دانشگاه شهید بهشتی

فیزیولوژی ورزش و فعالیت بدنی

پاییز و زمستان ۱۳۹۹، دوره ۱۳، شماره ۲، صفحه‌های: ۷۴-۶۷

اثر تعلیق مکانیکی اندام تحتانی بر بیان ژن‌های TRAF۶ و MuRF۱ در عضلهٔ نعلی موش‌های صحرایی نر ویستار

عبدالرضا کاظمی*، زهرا معصوم پور[۲]، امیربهادر دخیلی[۳]، علیرضا زنگی‌آبادی[۲]، ایمان فتحی[۱]

۱ گروه علوم ورزشی، دانشکدهٔ ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان، رفسنجان، ایران.
۲ گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکدهٔ ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران.
۳ گروه علوم ورزشی، دانشکدهٔ ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
نویسندهٔ مسئول: عبدالرضا کاظمی، شمارهٔ تماس: ۰۳۴۳۱۳۱۲۱۰۲ رایانامه: a.kazemi@vru.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰۶/۱۹ ویرایش مقاله: ۱۳۹۸/۰۵/۱۹ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۷/۰۱

چکیده

هدف: به‌دلیل ابهامات موجود در زمینهٔ فرایندهای رشد و حفظ عضلات اسکلتی به‌ویژه آتروفی ناشی از بی‌تحرکی، مطالعهٔ حاضر، به‌منظور بررسی تأثیرات تعلیق مکانیکی اندام تحتانی بر بیان ژن‌های آتروژنیکی در عضلهٔ نعلی موش‌های صحرایی انجام گرفت.

روش‌ها: بدین‌منظور ۱۰ سر موش صحرایی نژاد ویستار در دو گروه تعلیق (n=۵) و کنترل (n=۵) قرار گرفتند و موش‌های صحرایی گروه تعلیق به مدت دو هفته در همین شرایط نگه‌داشته شدند. پس از ۱۴ روز عضلهٔ نعلی آن‌ها استخراج گردید و بیان ژن‌های TRAf6 و MuRF1 به روش real-time-Pcr اندازه‌گیری شد.

نتایج: نتایج نشان داد که پس از ۱۴ روز تعلیق اندام تحتانی وزن نسبی عضلهٔ نعلی به‌طور معناداری کاهش یافته بود (P=۰/۰۰۹). به‌علاوه، بیان ژن TRAF6 (P=۰/۰۳۳) به‌طور معناداری افزایش یافته بود، ولی افزایش MuRF1 به لحاظ آماری معنادار نبود (P=۰/۰۶۱).

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج پژوهش حاضر می‌توان گفت که TRAF6 و عامل پایین‌دست آن، MuRF1 می‌توانند در تنظیم تودهٔ عضلانی در شرایط کاهش فعالیت عصبی عضلانی و تعلیق اندام‌ها درگیر باشند و به‌عنوان عامل منتخب مقابله با کاهش تودهٔ عضلانی در وضعیت‌هایی مانند بستری شدن ورزشکاران پس از آسیب‌های ورزشی یا کاهش بار اندام پس از آسیب دیدگی درنظر گرفته شوند.

واژه‌های کلیدی: آتروفی عضلانی، تعلیق اندام تحتانی، ژن‌های آتروژنیک.

مقدمه

کاهش توده عضلانی یا آتروفی عضلانی زمانی اتفاق می‌افتد که تخریب پروتئین بیش از سنتز آن باشد (۱، ۲). هرچند آتروفی پیامد فرایندهای فیزیولوژیکی معینی (مانند پیری) 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 کیفیت زندگی پایین، ناتوانی در انجام کارهای روزانه، خستگی و ایجاد بیماری‌های ثانویه مانند پوکی استخوان و دیابت را موجب 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 ویژگی می‌یابد (۱). عضله اسکلتی، بافت تغییرپذیر است که با توجه به سطح فعالیت خود (بار مکانیکی در مقابل غیرفعال بودن) از طریق تغییر در توده عضله، بیان پروتئین‌های عضلانی و تغییر در نوع تار به لحاظ انقباضی و متابولیکی، سازگار می‌شود. براساس شواهد موجود دسته‌ای از رویدادها در عضله اسکلتی اتفاق می‌افتد تا بتوانند تعادل خالص پروتئینی را از طریق کنترل سنتز و تجزیه پروتئین حفظ کنند (۳، ۴).

فرایندهای رشد و حفظ عضله به‌وسیله آبشارهای پیام‌رسانی (سیگنالینگ[1]) درون‌سلولی کنترل‌کننده رونویسی و ترجمه پروتئین، تنظیم می‌شوند. نشان داده شده است که تعلیق مکانیکی در جوندگان موجب کاهش توده عضلانی، سطح مقطع عرضی میوفیبریل‌ها (CSA) و تولید نیرو می‌شود. به‌دنبال آن بارگذاری مجدد، آبشاری از رویدادها شامل آسیب‌های خفیف عضلانی، التهاب، بازسازی و رشد را تحریک می‌کند که در نتیجه موجب بازیافت توده عضلانی و CSA می‌شود (۵، ۶). بنابراین، شناخت سازوکارهای درگیر در آتروفی و بازسازی عضله به توسعه روش‌های درمانی جدید برای مقابله با وضعیت‌ها و بیماری‌های مانند دیستروفی عضلانی، آتروفی ناشی از بی‌تحرکی و پیری کمک خواهد کرد (۷، ۸).

هرچند اغلب تجزیه پروتئین‌های سلولی از طریق مسیرهای اصلی شامل پروتئازهای سیستئین وابسته به کلسیم (کالپین‌ها[2])، پروتئاز اسید آسپارتیک-سیستئین (کاسپیزها[3])، اتوفاژی-لیزوزومی[4] و مسیر یوبی‌کوئیتین پروتئازوم[5] واسطه‌گری می‌شوند، بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که تجزیه پروتئین از مسیر اتوفاژی- لیزوزمی[6] و مسیر یوبی‌کوئیتین، نقش شایان توجهی در آتروفی عضلانی دارد (۹). در وضعیت‌های کاتابولیکی مختلف، آتروفی عضله اسکلتی ناشی از فعال شدن دستگاه پایین‌دستی یوبی‌کوئیتین پروتئازوم وابسته به ATP است (۱۰). دو لیگاز یوبی کوئیتین E3 شامل muRF1 و MAFbx (همچنین آتروژین۱ نامیده می‌شود) در الگوهای مختلف آتروفی عضلات اسکلتی در هر دو جوندگان و انسان تنظیم افزایشی می‌یابند (۱۰). براساس پیشینه پژوهش پس از سه روز عدم تحمل وزن در اندام تحتانی، فرایندهای پروتئولیز داخل‌عضلانی فعال می‌شوند (۱۱) و این همراستا با افزایش بیان ژن‌های درگیر در مسیر یوبی‌کوئیتین پروتئازوم از قبیل MuRF1 و آتروژین۱ است (۱۲).

عوامل مرتبط با گیرنده عامل نکروز تومور (TRAFs) شامل خانواده پروتئین‌های آداپتور حفاظت‌شده درگیر در فعال شدن آبشارهای پیام‌رسانی مختلفی هستند (۱۰) که دامنه وسیعی از فرایندهای فیزیولوژیکی شامل ایمنی ذاتی، ایمنی سازشی، متابولیسم استخوان و غیره نقش دارند (۱۳). در میان پروتئین‌های شناخته‌شده این خانواده، پروتئین آداپتور گیرنده TNF (TRAF6) چندین ویژگی مجزا دارد که با سایر اعضای خانواده TRAF به اشتراک گذاشته نشده‌اند. TRAF6 در مرکز فعال‌سازی مسیرهای پیام‌رسانی مختلف شامل MAPK، NF-κB و فسفاتیدیل اینوزیتول ۳-کیناز/ AKT در پاسخ به سایتوکاین‌ها و محصولات میکروبی است (۱۰). مشخص شده است که TRAF6 تنظیم‌کننده اصلی در آتروفی عضله اسکلتی در هر دو تحریک فیزیولوژیکی (بدون عصب شدن) و پاتولوژیکی (کاشکسی سرطان) است (۱۰).

یکی از سازوکارهایی که TRAF6 در عضلات بدون عصب‌شده موجب تخریب پروتئین‌های عضله می‌شود، از طریق افزایش بیان هر دو MAFbx و MuRF1 است. در همین زمینه نشان داده شده است که تخریب MyHC به‌طور چشمگیری در عضلات بدون عصب‌شده موش‌های فاقد ژن TRAF6، متوقف می‌شود و این با گزارش‌هایی که دریافتند MuRF1 پروتئین‌های فیلامان‌های ضخیم شامل MyHC را در عضلات اسکلتی هدف قرار می‌دهد، همراستاست (۱۰). علاوه‌بر این، پائول و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که در شرایط آتروفی ناشی از گرسنگی TRAF6 هم با افزایش بیان لیگازهای یوبی‌کوئیتینی در کاهش توده

عضلانی نقش دارد، به‌طوری‌که نشان داده شده است بیان هر دو MAFbx و MuRF1 به‌طور چشمگیری در موش‌های فاقد ژن TRAF6 تنظیم کاهشی می‌یابد (۱۰). همچنین نشان داده شده است که TRAF6 و مولکول‌های پیام‌رسانی پایین‌دست آن شامل MuRF1 و MAFbx در آتروفی عضلانی ناشی از دگزامتازون در هر دو محیط in vitro و in vivo تنظیم افزایشی یافته و افزایش در این عوامل با کاهش در سطح مقطع تارهای عضلانی (CSA) همراه است (۱۳).

همان‌طورکه اشاره شد، تعلیق مکانیکی و بی‌وزنی مانند وضعیت فضانوردان و افراد بیمار در بستر، از شرایطی است که کاهش توده عضلانی در آن بارز است، اما تا به حال نقش TRAF6 در آتروفی ناشی از تعلیق مکانیکی 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 بی‌تحرکی و پیری کمک خواهد کرد. شواهد بسیار قوی نشان می‌دهد که اندازه عضله از طریق تعادل بین سنتز و تخریب پروتئین مشخص می‌شود (۱۴). بنابراین، با توجه به کاهش توده عضلانی در شرایط بی‌باری و تعلیق مکانیکی و نقش TRAF6 و MuRF1 در برخی از الگوهای آتروفی عضلانی، این سؤال پیش می‌آید که آیا بیان ژن‌های TRAF6 و MuRF1 در شرایط تعلیق مکانیکی تغییر خواهد کرد و با تغییر در وزن عضله همسو هستند؟ ازاین‌رو، هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی اثر ۲ هفته تعلیق مکانیکی اندام تحتانی بر بیان ژن‌های TRAF6 و MuRF1 در عضله نعلی موش‌های صحرایی نر ویستار است.

روش پژوهش

نمونه‌های پژوهش

در مطالعه تجربی آزمایشگاهی حاضر، ۱۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار، ۶ هفته‌ای از مرکز فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی کرمان خریداری شده و به مدت ۴ هفته در حیوان خانه نگهداری شدند. پس از دو هفته آشناسازی (با میانگین وزن ۹۵ /۴±۴۵ /۳۲۰ گرم) به‌طور تصادفی در دو گروه (n=۱۰) تعلیق اندام تحتانی (HS) و تحمل وزن (WB) قرار گرفتند و پروتکل اجرا شد. حیوانات در شرایط دمایی ۳±۲۲ درجه سانتی‌گراد و چرخه تاریکی- روشنایی ۱۲:۱۲ ساعت (شروع چرخه بیداری ساعت ۱۷) و با دسترسی آزاد به آب و غذای ویژه موش نگهداری شدند. تمامی اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی و زیر نظر مرکز فیزیولوژی رعایت شد (کد اخلاق KNRC/۹۳-۹/EC).

پروتکل پژوهش

به‌منظور حذف بار مکانیکی اندام تحتانی، از روش تعلیق اندام تحتانی به شکل دائمی استفاده شد (۱۵). با استفاده از چسب‌های ارتوپدی و حلقه فلزی، یک‌سوم دیستال دم موش‌های صحرایی به میله‌های فلزی بالای قفس متصل شد و ارتفاع تعلیق به اندازه‌ای بود که اندام تحتانی حیوانات با هیچ سطح حمایتی تماس پیدا نکند (تقریباً ۳۰ درجه). دست‌های حیوان برای حرکت و دسترسی آزادانه به غذا و آب با کف قفس تماس داشت و به مدت ۲ هفته در این حالت تعلیق قرار داشتند. هر موش صحرایی در قفس‌هایی جداگانه نگهداری شده و سلامت موش‌ها روزانه بررسی می‌شد، همچنین از طبیعی بودن رنگ دم موش‌ها که نشان‌دهنده گردش خون طبیعی بود، اطمینان حاصل می‌شد. در پایان هفته اول مقدار غذای مصرفی هر موش صحرایی به‌صورت جداگانه اندازه‌گیری شد. یک سر موش صحرایی در گروه HS که کمتر از بقیه غذا مصرف کرده بود (به‌صورت نسبی،) از مطالعه خارج شد.

استخراج بافت: پس از ۱۴ روز قرار گرفتن در شرایط تعلیق، موش‌های صحرایی با اتر بی‌هوش شده و بلافاصله وزن‌کشی شدند و سپس در شرایط کاملاً استریل و با استفاده از تیغ جراحی و ایجاد برش در قسمت خلفی ساق پای حیوانات، عضله نعلی به‌عنوان عضله کندانقباض با قطع تاندون پروگزیمال و دیستال استخراج شده و با ترازوی آزمایشگاهی (دقت ۰۰۰۱ /۰؛ AND مدل GR ساخت ژاپن) وزن شد و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد شد و تا انجام آزمایش‌های سلولی و مولکولی در یخ‌زن ۸۰- نگهداری شد.

روش آزمایشگاهی

استخراج RNA و سنتز cDNA و Real time - PCR: به‌منظور استخراج total RNA از عضله نعلی به نسبت ۱ به ۱۰ در QIAzol Lysis Reagent هموژن شد. به‌منظور برداشتن اجزای پروتئینی، محصول در ۴ ℃، ۱۰ min، ۱۲۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. سپس به نسبت ۱ به ۵ /۰ با کلروفرم مخلوط شده و به مدت ۱۵ ثانیه به‌شدت تکان داده شد. محصول در ۴ ℃، ۱۵ min، ۱۲۰۰۰ g سانتریفیوژ شده و بخش معدنی و آبی از هم

جدا شدند. بخش محتوی RNA برداشته شده و با نسبت ۱ به ۰/۵ با ایزوپروپانول مخلوط شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق رها و سپس در ۴ °C، ۱۰ min، ۱۲۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. Pellet حاوی RNA در اتانول شست‌وشو شده و در ۲۰ µL آب RNAS-Free حل شد. غلظت RNA (با استفاده از دستگاه Eppendorff, Germany) سنجش شد و نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ به‌عنوان تخلیص مطلوب تعریف شد. سنتز cDNA با استفاده از ۱ µg از RNA و با استفاده از کیت سنتز cDNA ساخت فرمنتاز و آنزیم Mulv Reverse transcriptase انجام گرفت.

به‌منظور اندازه‌گیری سطوح بیان ژن‌های TRAF6، MuRF1 از روش نیمه‌کمی Real time-PCR با استفاده از Primix syber green II انجام گرفت (USA Applied Biosystems). مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۰ µL و هر واکنش به‌صورت duplicate صورت پذیرفت. برنامه دمایی مور داستفاده در Real time-PCR شامل مرحله دناتوراسیون ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، مرحله انلینگ ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و بسط ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه (تکرار ۴۰ سیکل) بود. میزان بیان ژن‌های موردنظر نیز با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ اندازه‌گیری شد.

طراحی و توالی پرایمرها: طراحی پرایمرها براساس اطلاعات ژن‌های TRAF6، MuRF1 و GAPDH در بانک ژنی NCBI و توسط شرکت ماکرو ژن (Macrogen Inc. Seoul, Korea) انجام گرفت (جدول ۱). توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ گزارش شده است، ضمن اینکه از GAPDH به‌عنوان ژن کنترل استفاده شد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر

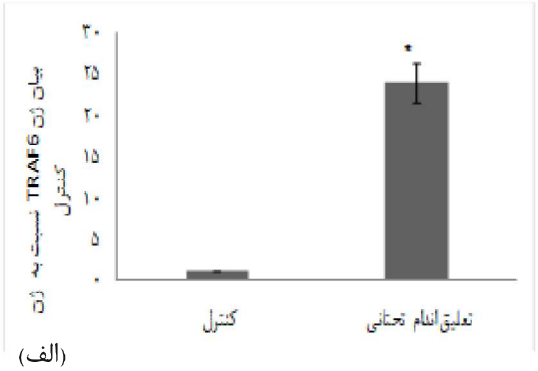
ژن‌ها	توالی پرایمر
TRAF6	F=ATGACCACAGTCTTACAAACC R=GCTGAAGTTCTCATCTACTCCC
MuRF1	F=TACAGTACATTGCCCCTTTC R=GTTCATTGACCTGCCCACT
GAPDH	F=5'GACATGCCGCCTGGAGAAAC3' R=5'AGCCCAGGATGCCTTTAGT3'

تحلیل آماری

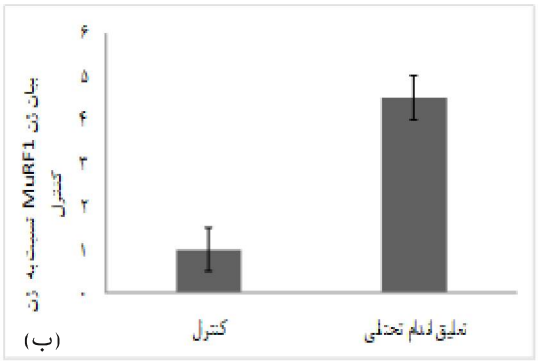
در بخش آمار توصیفی از شاخص‌های پراکندگی انحراف معیار، میانگین و نمودار استفاده شد. در بخش آمار استنباطی به‌منظور تعیین نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون کولموگروف - اسمیرنوف (KS) استفاده شد. همچنین همسان بودن واریانس‌ها با آزمون Leven سنجیده شد. به‌منظور تعیین معنادار بودن تفاوت بین متغیرها از آزمون آماری تی مستقل و برای تجزیه‌وتحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS ویراست ۲۰ استفاده شد (سطح معناداری ۰/۰۵).

نتایج

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که پس از ۱۴ روز تعلیق اندام تحتانی، وزن نسبی عضله نعلی ($mg^{-1} \times 100 g$) به‌طور شایان توجهی نسبت به گروه کنترل کاهش داشت (P=۰/۰۰۹) (شکل ۲). همچنین، نتایج آزمون تی مستقل نشان داد که بیان ژن TRAF6 (P=۰/۰۳۳) به‌طور چشمگیری در عضله نعلی موش‌های صحرایی گروه تعلیق اندام تحتانی تفاوت بیشتری داشت (شکل ۱ الف). با این حال، تفاوت بیان MuRF1 (P=۰/۰۶۱) عضله نعلی گروه تعلیق مکانیکی و گروه کنترل به لحاظ آماری معنادار نبود (شکل ۱ ب).



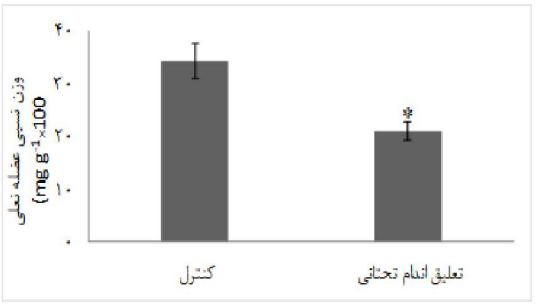
(الف)



(ب)

شکل ۱. بیان ژن TRAF6 (الف) و MuRF1 (ب) در عضلهٔ نعلی متعاقب تعلیق مکانیکی اندام تحتانی.

*** تفاوت معنادار نسبت به گروه کنترل (P<۰/۰۵) فقط در بیان ژن MuRF1**



شکل ۲. وزن نسبی عضلهٔ نعلی ($mg^{-1}xg$ ۱۰۰) در موش‌های صحرایی متعاقب ۱۴ روز تعلیق مکانیکی اندام تحتانی

*** تفاوت معنادار نسبت به گروه کنترل ($P<0/05$)**

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که ۱۴ روز تعلیق (آویزان کردن) اندام تحتانی، ممکن است موجب کاهش وزن نسبی عضله و افزایش بیان ژن‌های TRAF6 و MuRF1 در عضله نعلی شود.

در کل، عضله اسکلتی فراوان‌ترین بافت در بدن مهره‌داران است، که در عملکردهای مختلفی مانند برداشت گلوکز نقش دارد و می‌تواند پس از آسیب بازسازی شود و ذخیره اصلی پروتئین در بدن است (۱، ۴). به‌علاوه، عضله اسکلتی بافت تغییرپذیر است که با توجه به سطح فعالیت خود (بار مکانیکی در مقابل غیرفعال بودن) از طریق تغییر در توده عضله، بیان پروتئین‌های عضلانی و تغییر در نوع تار به لحاظ انقباضی و متابولیکی سازگار می‌شود. براساس شواهد در دسترس دسته‌ای از رویدادها در عضله اسکلتی اتفاق می‌افتد تا بتوانند تعادل خالص پروتئینی را از طریق کنترل کردن سنتز و تجزیه پروتئین حفظ کنند (۳، ۴).

یافته‌های بسیاری از مطالعات نشان می‌دهند که بیان ژن لیگازهای E3 ویژه عضله مانند MuRF1 و MAFbx در عضلات بدون بارشده افزایش می‌یابد (۱۶-۱۸). نتایج پژوهش حاضر نیز همسو با یافته‌های مطالعات پیشین است. تنظیم افزایشی MuRF1 در این پژوهش همراه و همراستا با افزایش بیان ژن TRAF6 بود. TRAF6 فعال‌کننده مسیرهای پیام‌رسانی است که در نهایت از طریق MuRF1 سبب آتروفی عضلانی می‌شوند. در همین زمینه نشان داده شده است که تخریب MyHC به‌طور شایان توجهی در عضلات بدون عصب‌شده موش‌های فاقد ژن TRAF6، متوقف می‌شود و این با گزارش‌هایی که دریافتند MuRF1 پروتئین‌های فیلامان‌های ضخیم شامل MyHC را در عضلات اسکلتی هدف قرار می‌دهد، همسوست. 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 مسیرهای کاتابولیکی و رونویسی باشد، زیرا نشان داده شده است که حذف TRAF6 ویژه عضله موجب مهار فعال شدن مسیرهای NFκB، AMPK، MAPK و JNK می‌شود (۱۰). نتایج این پژوهش هم نشان داد که بیان MuRF1 پس از ۱۴ روز بدون بار شدن افزایش یافته است و این همراستا با افزایش در TRAF6 بود.

NF-κB، عامل رونویسی پیش‌التهابی است که با آتروفی عضلانی در وضعیت‌های بی‌تحرکی ارتباط دارد. مهار NF-κB آتروفی عضلانی را در پاسخ به سایتوکاین‌ها، رشد تومور، بدون عصب شدن و بدون بار شدن کاهش می‌دهد (۱۹، ۲۰). NF-κB از طریق افزایش بیان MuRF1 و چندی دیگر از اجزا مسیر یوبی کوئیتین پروتئازوم موجب آتروفی عضلانی می‌شود (۱۹، ۲۰). ازاین‌رو، TRAF6 که بالادست NF-κB است، می‌تواند از این طریق بیان MuRF1 را در شرایط تعلیق اندام تحتانی که عضله اسکلتی بدون بار می‌شود، افزایش دهد.

افزایش بیان tweak/fn۱۴ از سازوکارهای مولکولی درگیر در افزایش TRAF6 است. در همین زمینه گزارش شده است که TNF-α و tweak تأثیرات خود را بر آتروفی عضلانی از طریق TRAF6 اعمال می‌کنند (۲۱). مطالعات بسیاری گزارش کرده‌اند که در شرایط مختلف آتروفی عضلانی مانند بدون عصب شدن و بی‌تحرک کردن بیان tweak/fn14 افزایش می‌یابند (۲۲). در همین زمینه گزارش شده است که در شرایط بدون بار شدن بیان fn14 به‌عنوان گیرنده tweak در عضلات اسکلتی بدون بارشده افزایش می‌یابد (۲۳).

سایتوکاین‌های پیش‌التهابی مختلف برای فعال کردن مسیرهای پایین‌دستی NFκB و MAPK که آتروفی عضلات اسکلتی را واسطه‌گری می‌کنند، نیازمند TRAF6 است (۲۴، ۲۵). الحسن و همکاران (۲۰۱۲) دریافتند که در شرایط تعلیق مکانیکی، بیان پروتئین و mRNA TNF-α به‌ترتیب ۴ و ۳ برابر افزایش می‌یابد و این افزایش در TNF-α با افزایش دو برابری ژن‌های MAFbx و MuRF1 همراه بود (۱۶). با توجه به نتایج می‌توان گفت که احتمالاً افزایش TRAF6 نتیجه افزایش بیان TNF-α در عضله اسکلتی موش‌های صحرایی، تعلیق مکانیکی شده بود که در نهایت به‌واسطه TRAF6 بیان MuRF1 افزایش یافته است.

فیزیولوژی ورزش و فعالیت بدنی

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 بار مکانیکی عضله مانند شرایط بستری شدن و فضانوردی نقش دارند. همچنین با توجه به اینکه روش تعلیق اندام تحتانی الگوی کاهش فعالیت عصبی عضلانی است، تغییرات این ژن‌ها می‌تواند در افراد بی‌تحرک یا ورزشکارانی که پس از آسیب‌دیدگی دچار بی‌تحرکی می‌شوند یا ورزشکارانی که به هر دلیل تمرین خود را تعلیق می‌کنند، موجب آتروفی عضلانی شود. بنابراین، مهار این ژن‌ها با روش‌های فارماکولوژیکی احتمالا به این دسته از افراد که در بالا اشاره شد، کمک می‌کند تا توده عضلانی خود را حفظ کنند؛ هرچند این مسئله نیازمند مطالعات بیشتری است. شایان ذکر است یکی از محدودیت‌های پژوهش حاضر عدم اندازه‌گیری پروتئین ژن‌های مورد اندازه‌گیری است، زیرا اندازه‌گیری پروتئین شاخص مناسب‌تری نسبت به اندازه‌گیری بیان ژن است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد است. ایده پژوهش و انجام آزمایش‌ها و نگارش مقاله به عهده استاد راهنما و جمع‌آوری نمونه‌ها به عهده دانشجوی محترم بوده است. بدین‌وسیله از تمامی کسانی که ما را در این پژوهش یاری کردند، تقدیر و تشکر می‌شود.

پی‌نوشت‌ها

1. Calpains
2. Caspase
3. Autophagy Lysosome
4. Ubiquitin Proteasome Pathway

منابع

[1] Fanzani A, Conraads VM, Penna F, Martinet W. Molecular and cellular mechanisms of skeletal muscle atrophy: an update. Journal of cachexia, sarcopenia and muscle. 2012;3(3):163-79.

[2] Verhees KJ, Schols AM, Kelders MC, Op den Kamp CM, van der Velden JL, Langen RC. Glycogen synthase kinase-3β is required for the induction of skeletal muscle atrophy. American Journal of Physiology-Cell Physiology. 2011;301(5):C995-C1007.

[3] Baldwin KM, Haddad F, Pandorf CE, Roy RR, Edgerton VR. Alterations in muscle mass and contractile phenotype in response to unloading models: role of transcriptional /pre-translational mechanisms. Front Physiology. 2013 11;4:284.

[4] Rodriguez J, Vernus B, Chelh I, Cassar-Malek I, Gabillard J-C, Sassi AH, et al. Myostatin and the skeletal muscle atrophy and hypertrophy signaling pathways. Cellular and molecular life sciences. 2014;71(22):4361-71.

[5] Adams GR, Caiozzo VJ, Baldwin KM. Skeletal muscle unweighting: spaceflight and ground-based models. Journal of applied physiology. 2003;95(6):2185-201.

[6] Fitts RH, Riley DR, Widrick JJ. Physiology of a microgravity environment invited review: microgravity and skeletal muscle. Journal of applied physiology. 2000;89(2):823-39.

[7] Rennie MJ, Wackerhage H, Spangenburg EE, Booth FW. Control of the size of the human muscle mass. Annu Rev Physiol. 2004;66:799-828.

[8] Chopard A, Hillock S, Jasmin BJ. Molecular events and signalling pathways involved in skeletal muscle disuse□induced atrophy and the impact of countermeasures. Journal of cellular and molecular medicine. 2009;13(9b):3032-50.

[9] Bialek P, Morris C, Parkington J, St. Andre M, Owens J, Yaworsky P, et al. Distinct protein degradation profiles are induced by different disuse models of skeletal muscle atrophy. Physiological genomics. 2011;43(19):1075-86.

[10] Paul PK, Gupta SK, Bhatnagar S, Panguluri SK, Darnay BG, Choi Y, et al. Targeted ablation of TRAF6 inhibits skeletal muscle wasting in mice. The Journal of cell biology. 2010;191(7):1395-411.

[11] Tesch PA, von Walden F, Gustafsson T, Linnehan RM, Trappe TA. Skeletal muscle proteolysis in response to short-term unloading in humans. Journal of applied physiology. 2008;105(3):902-6.

[12] Gustafsson T, Osterlund T, Flanagan JN, von Walden F, Trappe TA, Linnehan RM, et al. Effects of 3 days unloading on molecular regulators of muscle size in humans. Journal of applied physiology. 2010;109(3):721-7.

[13] Sun H, Gong Y, Qiu J, Chen Y, Ding F, Zhao Q. TRAF6 inhibition rescues dexamethasone-induced muscle atrophy. International journal of molecular sciences. 2014;15(6):11126-41.

[14] Glass DJ. Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. Nature cell biology. 2003;5(2):87.

[15] Morey-Holton ER, Globus RK. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. Journal of applied physiology. 2002;92(4):1367-77.

ulation. American Journal of Physiology-Cell Physiology. 2016;311(3):C392-C403.

[22] Sato S, Ogura Y, Kumar A. TWEAK/Fn14 Signaling Axis Mediates Skeletal Muscle Atrophy and Metabolic Dysfunction Front Immunol. 2014 Jan 27;5:18.

[23] Tajrishi MM, Zheng TS, Burkly LC, Kumar A. The TWEAK-Fn14 pathway: a potent regulator of skeletal muscle biology in health and disease. Cytokine Growth Factor Rev. 2014 Apr;25(2):215-25.

[24] Walsh MC, Lee J, Choi Y. Tumor necrosis factor receptor- associated factor 6 (TRAF6) regulation of development, function, and homeostasis of the immune system. Immunol Rev. 2015;266(1):72-92.

[25] Umasuthan N, Bathige SD, Revathy KS, Nam BH, Choi CY, Lee J. Molecular genomic- and transcriptional-aspects of a teleost TRAF6 homolog: Possible involvement in immune responses of Oplegnathus fasciatus against pathogens. Fish Shellfish Immunol. 2015;42(1):66-78.

[16] Al-Nassan S, Fujita N, Kondo H, Murakami S, Fujino H. Chronic exercise training down-regulates TNF-α and atrogin-1/MAFbx in mouse gastrocnemius muscle atrophy induced by hindlimb unloading. Acta histochemica et cytochemica. 2012;45(6):343-9.

[17] Labeit S, Kohl CH, Witt CC, Labeit D, Jung J, Granzier H. 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.

[18] Polge C, Koulmann N, Claustre A, Jarzaguet M, Serrurier B, Combaret L, et al. UBE2D2 is not involved in MuRF1-dependent muscle wasting during hindlimb suspension. The international journal of biochemistry & cell biology. 2016;79:488-93.

[19] Thoma A, Lightfoot AP. NF-kB and Inflammatory Cytokine Signalling: Role in Skeletal Muscle Atrophy. Adv Exp Med Biol. 2018;1088:267-279.

[20] Cornwell EW, Mirbod A, Wu CL, Kandarian SC, Jackman RW. C26 cancer-induced muscle wasting is IKKβ-dependent and NF-kappaB-independent. PLoS One. 2014; 29;9(1):e87776.

[21] Bilodeau PA, Coyne ES, Wing SS. The ubiquitin proteasome system in atrophying skeletal muscle: roles and reg-

Shahid Beheshti University

Sport and Exercise Physiology

Autumn and Winter 2020; Vol.13; No.2

The Effect of mechanical unloading on TRAF6 and MuRF1 genes expression in soleus muscle of male Wistar rats

Abdolreza Kazemi[*1] , Zahra Masumpor[2], Amirbahador Dakhili[3], Alireza Zangiabadi[2], Iman fathi[1]

[1] Sport sciences, Faculty of Humanity and Litrutur, Vali-E-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran.

[2] Exercise physiology, Faculty of Humanity and Litrutur, Azad University of Kerman, Kerman, Iran.

[3] Sport sciences, Faculty of Humanity and Litrutur, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

*Corresponding Author: Abdolreza Kazemi, Tel: 03431312102, E-mail: a.kazemi@vru.ac.ir

Recicved: 10/09/2018 Revised: 10/08/2019 Accepted: 23/09/2019

Abstract

Purpose: Because of exiting uncertainties in growth and maintenance of muscle mass processes, particular atrophy inducing inactivity, the aim of the present study was to investigate changes in the expression of atrogenic genes in the muscle of the rat in which the hind-limbs were kept under unloaded conditions.

Methods: For this purpose, 10 male Wistar rats were assign in two groups of suspension (n=5) and control (n=5) and the suspension group rats were kept for two weeks in this conditions. After 14 days, the soleus muscle was extracted and the expression of TRAf6 and MuRF1 genes was measured by real-time-Pcr method.

Results: The results of this study showed that after 14 days of hind-limb suspension, the relative weight of soleus muscle was significantly decreased (P=0.009). In addition, the expression of TRAF6 gene was significantly increased (P=0.033), but MuRF1 was not statistically significant (P=0.061).

Conclusion: Therefore, according to the results of this study, it can be stated that TRAF6 and its downstream factor, MuRF1, can be involved in the regulation of muscle mass in conditions of reduced muscular activity and mechanical unloading and as candidates for controlling muscle mass in conditions such as athlete's hospitalized after sports injuries or hind-limb unloading after injury to be considered.

Keywords: Hind-limb suspension, skeletal muscle atrophy, Atrogenic genes.