون عصب‌شده موجب تخریب پروتئین‌های عضله از طریق افزایش بیان هر دو MAFbx و MuRF1 می‌شود. تخریب MyHC به‌طور چشمگیری در عضلات بدون عصب‌شده موش‌های فاقد ژن TRAF6، متوقف می‌شود (۷).

در شرایط آتروفی ناشی از گرسنگی نیز TRAF6 با افزایش بیان لیگازهای یوبی کوئیتینی در کاهش توده عضلانی نقش دارد، به‌طوری‌که بیان هر دو ژن MAFbx و MuRF1 به‌طور شایان توجهی در موش‌های فاقد ژن TRAF6 کاهش می‌یابد (۱۰). همچنین TRAF6 و مولکول‌های پیام‌رسانی پایین‌دست آن شامل MuRF1 و MAFbx در آتروفی عضلانی ناشی از دگزامتازون در دو محیط *in vitro* و *in vivo* تنظیم افزایشی می‌یابند و افزایش در این عوامل همراه با کاهش در سطح مقطع تارهای عضلانی بود (۱۱). در نمونه‌های انسانی ۳ روز عدم تحمل وزن در اندام تحتانی موجب افزایش بیان ژن‌های مسیر یوبی کوئیتین پروتئازوم مانند MuRF1 شد (۱۲).

از سوی دیگر فعالیت ورزشی می‌تواند سرعت اختلالات عصبی عضلانی را کاهش دهد (۱۳). سنتز پروتئین عضله در پاسخ به فعالیت بدنی افزایش می‌یابد (۱۴). در همین زمینه، پژوهشی افزایش چشمگیری را در MyoD و فاکتور تنظیمی عضله‌زایی-۴ و کاهش در بیان ژن مایواستاتین پس از فعالیت

ورزشی نشان داد (۱۵). علاوه بر این، فعالیت ورزشی می‌تواند بیان ژن و پروتئین لیگازهای MuRF1 را کاهش دهد (۱۶).

همان‌طور که اشاره شد، بی‌فعالیتی از شرایطی است که کاهش توده عضلانی در آن بارز است، اما تا به حال نقش TRAF6 در آتروفی ناشی از SNL و همچنین اثر فعالیت ورزشی بر بیان این ژن در عضله نعلی بررسی نشده است. شناخت سازوکارهای درگیر در آتروفی و بازسازی عضله به توسعه روش‌های درمانی جدید برای مقابله با وضعیت‌ها و بیماری‌هایی مانند دیستروفی عضلانی، آتروفی ناشی از بی‌حرکی کمک خواهد کرد. چندین مسیر سیگنالینگ کاتابولیکی و آنابولیکی با تغییر اندازه عضله مرتبط‌اند (۱۷). اندازه عضله به وسیله تعادل بین سنتز و تخریب پروتئین مشخص می‌شود (۱۸).

مطالعات کمی در زمینه بررسی تأثیر HIIT بر سازگاری‌های درون عضلانی انجام گرفته است. علاوه بر این، در مورد سازوکارهای احتمالی تأثیر شکل‌پذیری عضلانی ناشی از HIIT، اطلاعات کمی وجود دارد (۱۹). در واقع HIIT می‌تواند سازگاری‌های فیزیولوژیک مفیدی را در بافت‌های مختلف مانند قلب (۲۰) و عضلات اسکلتی (۲۱) ایجاد کند و تأثیرات چشمگیری بر آمادگی جسمانی و وضعیت سلامتی داشته باشد (۲۲). این روش تمرینی، شامل وهله‌های تمرینی با شدت بالاست که می‌تواند پتانسیل بالایی برای سازگاری‌های درون عضلانی داشته باشد (۲۳). بعد از یک دوره تمرین HIIT بیان ژن عوامل درگیر در سطح مقطع عرضی تارهای عضلانی افزایش می‌یابد (۲۴). علاوه بر این، ۶ هفته تمرین تناوبی شدید سبب افزایش ژن‌های مؤثر در ظرفیت هوازی و بی‌هوازی درون عضلانی می‌شود (۲۵).

با توجه به اثر مثبت فعالیت ورزشی بر بهبود توده عضلانی و افزایش عملکرد عضلانی، این سؤال پیش می‌آید که آیا انجام فعالیت ورزشی شدید (معمولاً تارهای تندانقباض را فراخوانی می‌کنند) قبل از بدون بار کردن عضله اعم از آسیب عضلانی، گچ گرفتن، تعلیق اندام تحتانی، قطع عصب یا فلج موقت نوروون حرکتی می‌تواند بر بیان ژن‌های TRAF6 و MuRF1 در عضله نعلی که عضله‌ای کندانقباض است، اثرگذار باشد؟ از این‌رو، هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر یک دوره SNL بر بیان ژن‌های TRAF6 و MuRF1 در عضله نعلی موش‌های نژاد ویستار پس از یک دوره تمرینات HIIT بود.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع بنیادی و تجربی است. ۲۴ سر موش بالغ ۸ هفته‌ای با وزن 20 ± 290 گرم (در ابتدا) از دانشگاه علوم پزشکی کرمان خریداری شد. پس از یک هفته آشناسازی و سازگاری حیوانات با

1. High-intensity interval training

محیط آزمایشگاه و سپس تقسیم تصادفی آنها به دو گروه، گروه HIIT (در هفته اول آشناسازی موش‌های این گروه به منظور کاهش استرس روی تردمیل قرار گرفتند و با سرعت ۱۰ تا ۱۸ متر در دقیقه دویدند) به مدت ۴ هفته تمرین تناوبی شدید را ۵ روز در هفته انجام دادند و گروه کنترل به زندگی عادی خود در قفس ادامه دادند. پس از ۴ هفته هر دو گروه به دو زیرگروه که شامل ۶ سر موش بود، تقسیم شدند. گروه کنترل (C) (n=۶) به روال گذشته به زندگی عادی در قفس ادامه دادند، گروه کنترل-لیگاسیون (C-) (SNL) (n=۶) تحت جراحی به روش کیم و چانگ عصب پنجم کمری آنها قطع شد. گروه HIIT (n=۶) که قبلاً تمرینات تناوبی شدید را انجام دادند، به زندگی عادی در قفس ادامه دادند و گروه تمرین-لیگاسیون (HIT-SNL) (n=۶) بعد از ۴ هفته تمرین تحت جراحی به روش کیم و چانگ عصب پنجم کمری آنها قطع شد. در پژوهش حاضر، تمامی اصول اخلاقی کار با حیوانات و دستورالعمل‌های سازمان بین‌المللی مطالعه درد (IASP) بررسی و تأیید شد (کد اخلاق: EC/93-9/KNRC).

مدل SNL

مدل روشی SNL است که به‌طور گسترده برای مطالعه سازوکارهای درد نوروپاتی و تأثیر داروها و رفتارهای مرتبط با درد به کار می‌رود. به‌منظور ایجاد مدل SNL، ابتدا رت‌ها با سدیم پنتوباریتول (۶۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت درون‌صفافی) بی‌هوش شدند و سپس عصب پنجم کمری نخاعی آنها براساس روش Kim و Chung (۲۶) محکم گره زده شد. به‌طور خلاصه در این روش، پس از اطمینان از بی‌هوشی حیوان عضلات بین‌مه‌ره‌ای در سطح مهره چهارم کمری و دوم خاجی جدا شده و زائده عرضی مهره ششم کمری برداشته شد. عصب پنجم کمری سمت چپ نخاع مشخص و با ظرافت از اعصاب مجاور جدا می‌شد. عصب پنجم کمری به‌طور محکم با استفاده از نخ مخصوص Thread silk، دقیقاً در انتهای دیستال به‌منظور اطمینان از ایجاد اختلال در تمام فیبرها گره زده شد.

تمرین HIIT

به‌منظور آشناسازی، موش‌های گروه تمرین به مدت ۵ روز روی نوار گردان مخصوص چوندگان (Model T510E, Diagnostic and Research, Taoyuan, Taiwan) با شیب صفر درصد و سرعت ۱۰ متر بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه دویدند. برنامه HIT شامل ۱۰ تکرار ۴ دقیقه‌ای با شدت ۸۵-۹۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه بود که پس از هر تکرار ۲ دقیقه استراحت فعال انجام می‌گرفت. سرعت نوار

گردان در طول برنامه تمرینی از ۱۶ تا ۲۶ متر در دقیقه (برابر با ۹۰-۸۵ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه) متغیر بود که به صورت تدریجی افزایش می‌یافت. مدت برنامه تمرینی، ۴ هفته و هر هفته ۵ جلسه بود (۲۷).
موش‌های صحرایی در آزمایشگاه حیوانات در اتاقی به ابعاد ۱/۶۰ در ۲/۲۰ متر در شرایط کنترل شده نور (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، شروع روشنایی ۶ صبح و شروع خاموشی ۶ عصر) دما (22 ± 3 سانتی‌گراد) و رطوبت (حدود ۴۵ درصد) نگهداری شدند. ۳ تا ۵ سر موش در قفس‌هایی از جنس پلکسی گلاس با در توری و به ابعاد ۲۵ در ۲۷ در ۴۳ سانتی‌متر به گونه‌ای نگهداری شدند که آزادانه به آب و غذای استاندارد دسترسی داشتند. در سرتاسر دوره پژوهش، موش‌ها توسط یک نفر جابه‌جا و دستکاری می‌شدند.

استخراج و وزن‌کشی عضله نعلی

۴ هفته پس از پایان پروتکل لیگاسیون، رت‌ها از طریق تزریق درون‌صفافی کتامین (mg/kg) ۹۰ و زایلازین ($10 mg/kg$) بی‌هوش و عضله نعلی در سمت چپ استخراج شد و پس از وزن کردن بلافاصله در نیتروژن منجمد و برای تجزیه و تحلیل بعدی در دمای -80 نگهداری شدند. همچنین، پس از جداسازی کامل عضلات و بافت‌های پیوندی از استخوان درشت‌نی، طول بیشینه استخوان درشت‌نی از طریق کولیس اندازه‌گیری شد. سپس به منظور نرمال‌سازی داده، توده عضلانی نسبت به طول درشت‌نی محاسبه شد (۲۸).

استخراج RNA و سنتز cDNA و Real time-PCR

به منظور استخراج total RNA از عضله نعلی، این عضله به نسبت ۱ به ۱۰ در QIAzol Lysis Reagent هموزن شد. به منظور برداشتن اجزای پروتئینی، محصول در $4^{\circ}C$ ، $10 min$ ، $12000g$ سانتریفیوژ شد. سپس به نسبت ۱ به ۵ با کلروفرم مخلوط و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. محصول در $4^{\circ}C$ ، $15 min$ ، $12000g$ سانتریفیوژ و بخش معدنی و آبی از هم جدا شدند، بخش محتوی RNA برداشته شد و با نسبت ۱ به ۵ با ایزوپروپانول مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق رها و سپس در $4^{\circ}C$ ، $10 min$ ، $12000g$ سانتریفیوژ شد. Pellet حاوی RNA در اتانول شست‌وشو و در $20 \mu L$ آب RNase-Free حل شد. غلظت RNA (با استفاده از دستگاه Eppendorff, Germany) سنجش شد و نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ به عنوان تخلیص مطلوب تعریف شد. سنتز cDNA با استفاده از یک میکروگرم از RNA و با استفاده از کیت سنتز cDNA ساخت فرمنتاز و آنزیم Reverse Transcriptase انجام گرفت.

اندازه‌گیری سطوح بیان ژن‌های TRAF6 و MuRF1 به روش کمی Real time-PCR با استفاده از Primix syber green II انجام گرفت (Applied Biosystems, USA). مخلوط واکنش در حجم نهایی 20 μ L و هر واکنش به صورت duplicate صورت پذیرفت. طراحی پرایمرها براساس اطلاعات ژن‌های TRAF6 و MuRF1 و β -actin در بانک ژنی NCBI و توسط شرکت ماکرو ژن (Macrogen Inc. Seoul, Korea) انجام گرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ 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 ژن‌های مورد نظر نیز با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ اندازه‌گیری شد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده

ژن‌ها	توالی پرایمر
TRAF6	F= 5'-TCATTATGATCTGGACTGCCCAAC-3' R= 5'-TGCAAGTGTCGTGCCAAGTG-3'
MuRF1	F= 5'-GTGAAGTTGCCCCCTTACAA-3' R=5'-TGGAGATGCAATTGCTCAGT-3'
β-actin	F= '5- ACCATGTACCCAGGCATTGC -3' R='5-ATGACTCTACCCACGGCAAG -3'

در بخش آمار توصیفی از شاخص‌های پراکندگی انحراف معیار، میانگین و نمودار و در بخش آمار استنباطی به منظور تعیین نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیرو-ویلک استفاده شد. همچنین همسان بودن واریانس‌ها با آزمون Leven سنجیده شد. به منظور تعیین معنادار بودن تفاوت بین متغیرها از آزمون آماری two way ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد. به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS-22 استفاده شد.

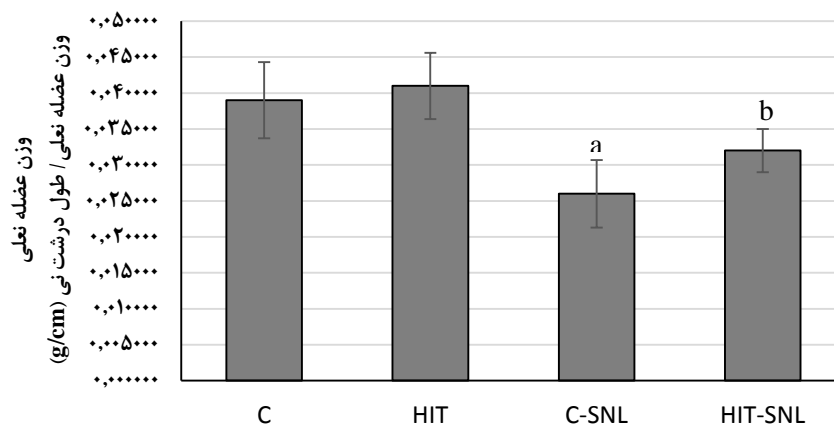
یافته‌ها

در جدول ۲ تغییرات توده بدنی پیش و پس از دوره تمرینی در گروه‌های مختلف پژوهش و در شکل ۱ نسبت وزن عضله نعلی به طول درشت‌نی در گروه‌های پژوهش ارائه شده است.

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

گروه‌ها	توده بدنی (گرم)	
	پیش از تمرین	پس از تمرین
C	۲۰±۲۹۰	۲۱±۳۲۵
C-SNL	۱۹±۲۹۵	۲۳±۲۷۵
HIT	۲۱±۲۹۰	۲۵±۳۱۲
HIT-SNL	۲۲±۲۸۷	۱۸±۳۱۱

پیش از انجام آزمون‌های آماری به منظور بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها و تجانس واریانس از آزمون شاپیرو-ویلک و Levens استفاده شد و نتایج این آزمون برای متغیرهای توده بدنی، میزان بیان ژن‌های MuRF1، TRAF6 و نسبت وزن عضله نعلی $P \geq 0/05$ بود، بنابراین تمامی متغیرها از توزیع نرمال و تجانس واریانس برخوردارند.



شکل ۱. تغییرات نسبت وزن عضله نعلی به طول درشتنی در گروه‌های مختلف پژوهش
A: $P < 0/05$ کاهش چشمگیر گروه C-SNL در مقابل گروه C. B: $P < 0/05$ افزایش چشمگیر HIT-SNL در مقابل گروه C-SNL

نتایج آزمون تحلیل واریانس ($P = 0/01$) و آزمون تعقیبی توکی نشان داد نسبت وزن عضله نعلی به طول درشتنی در گروه C-SNL در مقایسه با گروه C کاهش زیادی دارد ($P = 0/01$). همچنین افزایش چشمگیر این نسبت در گروه HIT-SNL در مقابل گروه C-SNL مشاهده شد ($P = 0/03$) (شکل ۱).

نتایج آنالیز واریانس دوطرفه (جدول ۳) و آزمون تعقیبی توکی اثر معناداری SNL در افزایش سطوح بیان ژن TRAF6 عضله نعلی در گروه C-SNL در مقایسه با گروه C را نشان می‌دهد ($P=0/0001$). علاوه بر این اثر معناداری تمرین HIIT در کاهش سطوح بیان ژن TRAF6 عضله نعلی در گروه HIIT-SNL در مقایسه با گروه C-SNL ($P=0/003$) و همچنین گروه HIT در مقابل گروه C را نشان می‌دهد ($P=0/01$) (شکل ۲).

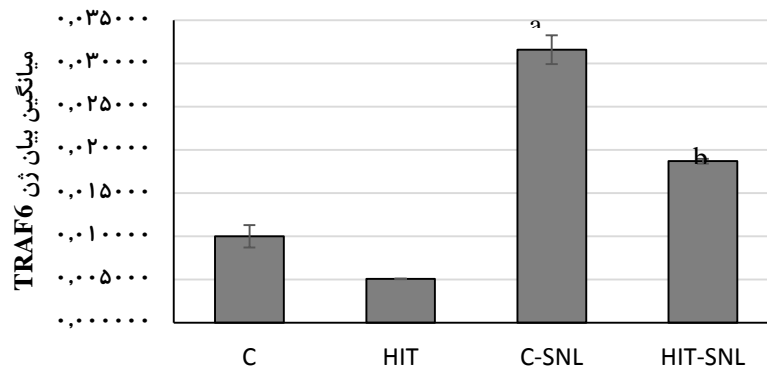
جدول ۳. نتایج آزمون تحلیل واریانس دوطرفه بیان ژن TRAF6 در عضله نعلی

منبع تغییرات	مجموع تغییرات	میانگین مربعات	میزان معناداری	درجه آزادی
مدل	۰/۰۰۴	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۳
عامل HIT	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۲	
عامل SNL	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۰/۰۰۰۱	
SNL * HIT	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۱	
خطا	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱		
کل	۰/۰۰۹			

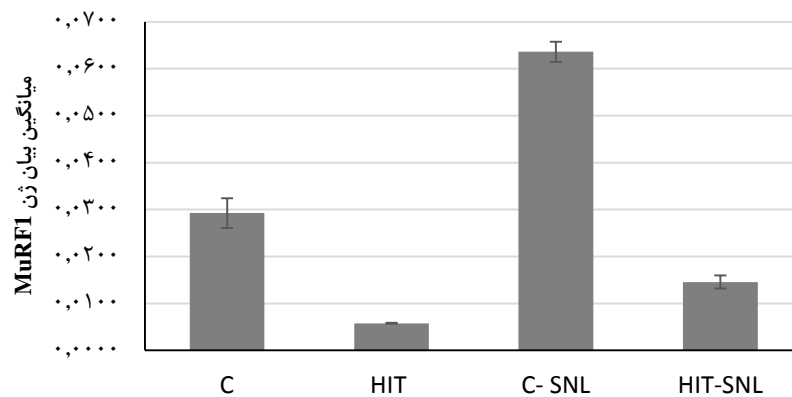
علاوه بر این، نتایج آنالیز واریانس دوطرفه (جدول ۴) و آزمون تعقیبی توکی اثر معناداری SNL در افزایش سطوح بیان ژن MuRF1 عضله نعلی در گروه C-SNL در مقایسه با گروه C را نشان می‌دهد ($P=0/0001$). همچنین اثر معناداری تمرین HIT در کاهش سطوح بیان ژن MuRF1 عضله نعلی در گروه HIIT-SNL در مقایسه با گروه C-SNL ($P=0/0001$) و گروه HIT در مقابل گروه C را نشان می‌دهد ($P=0/003$) (شکل ۳).

جدول ۴. نتایج آزمون تحلیل واریانس دوطرفه بیان ژن MuRF1 در عضله نعلی

منبع تغییرات	مجموع تغییرات	میانگین مربعات	میزان معناداری	درجه آزادی
مدل	۰/۱۴	۰/۰۰۵	۰/۰۰۰۱	۳
عامل HIT	۰/۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱	
عامل SNL	۰/۰۱۲	۰/۰۱۲	۰/۰۰۰۱	
HIT * SNL	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۱۲	
خطا	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۱		
کل	۰/۰۲۹			



شکل ۲. بیان ژن TRAF6 در گروه‌های مختلف پژوهش
 A: $P < 0.05$ افزایش چشمگیر گروه C-SNL در مقابل گروه کنترل. B: $P < 0.05$ کاهش چشمگیر HIT-SNL در مقابل گروه C-SNL



شکل ۳. بیان ژن MuRF1 در گروه‌های مختلف پژوهش
 افزایش چشمگیر گروه C-SNL در برابر گروه C و کاهش شایان ملاحظه گروه HIT-SNL در مقایسه با گروه C-SNL ($P < 0.05$).

بحث

کاهش توده عضلانی از برجسته‌ترین مشخصه‌های بی‌تمرینی است که با کاهش قدرت و عملکرد عضله و در نتیجه آن ناتوانی در اجرای کارهای روزمره همراه است. هرچند گزارش‌هایی مبنی بر آتروفی مشابه در بین تارهای مختلف وجود دارد، ولی بیشتر مطالعات نشان داده‌اند تارهای نوع دو بیشتر از تارهای نوع یک

تحت تأثیر آتروفی قرار می‌گیرند (۱۳،۲۹). آتروفی عضلانی نتیجه تسریع در فرایندهای تخریب نسبت به سنتز پروتئین است. عوامل گوناگونی مانند از بین رفتن عصب تارهای عضلانی (۳۱، ۳۰)، التهاب، بدعملکردی میتوکندریایی و فشار اکسایشی (۳۰)، کاهش تعداد سلول‌های ماهواره‌ای (۳۲) و کاهش بیان فاکتورهای رشدی (۳۳، ۳۴) سازوکارهای درگیر در آتروفی عضلانی‌اند.

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که انجام تمرینات HIT قبل از ابتلا به بی‌فعالیتی ناشی از SNL به‌طور معناداری از کاهش وزن عضله نعلی جلوگیری می‌کند. همان‌طور که آنالیز واریانس نشان داد، اختلاف معناداری بین گروه‌های پژوهش وجود دارد.

ادبیات موجود نشان می‌دهد که افزایش سن با تخریب نورون‌های حرکتی در تارهای عضلانی نوع دو همراه است. از بین رفتن عصب تارهای عضلانی بیان پروتئولیزهای MuRF1 (۳۳)، تولید ROS میتوکندریایی (۳۰) را در عضله افزایش می‌دهد، از سوی دیگر، پائول و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که بیان TRAF6 در شرایط بدون عصب شدن افزایش می‌یابد و موش‌های فاقد TRAF6 در شرایط قطع عصب آتروفی کمتری را در تارهای عضلانی نسبت به موش‌های کنترل بدون عصب‌شده نشان دادند (۷). احتمالاً تمرین ورزشی استفاده‌شده در پژوهش حاضر از طریق بهبود وضعیت عصب‌رسانی، بیان TRAF6 و MuRF1 را کاهش داده است.

یافته‌های مطالعات دیگر نشان داد که بیان ژن لیگازهای E3 ویژه عضله مانند MuRF1 و MAFbx در عضلات بدون بارشده افزایش می‌یابد (۳۵-۳۸). نتایج پژوهش ما نیز همسو با یافته‌های مطالعات پیشین است. تنظیم افزایشی MuRF1 در این پژوهش همراه و همراستا با افزایش بیان ژن TRAF6 بود. TRAF6 فعال‌کننده مسیره‌های پیام‌رسانی است که در نهایت از طریق MuRF1 به آتروفی عضلانی منجر می‌شوند. در همین زمینه نشان داده شده است که تخریب MyHC به‌طور چشمگیری در عضلات بدون عصب‌شده موش‌های فاقد ژن TRAF6، متوقف می‌شود. این با گزارش‌هایی که دریافتند MuRF1 پروتئین‌های فیلامان‌های ضخیم شامل MyHC را در عضلات اسکلتی هدف قرار می‌دهد، سازگار است. پائول و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند حذف TRAF6 با کاهش بیان MuRF1 و MAFbx همراه است. این تنظیم کاهش‌ی MuRF1 از سوی TRAF6 می‌تواند نتیجه مهار مسیره‌های کاتابولیکی و رونویسی باشد، زیرا نشان داده شده است که حذف TRAF6 ویژه عضله موجب مهار فعال شدن مسیره‌های NFκB، AMPK، MAPK و JNK می‌شود (۳۹). نتایج این پژوهش هم نشان داد که بیان MuRF1 پس از کاهش فعالیت بدنی به شکل SNL افزایش یافته است و این همراستا با افزایش در TRAF6 بود.

NF- κ B، فاکتور رونویسی پیش‌التهابی است که با آتروفی عضلانی در وضعیت‌های بی‌حرکی ارتباط دارد. مهار NF- κ B آتروفی عضلانی را در پاسخ به سایتوکاین‌ها، رشد تومور، بدون عصب شدن و بدون بار شدن کاهش می‌دهد. NF- κ B از طریق افزایش بیان MuRF1 و چندی دیگر از اجزا مسیر یوبی کوئیتین پروتئازوم موجب آتروفی عضلانی می‌شود (۴۰، ۴۱). از این رو، TRAF6 که بالادست NF- κ B است، می‌تواند از این طریق بیان MuRF1 را در شرایط کاهش فعالیت بدنی از طریق SNL که در آن عضله اسکلتی بدون بار می‌شود، افزایش دهد.

افزایش بیان tweak/fn14 از سازوکارهای مولکولی درگیر در افزایش TRAF6 است. در همین زمینه گزارش شده است که TNF- α و tweak تأثیرات خود را از طریق TRAF6 بر آتروفی عضلانی اعمال می‌کنند (۴۲). مطالعات بسیاری گزارش کرده‌اند که در شرایط مختلف آتروفی عضلانی مانند بدون عصب شدن و بی‌تحرك کردن بیان tweak/fn14 افزایش می‌یابد (۴۳). در همین خصوص گزارش شده است که در شرایط بدون بار شدن، بیان fn14 به‌عنوان گیرنده tweak در عضلات اسکلتی بدون بار شده افزایش می‌یابد (۴۴).

سایتوکاین‌های التهاب‌آور مختلف برای فعال کردن مسیرهای پایین‌دستی NF κ B و MAPK که آتروفی عضلات اسکلتی را واسطه‌گری می‌کنند، نیازمند TRAF6 است (۴۵، ۹، ۸). در شرایط بدون بار شدن مکانیکی بیان پروتئین و TNF- α mRNA به‌ترتیب ۴ و ۳ برابر افزایش می‌یابد و این افزایش در TNF- α با افزایش دو برابری ژن‌های MAFbx و MuRF1 همراه بود (۳۶). می‌توان گفت که احتمالاً افزایش TRAF6 نتیجه افزایش بیان TNF- α در عضله اسکلتی موش‌های صحرایی بدون بار مکانیکی شده بوده که در نهایت به‌واسطه TRAF6 بیان MuRF1 افزایش یافته است (۴۶). از طرف دیگر در گروهی که فعالیت ورزشی شدید را قبل از SNL انجام دادند، بیان این ژن‌ها کاهش یافت. بنابراین انجام تمرینات تناوبی شدید می‌تواند سبب تخفیف در کاهش آتروژن‌های مذکور شود.

با توجه به یافته‌های این مطالعه که نشان داده شد بیان ژن‌های TRAF6 و MuRF1 که هر دو جزء ژن‌های آتروفیکی‌اند و در بسیاری از شرایط تحریک آتروفی موجب افزایش پروتئولیز عضلانی و در نتیجه کاهش توده عضلانی می‌شوند، این ژن‌ها در کاهش توده عضلانی ناشی از کاهش فعالیت عضله مثل شرایط بستری شدن و فزانوردی نقش دارند. از طرف دیگر، انجام تمرینات قبل از کاهش فعالیت بدنی توانسته از کاهش توده عضلانی تا حدی جلوگیری کند. همچنین تغییرات این ژن‌ها می‌تواند در افراد بی‌تحرك یا ورزشکارانی که پس از آسیب‌دیدگی دچار بی‌حرکی می‌شوند یا ورزشکارانی که به هر دلیل تمرین خود

را تعلیق می‌کنند، موجب آتروفی عضلانی شود. بنابراین، پژوهش حاضر نشان داد انجام تمرینات HIT قبل از بی‌فعالیتی ناشی از SNL می‌تواند روند آتروفی عضلانی را کندتر کند.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بیان ژن‌های TRAF6 و MuRF1 در عضله نعلی موش‌های تحت SNL افزایش یافته است که با کاهش توده عضله نعلی همراه بود. احتمالاً تمرین اینتروال شدید تا حدودی با افزایش فراخوانی تارهای کندانقباض همراه بوده و بیان این ژن‌ها را تعدیل کرده است. به‌علاوه با آتروفی عضلانی ناشی از بی‌باری مقابله می‌کند. بنابراین، در افرادی که به هر دلیل دچار محدودیت حرکتی می‌شوند، تمرینات HIT قبل از آسیب یا بدون بار کردن عضله نعلی می‌تواند آثار مخرب کاهش توده عضلانی در عضلات مؤثر در انجام کارهای زندگی روزمره و ابتلا به بیماری‌های متابولیکی را حتی در تارهای کندانقباض کاهش دهند.

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. پژوهش حاضر دارای کد اخلاق EC/93-9/KNRC از دانشگاه علوم پزشکی کرمان است.

منابع و مأخذ

1. Bize, R., J.A. Johnson, and R.C. Plotnikoff, Physical activity level and health-related quality of life in the general adult population: a systematic review. *Preventive medicine*, 2007. 45(6): p. 401-415.
2. Europe, W., Steps to health: a european framework to promote physical activity for health. Europe: WHO, 2007.
3. Warburton, D.E., C.W. Nicol, and S.S. Bredin, Health benefits of physical activity: the evidence. *Cmaj*, 2006. 174(6): p. 801-809.
4. Verhees, K.J., et al., Glycogen synthase kinase-3 β is required for the induction of skeletal muscle atrophy. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2011. 301(5): p. C995-C1007.
5. Fanzani, A., et al., Molecular and cellular mechanisms of skeletal muscle atrophy: an update. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, 2012. 3(3): p. 163-179.

6. Jespersen, J., et al., Myostatin expression during human muscle hypertrophy and subsequent atrophy: increased myostatin with detraining. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, 2011. 21(2): p. 215-223.
7. Paul, P.K., et al., Targeted ablation of TRAF6 inhibits skeletal muscle wasting in mice. *Journal of Cell Biology*, 2010. 191(7): p. 1395-1411.
8. Chung, J.Y., et al., Molecular basis for the unique specificity of TRAF6, in *TNF Receptor Associated Factors (TRAFs)*. 2007, Springer. p. 122-130.
9. Zapata, J.M., S. Lefebvre, and J.C. Reed, Targeting TRAFs for therapeutic intervention, in *TNF Receptor Associated Factors (TRAFs)*. 2007, Springer. p. 188-201.
10. Paul, P.K., et al., The E3 ubiquitin ligase TRAF6 intercedes in starvation-induced skeletal muscle atrophy through multiple mechanisms. *Molecular and cellular biology*, 2012. 32(7): p. 1248-1259.
11. Sun, H., et al., TRAF6 inhibition rescues dexamethasone-induced muscle atrophy. *International journal of molecular sciences*, 2014. 15(6): p. 11126-11141.
12. Gustafsson, T., et al., Effects of 3 days unloading on molecular regulators of muscle size in humans. *Journal of applied physiology*, 2010. 109(3): p. 721-727.
13. Aagaard, P., et al., Role of the nervous system in sarcopenia and muscle atrophy with aging: strength training as a countermeasure. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, 2010. 20(1): p. 49-64.
14. Sheffield-Moore, M., et al., Postexercise protein metabolism in older and younger men following moderate-intensity aerobic exercise. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2004. 287(3): p. E513-E522.
15. Raue, U., et al., 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*, 2006. 101(1): p. 53-59.
16. Gielen, S., et al., 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*, 2012. 125(22): p. 2716-2727.
17. Drey, M., et al., Motoneuron loss is associated with sarcopenia. *Journal of the American Medical Directors Association*, 2014. 15(6): p. 435-439.
18. Glass, D.J., Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nature cell biology*, 2003. 5(2): p. 87-90.
19. Aguiar, A., et al., High-intensity physical exercise disrupts implicit memory in mice: involvement of the striatal glutathione antioxidant system and intracellular signaling. *Neuroscience*, 2010. 171(4): p. 1216-1227.
20. Nytrøen, K., et al., High-Intensity Interval Training Improves Peak Oxygen Uptake and Muscular Exercise Capacity in Heart Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation*, 2012. 12(11): p. 3134-3142.

21. Gillen, J.B., et al., Three minutes of all-out intermittent exercise per week increases skeletal muscle oxidative capacity and improves cardiometabolic health. *PLoS One*, 2014. 9(11): p. e111489.
22. Laursen, P.B. and D.G. Jenkins, The scientific basis for high-intensity interval training. *Sports Medicine*, 2002. 32(1): p. 53-73.
23. Miyamoto-Mikami, E., et al., Gene expression profile of muscle adaptation to high-intensity intermittent exercise training in young men. *Scientific reports*, 2018. 8(1): p. 1-14.
24. Winter, B., et al., High impact running improves learning. *Neurobiology of learning and memory*, 2007. 87(4): p. 597-609.
25. Aguiar, A.S., et al., Downhill training upregulates mice hippocampal and striatal brain-derived neurotrophic factor levels. *Journal of neural transmission*, 2008. 115(9): p. 1251-1255.
26. Kim, S.H. and J.M. Chung, An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain*, 1992. 50(3): p. 355-363.
27. Hafstad, A.D., et al., High intensity interval training alters substrate utilization and reduces oxygen consumption in the heart. *Journal of Applied Physiology*, 2011. 111(5): p. 1235-1241.
28. Tal, M. and G.J. Bennett, Extra-territorial pain in rats with a peripheral mononeuropathy: mechano-hyperalgesia and mechano-allodynia in the territory of an uninjured nerve. *Pain*, 1994. 57(3): p. 375-382.
29. Nilwik, R., et al., The decline in skeletal muscle mass with aging is mainly attributed to a reduction in type II muscle fiber size. *Experimental gerontology*, 2013. 48(5): p. 492-498.
30. Muller, F.L., et al., Denervation-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased mitochondrial ROS production. *American journal of physiology-Regulatory, integrative and comparative physiology*, 2007. 293(3): p. R1159-R1168.
31. Rowan, S.L., et al., Denervation causes fiber atrophy and myosin heavy chain co-expression in senescent skeletal muscle. *PloS one*, 2012. 7(1): p. e29082.
32. Verdijk, L.B., et al., Satellite cell content is specifically reduced in type II skeletal muscle fibers in the elderly. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2007. 292(1): p. E151-E157.
33. Bonaldo, P. and M. Sandri, Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Disease models & mechanisms*, 2013. 6(1): p. 25-39.
34. Sandri, M., et al., Signalling pathways regulating muscle mass in ageing skeletal muscle. The role of the IGF1-Akt-mTOR-FoxO pathway. *Biogerontology*, 2013. 14(3): p. 303-323.
35. Labeit, S., et al., Modulation of muscle atrophy, fatigue and MLC phosphorylation by MuRF1 as indicated by hindlimb suspension studies on MuRF1-KO mice. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010. 2010.
36. Al-Nassan, S., et al., Chronic exercise training down-regulates TNF- α and atrogen-1/MAFbx in mouse gastrocnemius muscle atrophy induced by hindlimb unloading. *Acta Histochemica et Cytochemica*, 2012. 45(6): p. 343-349.

37. Labeit, S., et al., Modulation of muscle atrophy, fatigue and MLC phosphorylation by MuRF1 as indicated by hindlimb suspension studies on MuRF1-KO mice. *BioMed Research International*, 2010. 2010.
38. Polge, C., et al., UBE2D2 is not involved in MuRF1-dependent muscle wasting during hindlimb suspension. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2016. 79: p. 488-493.
39. Paul, P.K., et al., Targeted ablation of TRAF6 inhibits skeletal muscle wasting in mice. *The Journal of cell biology*, 2010. 191(7): p. 1395-1411.
40. Cai, D., et al., IKK β /NF- κ B activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell*, 2004. 119(2): p. 285-298.
41. Li, H., S. Malhotra, and A. Kumar, Nuclear factor-kappa B signaling in skeletal muscle atrophy. *Journal of molecular medicine*, 2008. 86(10): p. 1113-1126.
42. Bilodeau, P.A., E.S. Coyne, and S.S. Wing, The ubiquitin proteasome system in atrophying skeletal muscle: roles and regulation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2016. 311(3): p. C392-C403.
43. Mittal, A., et al., The TWEAK-Fn14 system is a critical regulator of denervation-induced skeletal muscle atrophy in mice. *The Journal of cell biology*, 2010. 188(6): p. 833-849.
44. Wu, C.-L., S.C. Kandarian, and R.W. Jackman, Identification of genes that elicit disuse muscle atrophy via the transcription factors p50 and Bcl-3. *PLoS one*, 2011. 6(1): p. e16171.
45. Sadri, S., G. Sharifi, and K.J. Dehkordi, Effects of high intensity interval training (up&downward running) with BCAA/nano chitosan on Foxo3 and SMAD soleus muscles of aging rat. *Life Sciences*, 2020: p. 117641.
46. Kazemi, A. and E. Jahanshahi, Effect of Spinal Nerve Ligation on The Expression of Tweak and Fn14 Genes in EDL Muscle of Wistar Rats After HIT Training.

Effect of Spinal Nerve Ligation (SNL) on the expression of TRAF6 and MuRF1 genes in soleus muscle of Wistar rats after HIT training

Abdolreza Kazemi**1 - Alireza Saied²

1. Associate in exercise physiology, Dept of Physical Education, Faculty of Letters and Humanities, Vali E-Asr University, Rafsanjan, Iran 2.a)

M.Sc in exercise physiology, Dept of Physical Education, Faculty of Letters and Humanities, Islamic Azad University Kerman Branch, Kerman, Iran, b). Center Research physiology Medical Sciences, Kerman, Iran

(Received :2020/04/18 ; Accepted: 2020/09/28)

Abstract

The purpose of the present study was to investigate the effect of Spinal Cord nerve Ligation on the expression of TRAF6 and muRF1 genes in the Soleus muscle of Wistar rats after HIT training. For this purpose, 24 male Wistar rats were divided into 2 groups of control (C) (n=12) and training (HIT) (n=12). After one-week familiarization, training group participate in four HIT training. Then, they were randomly assigned to HIT (n=6) and HIT-SNL (n=6) groups. At the same time, the control group was divided into two groups: control (C) (n=6) and spinal cord nerve (C-SNL) (n=6). Four weeks after the SNL, Wistar rats were sacrificed and soleus muscle extracted. Then Gene expressions of MuRF1 and TRAF6 measured with Real time PCR technique. The results showed that inactivity by SNL has a significant effect on the expression of TRAF6 and MuRF1 genes ($P=0.0001$ and $P=0.0001$, respectively). Also, performed HIIT training before SNL reduced the expression of TRAF6 and MuRF1 ($P=0.003$ and $P=0.0001$ respectively). In addition, the findings indicated that SNL had a significant effect on the weight of Soleus muscle mass/ tibia length ($P=0.01$). On the other hand, HIT training before SNL significantly increased weight of Soleus muscle mass/ tibia length ($P = 0.03$). Therefore, the decrease in activity by SNL is associated with increased in expression of TRAF6 and MuRF1 genes, which may also be involved in muscle mass changes. Regarding the fact that performing HIT reduces the expression of these genes in soleus muscle, these training could be used to maintain optimal muscle mass before physical activity.

Keywords

High intensity interval training, Spinal Nerve Ligation, MuRF1, TRAF6 and

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