



دانشگاه شهید بهشتی

فیزیولوژی ورزش و فعالیت بدنی

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

اثر تعلیق مکانیکی اندام تحتانی بر بیان ژن های TRAF6 و MuRF1 در عضله نعلی موش های صحرائی نروبیستار

عبدالرضا کاظمی^۱، زهرا معصوم پور^۲، امیربهادر دخیلی^۳، علیرضا زنگی آبادی^۲، ایمان فتحی^۱

۱ گروه علوم ورزشی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه ولی عصر رفسنجان، رفسنجان، ایران.

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

۳ گروه علوم ورزشی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

نویسنده مسئول: عبدالرضا کاظمی، شماره تماس: ۰۳۴۳۱۳۱۲۱۰۲ رایانامه: a.kazemi@vru.ac.ir

پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۷/۰۱

ویرایش مقاله: ۱۳۹۸/۰۵/۱۹

دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰۶/۱۹

چکیده

هدف: به دلیل ابهامات موجود در زمینه فرایندهای رشد و حفظ عضلات اسکلتی به ویژه آتروفی ناشی از بی تحرکی، مطالعه حاضر، به منظور بررسی تأثیرات تعلیق مکانیکی اندام تحتانی بر بیان ژن های آنروژنیکی در عضله نعلی موش های صحرائی انجام گرفت.

روش ها: بدین منظور ۱۰ سر موش صحرائی نژاد ویستار در دو گروه تعلیق ($n=5$) و کنترل ($n=5$) قرار گرفتند و موش های صحرائی گروه تعلیق به مدت دو هفته در همین شرایط نگه داشته شدند. پس از ۱۴ روز عضله نعلی آن ها استخراج گردید و بیان ژن های TRAF6 و MuRF1 به روش real-time-PCR اندازه گیری شد.

نتایج: نتایج نشان داد که پس از ۱۴ روز تعلیق اندام تحتانی وزن نسبی عضله نعلی به طور معناداری کاهش یافته بود ($P=0/009$). به علاوه، بیان ژن TRAF6 ($P=0/033$) به طور معناداری افزایش یافته بود، ولی افزایش MuRF1 به لحاظ آماری معنادار نبود ($P=0/061$).

نتیجه گیری: با توجه به نتایج پژوهش حاضر می توان گفت که TRAF6 و عامل پایین دست آن، MuRF1 می توانند در تنظیم توده عضلانی در شرایط کاهش فعالیت عصبی عضلانی و تعلیق اندام ها درگیر باشند و به عنوان عامل منتخب مقابله با کاهش توده عضلانی در وضعیت هایی مانند بستری شدن ورزشکاران پس از آسیب های ورزشی یا کاهش بار اندام پس از آسیب دیدگی در نظر گرفته شوند.

واژه های کلیدی: آتروفی عضلانی، تعلیق اندام تحتانی، ژن های آنروژنیکی.

مقدمه

داده‌اند که تجزیه پروتئین از مسیر اتوفاژی- لیزوزومی^۶ و مسیر یوبی‌کوئیتین، نقش شایان توجهی در آتروفی عضلانی دارد (۹). در وضعیت‌های کاتابولیسمی مختلف، آتروفی عضله اسکلتی ناشی از فعال شدن دستگاه پایین دستی یوبی‌کوئیتین پروتئازوم وابسته به ATP است (۱۰). دو لیگاز یوبی‌کوئیتین E3 شامل MAFbx و MuRF1 (همچنین آتروژین^۱ 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 داخل عضلانی فعال می‌شوند (۱۱) و این همراستا با افزایش بیان ژن‌های درگیر در مسیر یوبی‌کوئیتین پروتئازوم از قبیل MuRF1 و آتروژین^۱ است (۱۲).

عوامل مرتبط با گیرنده عامل نکروز تومور (TRAFs) شامل خانواده پروتئین‌های آداپتور حفاظت شده 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 شناخته شده این خانواده، پروتئین آداپتور گیرنده TNF (TRAF6) چندین ویژگی مجزا دارد که با سایر اعضای خانواده TRAF به اشتراک گذاشته نشده‌اند. TRAF6 در مرکز فعال سازی مسیره‌های پیام‌رسانی مختلف شامل NF- κ B، MAPK 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 عصب شده 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 عصب شده 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، همراستا است (۱۰). علاوه بر این، پائول و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که در شرایط آتروفی ناشی از گرسنگی TRAF6 هم با افزایش بیان لیگازهای یوبی‌کوئیتین در کاهش توده

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 نوع تار به لحاظ انقباضی و متابولیسمی، 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^۱) درون سلولی 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 بی‌حرکی و پیری کمک خواهد کرد (۷، ۸).

هرچند اغلب تجزیه پروتئین‌های سلولی از طریق مسیره‌های اصلی شامل پروتئازوم وابسته به کلسیم (کالپین‌ها^۲)، پروتئاز اسید آسپارتیک-سیستئین (کاسپیزها^۳)، اتوفاژی-لیزوزومی^۴ و مسیر یوبی‌کوئیتین پروتئازوم^۵ واسطه‌گری می‌شوند، بسیاری از مطالعات نشان

به آب و غذای ویژه موش نگهداری شدند. تمامی اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی و زیر نظر مرکز فیزیولوژی رعایت شد (کد اخلاق ۹۳/EC-۹/KNRC).

پروتکل پژوهش

به منظور حذف بار مکانیکی اندام تحتانی، از روش تعلیق اندام تحتانی به شکل دائمی استفاده شد (۱۵). با استفاده از چسب‌های ارتوپدی و حلقه فلزی، یک سوم 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 به صورت جداگانه اندازه‌گیری شد. یک سر موش صحرایی در گروه HS که کمتر از بقیه غذا مصرف کرده بود (به صورت نسبی)، از مطالعه خارج شد. استخراج بافت: پس از ۱۴ روز قرار گرفتن در شرایط تعلیق، موش‌های صحرایی با اتریب هوش 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 به عنوان عضله کنده‌نقباض با قطع تاندون پروگزیمال و دیستال استخراج شده و با ترازوی آزمایشگاهی (دقت ۰/۰۰۱؛ 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 PCR - Real time به منظور استخراج total RNA از عضله نعلی به نسبت ۱ به ۱۰ در QIAzol Lysis Reagent هموژن شد. به منظور برداشتن اجزای پروتئینی، محصول در ۴°C، ۱۰ min، ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شد. سپس به نسبت ۱ به ۵ با کلروفورم مخلوط شده و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. محصول در ۴°C، ۱۵ min، ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شده و بخش معدنی و آبی از هم

عضلانی نقش دارد، به طوری که نشان داده شده است بیان هر دو MAFbx و MuRF1 به طور چشمگیری در موش‌های فاقد ژن TRAF6 تنظیم کاهشی می‌یابد (۱۰). همچنین نشان داده شده است که TRAF6 و مولکول‌های پیام‌رسانی پایین دست آن شامل MAFbx و MuRF1 در آتروفی عضلانی ناشی از دگرگامتازون 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). همان‌طور که اشاره شد، تعلیق مکانیکی و بی‌وزنی مانند وضعیت فزانوردان 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 بی‌حرکی 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؟ از این رو، 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

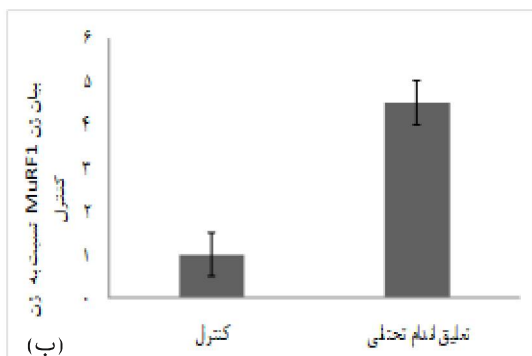
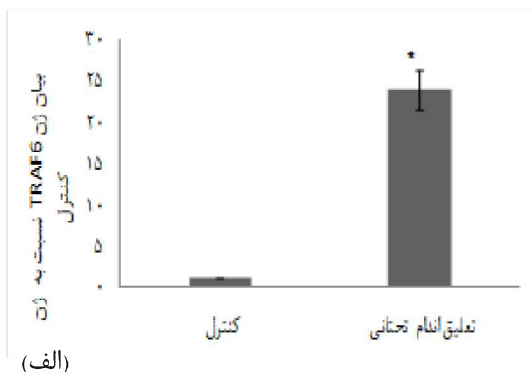
نمونه‌های پژوهش

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 ۳۲۰/۴۵±۴/۹۵ گرم) به طور تصادفی در دو گروه (n=۱۰) تعلیق اندام تحتانی (HS) و تحمل وزن (WB) قرار گرفتند و پروتکل اجرا شد. حیوانات در شرایط دمایی ۲۲±۳ درجه سانتی‌گراد و چرخه تاریکی-روشنایی ۱۲:۱۲ ساعت (شروع چرخه بیداری ساعت ۱۷) و با دسترسی آزاد

آزمون کولموگروف - اسمیرنوف (KS) استفاده شد. همچنین همسان بودن واریانس ها با آزمون Leven سنجیده شد. به منظور تعیین معنادار بودن تفاوت بین متغیرها از آزمون آماری تی مستقل و برای تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار SPSS ویراست ۲۰ استفاده شد (سطح معناداری ۰/۰۵).

نتایج

یافته های پژوهش حاضر نشان داد که پس از ۱۴ روز تعلیق اندام تحتانی، وزن نسبی عضله نعلی ($100 \times g^{-1} \text{ mg}$) به طور شایان توجهی نسبت به گروه کنترل کاهش داشت ($P=0/009$) (شکل ۲). همچنین، نتایج آزمون تی مستقل نشان داد که بیان ژن TRAF6 ($P=0/033$) به طور چشمگیری در عضله نعلی موش های صحرایی گروه تعلیق اندام تحتانی تفاوت بیشتری داشت (شکل ۱ الف). با این حال، تفاوت بیان MuRF1 ($P=0/061$) عضله نعلی گروه تعلیق مکانیکی و گروه کنترل به لحاظ آماری معنادار نبود (شکل ۱ ب).



شکل ۱. بیان ژن TRAF6 (الف) و MuRF1 (ب) در عضله نعلی

متعاقب تعلیق مکانیکی اندام تحتانی.

* تفاوت معنادار نسبت به گروه کنترل ($P < 0/05$) فقط در بیان ژن

MuRF1

جدا شدند. بخش محتوی RNA برداشته شده و با نسبت ۱ به ۵ با ایزوپروپانول مخلوط شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق رها و سپس در 4°C ، 10 min ، 12000 g سانتریفیوژ شد. Pellet حاوی RNA در اتانول شست و شو شده و در $20 \mu\text{L}$ 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 $1 \mu\text{g}$ از RNA و با استفاده از کیت سنتز cDNA ساخت فرمنتاز و آنزیم Mulv Reverse transcriptase انجام گرفت.

به منظور اندازه گیری سطوح بیان ژن های TRAF6، MuRF1 از روش نیمه کمی Real time-PCR با استفاده از Primix syber green II انجام گرفت (Applied Biosystems USA). مخلوط واکنش در حجم نهایی $20 \mu\text{L}$ و هر واکنش به صورت duplicate صورت پذیرفت. برنامه دمایی مور استفاده در Real time-PCR شامل مرحله دناتوراسیون 95°C درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، مرحله آنلینگ 95°C درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه و بسط 60°C درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه (تکرار ۴۰ سیکل) بود. میزان بیان ژن های مورد نظر نیز با روش $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ اندازه گیری شد.

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

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر

| ژن ها | توالی پرایمر |
|-------|---|
| TRAF6 | F = ATGACCACAGTCTTACAAACC R = GCTGAAGTTCTCATCTACTCCC |
| MuRF1 | F = TACAGTACATTGCCCTTTC R = GTTCATTGACCTGCCCACT |
| GAPDH | F = 5'GACATGCCCGCTGGAGAAAC3' R = 5'AGCCCAGGATGCCTTTAGT3' |

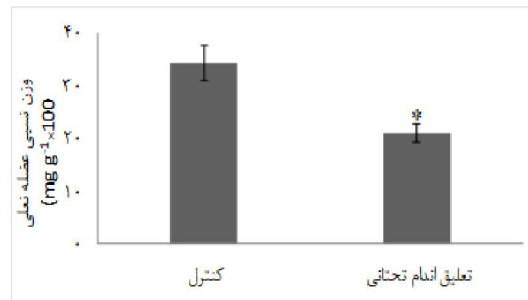
تحلیل آماری

در بخش آمار توصیفی از شاخص های پراکندگی انحراف معیار، میانگین و نمودار استفاده شد. در بخش آمار استنباطی به منظور تعیین نرمال بودن توزیع داده ها از

همسوست. پائول و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند حذف TRAF6 با کاهش بیان MuRF1 و MAFbx همراه است، این تنظیم کاهش می‌دهد MuRF1 از سوی TRAF6 می‌تواند نتیجه مهار مسیره‌های کاتابولیسی و رونویسی باشد، زیرا نشان داده شده است که حذف TRAF6 ویژه عضله موجب مهار فعال شدن مسیره‌های NF- κ B، 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- κ B، عامل 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 (۱۹، ۲۰). NF- κ B از طریق افزایش بیان MuRF1 و چندی دیگر از اجزا مسیریوبی کوئیتین پروتئازوم موجب آتروفی عضلانی می‌شود (۱۹، ۲۰). از این رو، TRAF6 که بالادست NF- κ B است، می‌تواند از این طریق بیان MuRF1 را در شرایط تعلیق اندام تحتانی که عضله اسکلتی بدون بار می‌شود، افزایش دهد.

افزایش بیان $\text{tweak}/\text{fn}14$ 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 بی‌تحرك کردن بیان $\text{tweak}/\text{fn}14$ افزایش می‌یابند (۲۲). در همین زمینه گزارش شده است که در شرایط بدون بار شدن بیان $\text{fn}14$ به‌عنوان گیرنده tweak در عضلات اسکلتی بدون بار شده افزایش می‌یابد (۲۳). سایتوکاین‌های پیش‌التهابی مختلف برای فعال کردن مسیره‌های پایین‌دستی NF- κ B 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 به ترتیب 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 صحرائی، تعلیق مکانیکی شده بود که در نهایت به واسطه TRAF6 بیان MuRF1 افزایش یافته است.



شکل ۲. وزن نسبی عضله نعلی (mg g⁻¹ × 100) در موش‌های صحرائی متعاقب ۱۴ روز تعلیق مکانیکی اندام تحتانی * تفاوت معنادار نسبت به گروه کنترل (P < ۰/۰۵)

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). به علاوه، 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 متابولیسی سازگار می‌شود. بر اساس 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 بار شده 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 مسیره‌های 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 عصب شده 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،

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, Chelhi I, Cassar-Malck 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.

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 فضاوردی نقش دارند. همچنین با توجه به اینکه روش تعلیق اندام تحتانی الگوی کاهش فعالیت عصبی عضلانی است، تغییرات این ژن‌ها می‌تواند در افراد بی‌تحرك یا ورزشکارانی که پس از آسیب دیدگی دچار بی‌تحركی می‌شوند یا ورزشکارانی که به هر دلیل تمرین خود را تعلیق می‌کنند، موجب آتروفی عضلانی شود. بنابراین، مهار این ژن‌ها با روش‌های فارماکولوژیکی احتمالاً 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. بدین وسیله از تمامی کسانی که ما را در این پژوهش یاری کردند، تقدیر و تشکر می‌شود.

بی‌نوشت‌ها

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-3 β 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

- 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 atrogen-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, Jarzaguat 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- κ B 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 IKK β -dependent and NF- κ B-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 Kazemi¹, Zahra Masumpor², Amirbahador Dakhili³, Alireza Zangiabadi², Iman fathi¹

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.