Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services
Vol. 38, No. 2, Jun. – Jul. 2016, Pages: 6-13

Original Article

The Effect of 4 Weeks Resistance Training on Murf1 Gene Expression and Muscle Atrophy in Diabetic Wistar Rats

Sara Panahi[1], Hamid Agha-Alinejad[1], Reza Gharakhanloo[1], Rana Fayazmilani[2], Mehdi Hedayati[3], Alireza Safarzadeh[4], Maryam Zarkesh[3]

[1]Department of Physical Education and Sport Science, School of Humanity, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[2]Department of Exercise Physiology, School of Physical Education and Exercise Science, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
[3]Cellular and Molecular Endocrine Research Center, Obesity Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

[4]Department of Exercise Physiology, School of Physical Education and Exercise Science, Mazandaran University, Babolsar, Iran

Received: 22 Dec, 2013 **Accepted: 27 Feb, 2014**

Abstract

Background & Objectives: Muscular atrophy is one of the most common complications of diabetes. In such cases, protein degradation is increased and protein synthesis is decreased. MuRF1 is an E3 ubiquitin ligase which has been identified as a mediator of skeletal muscle wasting in various skeletal muscle atrophy models, and its expression is upregulated in atrophy. Exercise training has been suggested as one of the treatment strategies for muscular atrophy. The aim of this study is to investigate the effects of 4 weeks of resistance training on MuRF1 gene expression in muscular atrophy in streptozotocin-diabetic wistar rats.

Material and Methods: Thirty six male Wister rats (288 ± 22 g) were randomly divided into four groups: non-diabetic control, non-diabetic trained, diabetic control and diabetic trained. The exercise groups were subjected to a resistance training program using a ladder (3 days/wk, for 4 wk). MuRF1 mRNA level was measured in Flexor Hallucis Longus muscle using Real-Time PCR. The results were studied by statistical methods.

Results: MuRF1 gene expression was increased in rats with diabetes (p=0.001); resistance training diminished the skeletal muscle wasting in diabetic rats (p=0.002) by inhibiting MuRF1 gene expression.

Conclusion: This study indicates that short term resistance training can overcome diabetes-induced atrophy in rats. Whether this kind of training might be a good way for countering atrophy in other diseases with similar catabolic situation to diabetes remains to be elucidated.

Keywords: Murf1, Resistance Training, Muscular Atrophy

*Corresponding author:
E-mail: halinejad@modares.ac.ir

Citation: Panahi S, Agha-Alinejad H, Gharakhanloo R, Fayazmilani R, Hedayati M, Safarzadeh A, Zarkesh M. The Effect of 4 Weeks Resistance Training on Murf1 Gene Expression and Muscle Atrophy in Diabetic Wistar Rats. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2016;38(2):6-13.

Archive of SID
www.SID.ir

مقاله پژوهشی

تاثیر چهار هفته تمرین مقاومتی بر بیان ژن MuRF1 و آتروفی عضلانی در موشهای صحرایی ویستار دیابتی

سارا پناهی[۱]، حمید آقاعلی نژاد[۱*]، رضا قراخانلو[۱]، رعنا فیاض میلانی[۲]، مهدی هدایتی[۳]، علیرضا صفرزاده[۴]، مریم زرکش[۳]

[۱]گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی،دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
[۲]گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
[۳]مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی غدد درون ریز، مرکز تحقیقات پیش گیری و درمان چاقی، پژوهشکده علوم غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
[۴]گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

دریافت: ۹۲/۱۰/۱ پذیرش: ۹۲/۱۲/۸

چکیده

زمینه و اهداف: آتروفی عضلانی یکی از مشکلات متداول دیابت می باشد. در چنین شرایطی، تجزیه پروتئین افزایش و سنتز آن کاهش می یابد. MuRF1 یک لیگاز یوبیکوئیتین E3 است که به عنوان یک واسطه تحلیل عضلانی در بسیاری از مدل های آتروفی عضلانی شناخته شده است و در نتیجه آتروفی بیان آن افزایش می یابد. تمرین ورزشی به عنوان یکی از روش های درمانی آتروفی همواره مورد توجه بوده است. هدف از پژوهش حاضر بررسی تاثیر ۴ هفته تمرین مقاومتی بر بیان ژن MuRF1 در آتروفی عضلانی ناشی از دیابت ایجاد شده توسط استرپتوزوتوسین در موشهای صحرایی ویستار می باشد.

مواد و روش ها: ۳۶ سر موش صحرایی نر از نژاد ویستار با میانگین توده ۲۲ ± ۲۸۸ گرم به طور تصادفی به ۴ گروه تقسیم شدند: کنترل غیر دیابتی، تمرین غیر دیابتی، کنترل دیابتی و تمرین دیابتی. گروه های تمرینی یک برنامه تمرین مقاومتی با استفاده از نردبان (۳ روز در هفته، برای۴ هفته) انجام دادند. میزان MuRF1 mRNA در عضله فلکسور هالوسیس لانگوس با روش RT-PCR سنجیده شد و با استفاده از نرم افزار Rest از نظر آماری بررسی شد (سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد).

یافته ها: دیابتی کردن سبب افزایش آتروفی و افزایش بیان MuRF1 گردید (p= ۰.۰۰۱) و تمرین مقاومتی میزان آتروفی را از طریق مهار بیان MuRF1 کاهش داد (p= ۰/۰۰۲).

نتیجه گیری: این پژوهش نشان داد با انجام تمرین کوتاه مدت مقاومتی نیز می توان به مقابله با آتروفی ناشی از دیابت در موش های دیابتی پرداخت. این نوع تمرین می تواند راهکار مناسبی برای درمان آتروفی در شرایط بیمارگونه دیگر که ویژگی های کاتابولیکی مشترکی با دیابت دارند نیز باشد که البته نیازمند مطالعات و بررسی های بیشتری است.

کلید واژه ها: MuRF1، تمرین مقاومتی، آتروفی عضلانی

*ایمیل نویسنده رابط: halinejad@modares.ac.ir

مقدمه

بیماری دیابت شیرین یک بیماری شایع در دنیا است که سلامت و کیفیت زندگی مردم دنیا را به خطر انداخته است و پیامدهای جدی از قبیل نفروپاتی، نوروپاتی، رتینوپاتی و مشکلات قلبی عروقی را به دنبال دارد. از بین رفتن توده عضلانی(آتروفی) یکی از عواقب معمول دیابت است. در این شرایط، تجزیه پروتئین افزایش و سنتز آن کاهش می‌یابد (۱). از آنجا که انواع مختلف آتروفی از نظر سازگاریهای رونویسی اشتراکهای زیادی دارند، به نظر می رسد محرکهای شروع کننده آتروفی از مکانیزمهای

Archive of SID
www.SID.ir

سیگنالینگ معمولی عمل کرده و بر عوامل رونویسی مشترکی اثر دارند. میزان پایین انسولین و احتمالا IGF-1، همراه با افزایش میزان گلوکوکورتیکوئیدها، از دست دادن پروتئین عضلانی در دیابت را تحریک می کنند (۲).

سه مسیر پروتئولیتیک اصلی در عضله اسکلتی عبارت است از: ۱- سیستم لیزوزومال، ۲- سیستم فعال شده توسط Ca^{2+} سیتوزولی و۳- سیستم یوبیکوئیتین پروتئازوم (UPS) (۳, ۴). اگرچه همه آنها در تجزیه پروتئین عضلانی درگیر می باشند، اما تجزیه پروتئین از طریق UPS در بیشتر از ۸۰٪ پروتئولیزها به هنگام تحلیل عضله اسکلتی درگیر است (۵). مطالعات ژنومیک که جهت شناسایی شاخص های فرایند آتروفی طراحی شده اند، دو ژن را که بیان آنها به طور قابل توجهی در چندین مدل آتروفی عضلانی افزایش می یابد شناسایی کرده اند: MuRF1 و MAFbx که به عنوان atrogin-1 نیز شناخته می شود (۳). هر دوی این ژنها، لیگازهای یوبیکوئیتین E3 را رمزگذاری می کنند. آنها به طور تخصصی در عضلات اسکلتی و قلبی بیان می شوند و در چندین مدل آتروفی به طور قابل توجهی تنظیم مثبت شده اند (۴, ۵). به علاوه، در حالی که تحت شرایط نرمال، به نظر می رسد موشهای بدون MuRF1 و atrogin-1 از نظر فنوتیپ با انواع معمولی آنها یکسان هستند، اما بعد از عصب برداری، این حیوانات در مقابل آتروفی عضلانی اندکی از خود محافظت نشان می دهند (۳). در مجموع، این یافته ها نشان می‌دهند که بیان MuRF1 و atrogin-1 نشانگرهای خیلی معتبری برای آتروفی عضلانی ناشی از سیستم UPS می باشند (۶). در واقع کشف دو لیگاز یوبیکوئیتین MuRF1 و Atrogin-1 چشم اندازهای جدید و ویژه‌ای برای اهداف درمانی در بیماری‌های منجر به آتروفی ایجاد کرده‌اند.

فعالیت بدنی و از جمله تمرین مقاومتی علاوه بر تغذیه مناسب، درمان هورمونی با انسولین، هورمون رشد و استروئیدهای آنابولیک از جمله راههای درمانی آتروفی عضلانی به شمار می آیند (۷) و برای بیماران دیابتی بسیار مفید به نظر می‌رسند. تمرین ورزشی استقامتی در مطالعات زیادی بر روی انسانها یا موشها با کمبود انسولین بررسی شده‌اند. اما مطالعات محدودی اثرات تمرین مقاومتی بر قدرت عضلانی را بررسی کرده‌اند. در مطالعه Mandroukas و همکاران (۱۹۸۶) بیماران دیابتی نوع ۱، فعالیت هوازی و تمرین اینتروال ایستا و پویای عضلانی را اجرا کردند. افزایش معنی‌دار در گشتاور ایزوکینتیک بعد از ۲۰ هفته تمرین و افزایش در سطح تار عضلانی نوع IIa مشاهده شد. این یافته‌ها در پیشنهادی ثابت نشده، احتمال افزایش توده عضلانی بیماران دیابتی را مطرح کردند (۸). Durak و همکاران (۱۹۹۰) نیز نشان دادند بیماران دیابتی نوع ۱ می‌توانند به طور قابل توجهی قدرت را بعد از ۳۰ جلسه (۱۰ هفته) تمرین مقاومتی افزایش دهند (۹). فارل و همکاران (۱۹۹۹) نیز اثر ۸ هفته تمرین مقاومتی را در موش‌های صحرایی دیابتی شده از طریق پانکراتکتومی بررسی کردند و مشاهده نمودند دیابت باعث کاهش مشخص وزن عضلات نعلی و دوقلو در این موش‌ها می‌شود و تمرین مقاومتی می‌تواند توده این عضلات را در گروه دیابتی افزایش دهد و حتی شدت‌های بالاتر تمرین می تواند سبب هایپرتروفی در موش‌های دیابتی با سطوح پایین انسولین گردد (۱۰). ملانوری شمسی و همکاران (۲۰۱۳) نیز به بررسی ۵ هفته تمرین مقاومتی بر بیان سایتوکاین-های عضلانی در موش های سالم و دیابتی پرداختند. القاء دیابت، وزن عضله را در عضلات نعلی و FHL کاهش داد، در حالی که تمرین مقاومتی سبب حفظ وزن عضله FHL در موش های دیابتی گردید (۱۱) همه ی این مطالعات به غیر از مطالعه ملانوری شمسی و همکاران (۲۰۱۳) از دوره های تمرینی بلند مدت استفاده کرده‌اند و در هیچ یک از مطالعات اشاره شده به مسیرهای درگیر در آتروفی و اثر تمرین ورزشی بر این مسیرها و واسطه‌ها و شاخص‌های آنها اشاره نشده است. تنها مطالعه‌ای که به بررسی اثر تمرین ورزشی بر بیان MuRF1 پرداخته، از ۸ هفته تمرین استقامتی استفاده کرده و به این نتیجه رسیده است که تمرین ورزشی، تحلیل عضله اسکلتی را در موشهای دیابتی از طریق کاهش استرس اکسیداتیو و مهار بیان MuRF1 کاهش می دهد (۳) و این در حالی است که گنجاندن تمرین مقاومتی به عنوان جزء لازم برنامه تمرینی، توسط انجمن قلبی آمریکا، کالج آمریکایی طب ورزش و انجمن دیابتی آمریکا تائید شده است (۱۲). اثرات آنابولیک تمرین مقاومتی بر نگهداری نیتروژن و توده عضلانی با تمرین استقامتی به دست نمی‌آید. در واقع، این کیفیت فعالیت، موثرتر و مطمئن تر از درمان‌های دارویی در رویارویی با تحلیل عضلانی است (۹). بنابراین، پژوهش حاضر در نظر دارد ابتدا به بررسی مسیر درگیر در آتروفی ناشی از استرپتوزوتوسین (STZ) در موشهای دیابتی بپردازد و اثر ۴ هفته تمرین مقاومتی بر بیان MuRF1 را که از شاخص های اصلی این مسیر می‌باشد در عضله فلکسور هالوسیس لانگوس (FHL) موشهای صحرایی دیابتی بررسی کند.

مواد و روش ها

در این پژوهش ۳۶ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار (با میانگین توده بدن ۲۲ ± ۲۸۸ گرم) از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. موش ها در قفس‌های پلی‌کربنات و در شرایط کنترل شده محیطی با میانگین دمای محیط ۲±۲۲ درجه سانتی گراد و چرخه ۱۲ ساعت خواب و بیداری و با در دسترس بودن آب و پلت ویژه موش نگهداری شدند. سپس به طور تصادفی به ۴ گروه شامل: ۱) کنترل غیردیابتی، ۲) تمرین غیردیابتی، ۳) کنترل دیابتی و ۴) تمرین دیابتی تقسیم شدند. دیابتی شدن از طریق تزریق درون صفاقی محلول استرپتوزوتوسین حل شده در بافر سیترات ۰/۱ مولار و به میزان ۵۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم از توده بدن صورت گرفت. به حیوانات غیردیابتی نیز معادل حجمی بافر سیترات تزریق شد. پنج روز پس از تزریق، غلظت گلوکز خون با استفاده از نمونه‌های خونی جمع‌آوری شده از دم حیوانات و روش آنزیمی گلوکز اکسیداز اندازه گیری شد. ملاک دیابتی بودن، غلظت گلوکز خون بالاتر از ۲۵۰ میلی گرم بر ۱۰۰ میلی لیتر است.

تمرین مقاومتی شامل بالا رفتن از یک نردبان ۱ متری بود که با اضافه کردن وزنه به دم موشها انجام گرفت. نردبان مورد استفاده ۲۶

Archive of SID

www.SID.ir

پله داشت و در زاویه ۸۰ درجه قرار داده شد. شروع تمرین مقاومتی ۷ روز پس از تزریق بود. برای تعیین وزنه مناسب هر ۴ روز یک بار توده موشها اندازه گیری می شد. برنامه تمرینی از دو مرحله مقدماتی و اصلی تشکیل گردید که مدت هر مرحله ۲ هفته بود. پیش از شروع برنامه ی تمرین، بالارفتن از نردبان به حیوانات آموزش داده شد. به منظور کاهش استرس از شوک الکتریکی، فشار هوا، آب سرد و یا پاداش و محرومیت غذایی استفاده نشد، بلکه برای تحریک به منظور انجام تمرین ها تنها از لمس کردن و مالیدن دم استفاده گردید. در مرحله مقدماتی بار تمرین، تعداد تکرارها و مقدار وزنه، روزانه و به تدریج افزایش یافت؛ به این ترتیب که بار اولیه شامل ۲ نوبت با ۶ تکرار در هر نوبت بود که با وزنه‌های معادل ۳۰ % توده بدن حیوانات انجام شد. فاصله ی استراحت بین تکرارها ۱ دقیقه و بین نوبت ها ۳ دقیقه بود. در ابتدای مرحله اصلی (هفته ی سوم) موش‌ها توانستند ۳ نوبت تمرین را با وزنه‌های معادل ۱۰۰ % توده بدن خود انجام دهند. تا پایان برنامه تمرین بار وزنه ها ثابت ماند. تمرین ها ۳ روز در هفته و یک روز در میان انجام می‌شد. به منظور انجام مراحل گرم و سرد کردن، موشهای صحرایی ۲ بار بالا رفتن بدون وزنه از نردبان را، پیش و پس از هر جلسه تمرین، انجام می‌دادند. لازم به یادآوری است پس از پایان یافتن زمان استراحت بین تکرارها و نوبت های تمرینی، حیوانات توسط پژوهش‌گر پایین آورده شده و در ابتدای نردبان قرار داده می‌شدند. با هدف از بین بردن اثر حاد تمرین، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، نمونه گیری انجام شد. موشها با تزریق درون صفاقی ترکیبی از کتامین (۷۰mg/kg) و زایلوزین (۳-۵ mg/kg) بیهوش شدند. بلافاصله عضله فلکسورهالوسیس لانگوس(FHL) به عنوان عضله مورد بررسی جدا شد و پس از وزن شدن، بلافاصله در نیتروژن مایع قرار گرفت. نسبت توده عضله به توده بدن برای تعیین کاهش توده عضلانی و تشخیص آتروفی در موشهای دیابتی مورد استفاده قرار گرفت (۱, ۱۲). نمونه های عضلانی تا زمان آماده سازی در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. گلوکز با روش آنزیمی رنگ سنجی با فنآوری گلوکزاکسیداز و با استفاده از کیت گلوکز (شرکت پارس آزمون- ایران) اندازه گیری شد. ضریب تغییرات برون آزمونی و حساسیت روش اندازه گیری برای گلوکز ۲/۳ ٪ و ۵ میلی گرم بر صد میلی لیتر بود. نمونه های عضلانی (۵۰ میلی گرم) بلافاصله پس از جداسازی تا زمان سنجش در فریزر منفی ۸۰ نگهداری شدند. پس از استخراج RNA از بافت عضلانی مطابق با پروتکل کیت ساخت شرکت کیاژن (شماره کاتالوگ۷۴۱۳۴)، برای سنتز cDNA از کیت سنتز cDNA ساخت شرکت کیاژن (شماره کاتالوگ ۲۰۵۳۱۱) استفاده شد. در این پژوهش روش کمی- مقایسه ای Real time ΔCT با استفاده از SYBR-Green برای تعیین میزان بیان mRNA ژن MuRF1 بکارگرفته شد. برای مقایسه کیفی و کمی در میزان بیان ژن مذکور، از بیان ژن β-actin به عنوان ژن مرجع استفاده شد. در این روش در هر دور دو گروه بررسی شدند. درنهایت تغییرات بیان ژن بر اساس کمیت نسبی (RQ) بدست آمد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱. توالی پرایمرهای استفاده شده در پژوهش

نام پرایمر	توالی پرایمر
MuRF1 F	5’-GTGAAGTTGCCCCCTTACAA-3’
MuRF1 R	5’-TGGAGATGCAATTGCTCAGT-3’
actin Fβ-	’۵- ACCATGTACCCAGGCATTGC -3’
β- actin R	’۵-ATGACTCTACCCACGGCAAG -3’

توزیع نرمال داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف – اسمیرنوف، برای تجزیه و تحلیل آماری و مقایسه اختلاف بین گروه ها از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. نرم افزارRest (V۲.0.7۲۰۰۸) به منظور تشخیص کمیت نسبی بیان ژن MuRF1 مورد استفاده قرار گرفت. سطح معنی داری آزمون ها α≤۰/۰۵ تعیین و برای انجام محاسبات آماری از نرم افزار SPSS استفاده شد. لازم به یادآوری است تمام جنبه های اخلاقی و حقوقی این پژوهش توسط کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه تربیت مدرس بررسی و تائید گردیده است.

یافته ها

توده بدن، توده عضله FHL، توده نسبی و غلظت گلوکز سرم در گروه های مختلف: تمام موشهای صحرایی در گروه های تمرینی توانستند ۴ هفته تمرین مقاومتی را انجام دهند. همان گونه که انتظار می رفت ما کاهش معنی داری در توده بدن و توده عضله FHL و افزایش معنی داری در تجمع گلوکز خون در حیوانات دیابتی نسبت به غیر دیابتی مشاهده کردیم (جدول ۲). در شروع پژوهش تفاوت معنی داری بین توده حیوانات در گروه‌های مختلف وجود نداشت. در پایان برنامه تمرینی میانگین تغییرات توده در گروه تمرین غیردیابتی نسبت به کنترل غیردیابتی به طور معنی‌داری کمتر بود (p=۰/۰۱۷). در گروه های دیابتی میانگین کاهش توده در گروه تمرینی نسبت به گروه کنترل، کمتر و این اختلاف از نظر آماری معنی دار بود (p=۰/۰۴۴). همچنین توده عضله FHL در گروه کنترل دیابتی (۰/۲۸۶±۰/۰۴۶) نسبت به کنترل غیردیابتی (۰/۵۰۸±۰/۰۳۵) کاهش معنی داری پیدا کرده بود (p=۰/۰۰۰۱). برای تعیین اینکه آیا کاهش توده عضلانی در حیوانات دیابتی منعکس کننده کاهش خالص در توده بدن است، توده عضله FHL نسبت به توده بدنی سنجیده شد (۱, ۱۲) (جدول ۲). نسبت توده عضله به توده بدن در عضله FHL در گروه کنترل دیابتی نسبت به کنترل غیر دیابتی کاهش معنی‌داری (۱۸/۷ درصد) پیدا کرده بود (p=۰/۰۰۰۱) که نشان دهنده ایجاد آتروفی می باشد.

در شروع برنامه تمرینی غلظت گلوکز خون در گروه‌های دیابتی نسبت به گروه‌های غیردیابتی بالاتر بود (p< ۰/۰۵)؛ پس از ۴ هفته تمرین مقاومتی تغییر معنی داری در غلظت سرمی گلوکز مشاهده نشد (جدول۲).

Archive of SID

www.SID.ir

بیان ژن MuRF1: همانطور که در جدول ۳ ملاحظه می شود نتایج RT-PCR نشان داد که دیابتی کردن سبب افزایش بیان MuRF1 در عضله FHL موشهای دیابتی نسبت به کنترل غیردیابتی گردید (p=۰/۰۰۱)، همچنین با وجود اینکه در گروه تمرین غیردیابتی نسبت به کنترل غیردیابتی تغییری در بیان MuRF1 مشاهده نشد، اما در گروه‌های دیابتی، تمرین مقاومتی سبب کاهش بیان MuRF1 گردید (p=۰/۰۰۲) که نشان می دهد تمرین مقاومتی می‌تواند نقش موثری در مهار بیان MuRF1 در شرایط دیابتی داشته باشد. شکل ۱ بیان ژن MuRF1 را در گروه های کنترل دیابتی (DC) و کنترل غیردیابتی (NDC) مقایسه کرده است و شکل ۲ نیز این مقایسه را بین گروه های تمرین دیابتی(DT) و کنترل دیابتی (DC) صورت داده است.

جدول۲. توده بدن، توده عضله FHL، توده نسبی و غلظت گلوکز سرم در گروه های مختلف

		کنترل غیر دیابتی	تمرین غیر دیابتی	کنترل دیابتی	تمرین دیابتی
توده بدن (گرم)	اولیه	۲۹۱/۸±۱۸/۱۱	۲۹۱±۳۶/۲۲	۲۸۹±۱۶/۶۵	۲۸۳/۸±۱۷/۴۷
	پایانی	۳۶۴/۶±۳۰/۳	۳۴۵±۴۹/۳۴	۲۵۲ ±۱۸/۷*	۲۶۱/۷ ±۲۳/۷*
توده عضله FHL (گرم)		۰/۵۰۸±۰/۰۳۵	۰/۴۷۸±۰/۰۶۲	۰/۲۸۶±۰/۰۴۶*	۰/۳۳۴±۰/۰۳۷*
نسبت توده عضله FHL به توده بدن		۰/۰۰۱۳۹±۰/۰۰۰۰۸**	۰/۰۰۱۳۹±۰/۰۰۰۰۹**	۰/۰۰۱۱۳±۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۱۲۷±۰/۰۰۰۰۹**
گلوکز سرم (میلی گرم در ۱۰۰میلی لیتر)		۱۲۶/۱ ± ۵/۸	۱۳۰/۰ ± ۶/۵	۳۴۹/۶ ± ۳۶/۱ *	۳۴۸/۰ ± ۲۶/۰*

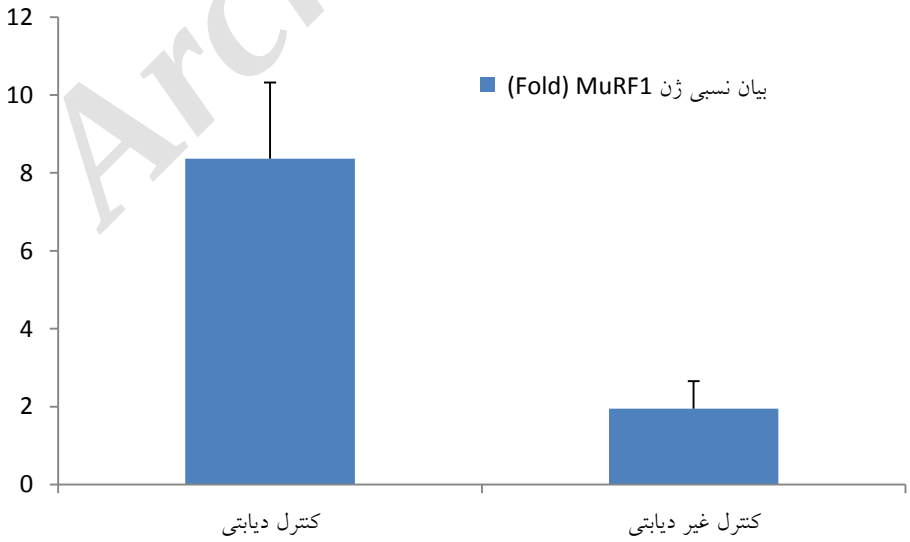
*تفاوت معنی دار با گروه های غیر دیابتی (p=۰/۰۰۰۱)

**تفاوت با گروه کنترل دیابتی (p=۰/۰۰۰۱)

جدول۳. تغییرات بیان نسبی ژن MuRF1 در گروه های مختلف

ژن	گروه	بیان ژن	انحراف معیار	ارزش P	نتیجه نهایی
MuRF1	DC نسبت به NDC	۸/۳۶۹	۱/۹۴۸–۴۲/۸۴۸	۰/۰۰۱*	↑
	DT نسبت به DC	۰/۱۹۱	۰/۰۴۶–۰/۶۱۴	۰/۰۰۲*	↓
	NDT نسبت به NDC	۰/۸۲۲	۰/۲۸۳–۴/۱۴۲	۰/۶۷۲	معنی دار نیست
	DT نسبت به NDT	۱/۹۴۶	۰/۷۰۷–۴/۶۳۹	۰/۰۷۳	معنی دار نیست

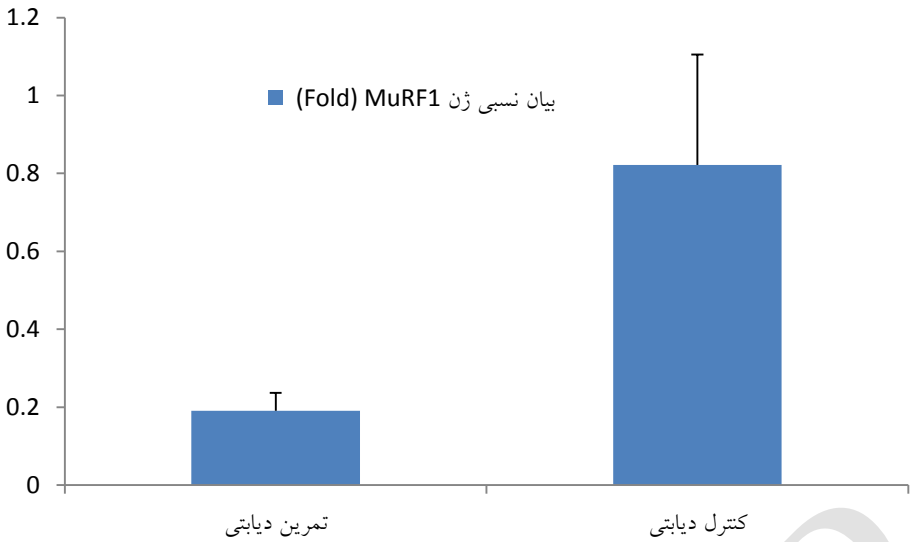
* مقدار (P < ۰/۰۵) از نظر آماری معنی دار است. DC کنترل دیابتی؛ NDC کنترل غیر دیابتی؛ DT تمرین دیابتی و NDT تمرین غیردیابتی



شکل۱. مقایسه بیان نسبی ژن MuRF1 بین گروه های کنترل دیابتی و کنترل غیر دیابتی (p=۰/۰۰۱)

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۲. مقایسه بیان نسبی ژن MuRF1 بین گروه های تمرین دیابتی و کنترل دیابتی (p=۰/۰۰۲)

بحث

در مطالعه حاضر، نشان داده شد دیابتی کردن از طریق استرپتوزوتوسین با آتروفی عضلانی و افزایش بیان MuRF1، یکی از لیگازهای موثر در مسیر آتروفی در عضله موشهای دیابتی همراه بوده است. مهم ترین یافته این پژوهش این بود که مسیر UPS در آتروفی عضلانی در موش‌های دیابتی درگیر است و تزریق استرپتوزوتوسین سبب افزایش بیان MuRF1 در موش‌های دیابتی می‌شود. همچنین ۴ هفته تمرین مقاومتی سبب کاهش بیان MuRF1 در موش های دیابتی شد.

در این مطالعه، اثر دیابت ناشی از تزریق استرپتوزوتوسین بر عضله اسکلتی در موش‌های دیابتی نشان داده شد. همان گونه که انتظار می رفت تزریق STZ سبب کاهش توده بدن موش‌ها و همچنین کاهش وزن نسبی عضله گردید (P<۰/۰۵) که این نتیجه با پژوهش‌های پیشین همخوانی دارد (۱, ۵, ۱۲, ۱۳). در همه این مطالعات دیابتی کردن از طریق تزریق STZ سبب ایجاد آتروفی به خصوص در تارهای تند تنش نسبت به کند تنش گردید. همچنین تمرین مقاومتی توانست نسبت توده عضله به توده بدن را در گروه‌های تمرین کرده نسبت به کنترل در هر دو گروه دیابتی و غیردیابتی افزایش دهد (P<۰/۰۵) که نشان می‌دهد این نوع تمرین قادر به مقابله با آتروفی عضلانی در موش ها می باشد. به علاوه نتایج ما نشان دادند که لیگاز یوبیکوئیتین E3 (MuRF1) در موش-های دیابتی در این شرایط تنظیم مثبت شده است. این یافته با پژوهش‌های پیشین که به بررسی مسیرهای درگیر در آتروفی عضلانی ناشی از تزریق STZ در موش‌های دیابتی پرداخته‌اند، همخوانی دارد (۵, ۱۴). مشخص شده است که MuRF1 در چندین مدل آتروفی عضله اسکلتی تنظیم مثبت می شود و تجزیه پروتئین‌های کلیدی سارکومر از قبیل تیتین، MHC، نبولین، NRAP، TnI، TnT، MLC-2، مایوتیلین و T-cap را توسعه می-دهد (۱۵–۱۷). تخریب پانکراس ایجاد شده ناشی از تزریق STZ در جوندگان و افزایش MuRF1 mRNA (۱۸) در عضله اسکلتی، یک نقش احتمالی برای این لیگاز در آتروفی عضله اسکلتی ناشی از دیابت ایجاد می‌کند. مطالعات متعددی تلاش کرده‌اند که مکانیزم‌های موثر در افزایش بیان MuRF1 در عضله دیابتی شده را دریابند. بیان این ژن توسط دو عامل رونویسی تنظیم می‌شود: NF-κB و FoxO. یافته ها نشان می‌دهند که افزایش در فعالیت NF-κB برای افزایش ناشی از IKKß در رونویسی MuRF1 ضروری است (۱۹) و حداقل ۵۰ درصد تغییرات توده عضلانی ناشی از فعال شدن MuRF1، به فعال شدن NF-κB نسبت داده شده است (۱). از آنجا که فعال شدن مزمن IKK در بیماران دیابتی رخ می‌دهد (۲۰) و در شرایط دیابتی، NF-κB به شدت فعال شده است (۲۱)، در نتیجه به نظر می‌رسد مسیر NF-κB یکی از مسیرهای اصلی درگیر در افزایش MuRF1 ناشی از دیابت باشد. فاکتورهای رونویسی FoxO نیز در تحلیل عضلانی درگیرند و احتمالا تنظیم مثبت لیگازهای یوبیکوئیتین MuRF1 و atrogin-1 را منعکس می کنند(۲۲). به نظر می‌رسد آتروفی عضلانی ناشی از دیابت به شکل بالقوه به وسیله مهار مسیر سیگنالینگ PI3K/AKT و فعال شدن محور مقابل آن یعنی FoxO/MAFbx/MuRF1 رخ می‌دهد (۲۳). از طرف دیگر، در شرایط دیابتی، هایپرگلایسمی مداوم به شکل معنی داری بالانس پرو اکسیدان/ آنتی‌اکسیدان را به هم می‌ریزد و ROS/RNS افزایش و میزان آنتی‌اکسیدان‌ها کاهش می‌یابد (۲۱). کاهش انسولین و افزایش استرس اکسیداتیو_هر دو_ برای شکستگی پروتئین ضروری به نظر می رسند. Chen و همکاران نیز افزایش بیان MuRF1 در شرایط آتروفی ناشی از دیابت را مرتبط با استرس اکسیداتیو دانسته اند (۵). بنابر این تنظیم منفی فرایندهای آنابولیک و همچنین استرس اکسیداتیو رخ داده در حیوانات تحت STZ نیز می توانند پروتئولیز عضلانی را فعال کنند. مهم ترین یافته این پژوهش این بود که تنها ۴ هفته تمرین مقاومتی می‌تواند سبب کاهش بیان MuRF1 و کاهش آتروفی در موشهای دیابتی شود. بر اساس مطالعات پیشین اثر تمرین ورزشی

Archive of SID

www.SID.ir

بر بیان MuRF1 نامشخص است و نتایج متناقضی در این رابطه به دست آمده است. در حالی که فعالیت مقاومتی با شدت کم به افزایش بیان MuRF1 mRNA در افراد سالم منجر شده است (۲۴)، سایر مطالعات کاهش در بیان ژن و پروتئین MuRF1 را به دنبال تمرین مقاومتی در انسانها و حیوانها گزارش کرده اند (۲۵, ۲۶). به علاوه، الگوهای باری مختلف اثرات متفاوتی بر بیان MuRF1 دارند؛ فعالیت عضلانی برونگرا می‌تواند سبب تنظیم منفی طولانی مدت در بیان MuRF1 شود، در حالی که فعالیت عضلانی درونگرا می‌تواند سبب تنظیم مثبت کوتاه مدت شود (۲۷). مطالعاتی که پاسخ شرایط کمبود انسولین بر توده عضلانی و عملکرد عضله را با فعالیت سنجیده باشند، نیز بسیار محدودند. همانگونه که در مقدمه اشاره شد Mandroukas و همکاران (۱۹۸۶) دریافتند در بیماران دیابتی نوع ۱، بعد از ۲۰ هفته تمرین استقامتی و اینتروالهایی از تمرین ایستا و پویای عضلانی، گشتاور ایزوکینتیک و سطح تار عضلانی نوع IIa افزایش می یابد (۸). Durak و همکاران (۱۹۹۰) نیز افزایش قابل توجهی در قدرت بیماران دیابتی نوع ۱ که برای ۱۰ هفته تمرین مقاومتی انجام دادند، ملاحظه کردند (۹). Farrell و همکاران (۱۹۹۹) نیز نشان دادند ۸ هفته تمرین مقاومتی در موش های صحرایی دیابتی شده می‌تواند توده این عضلات را در گروه دیابتی افزایش دهد و حتی شدت-های بالاتر تمرین می تواند سبب هایپرتروفی در موش های دیابتی با سطوح پایین انسولین گردد (۱۰) که نتایج پژوهش ما با وجود دوره کوتاه تر تمرین همسو با نتایج آن ها می‌باشد. چنانکه از این مطالعات پیداست، تمرین مقاومتی قادر به افزایش نیرو و حتی هایپرتروفی در بیماران دیابتی می‌باشد که این مسئله برتری این تمرین را نسبت به تمرین استقامتی در این مورد به خصوص نشان می‌دهد. اما در زمینه تاثیر تمرین ورزشی بر مسیرهای درگیر در آتروفی و واسطه‌های مولکولی آنها در شرایط دیابتی تنها یک مطالعه صورت گرفته است که در آن مطالعه موشهای دیابتی به ۸ هفته تمرین استقامتی پرداختند و یافته آنها در مورد بیان MuRF1 با نتایج پژوهش حاضر همخوانی دارد و پژوهشگران در آن مطالعه کاهش بیان MuRF1 در موش های دیابتی را مرتبط با کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از تمرین ورزشی بیان کردند (۵). در این پژوهش ما برای نخستین بار به بررسی اثر تمرین مقاومتی بر بیان MuRF1 در موش های دیابتی پرداختیم. از آنجا که در مقایسه با تمرین استقامتی انجام تمرین مقاومتی برای افراد دیابتی، به ویژه افراد مسن و چاق، ساده تر بوده و قادر به ایجاد پاسخ های مناسب فیزیولوژیک در آنان می باشد، لذا می‌توان انجام اینگونه تمرین را برای مقابله با آتروفی به این بیماران توصیه کرد. همچنین، بدین جهت که مدل کمبود انسولین ویژگی های کاتابولیکی مشترکی (از قبیل افزایش پروتئولیز وابسته به پروتئازوم و Caspase-3) با سایر شرایط کاتابولیکی (از قبیل اورمی، اختلالات قلبی و عصب برداری) دارد (۲۸)، نتایج ما ممکن است احتمالات درمانی مهمی برای درمان تحلیل عضلانی در تعداد زیادی از این شرایط بیمارگونه داشته باشد. اما برای بررسی مکانیزم ها و واسطه های مولکولی درگیر درفرایند کاهش آتروفی و کاهش بیان MuRF1 نیاز به بررسی و مطالعات دقیق تری می باشد.

نتیجه گیری

در مجموع یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد انجام تمرین مقاومتی کوتاه مدت در موش های دیابتی قادر به مقابله با آتروفی و کاهش بیان MuRF1 می باشد. این نوع تمرین می تواند به عنوان یک روش درمانی در شرایط آتروفی ناشی از بسیاری از بیماری-های سیستمیک به کار رود. مکانیزم‌های موثر در این مسیر نیاز به بررسی‌های بیشتری دارند.

References

1. Kelleher AR, Fairchild TJ, Keslacy S. STZ-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased p65 content and downregulation of insulin pathway without NF-kappaB canonical cascade activation. *Acta Diabetol* 2010; **47**(4): 315-323.
2. Sandri M ,Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, et.al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 2004; **117**(3): 399-412.
3. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK ,Nunez L, Clarke BA, et.al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 2001; **294**(5547): 1704-1708.
4. Cao PR, Kim HJ, Lecker SH. Ubiquitin-protein ligases in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; **37**(10): 2088-2097 .
5. Chen GQ, Mou CY, Yang YQ, Wang S, Zhao ZW. Exercise training has beneficial anti-atrophy effects by inhibiting oxidative stress-induced MuRF1 upregulation in rats with diabetes. *Life Sci* 2011; **89**(1-2): 44-49.
6. Clavel S, Coldefy AS, Kurkdjian E, Salles J, Margaritis I, Derijard B. Atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1 are up-regulated in aged rat Tibialis Anterior muscle. *Mech Ageing Dev* 2006; **127**(10): 794-801.
7. Castaneda C, Layne JE, Munoz-Orians L, Gordon PL, Walsmith J, Foldvari M, et.al. A randomized controlled trial of resistance exercise training to improve glycemic control in older adults with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002; **25**(12): 2335-2341.
8. Mandroukas K, Krotkiewski M, Holm G, Stromblad G, Grimby G, Lithell H, et.al. Muscle adaptations and glucose control after physical training in insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Physiol* 1986; **6**(1): 39-52.
9. Durak EP, Jovanovic-Peterson L, Peterson CM. Randomized crossover study of effect of resistance training on glycemic control, muscular strength, and cholesterol in type I diabetic men. *Diabetes Care*1990; **13**(10): 1039-1043.

Archive of SID

www.SID.ir

10. Farrell PA, Fedele MJ, Hernandez J, Fluckey JD, Miller JL, Lang CH, et.al. Hypertrophy of skeletal muscle in diabetic rats in response to chronic resistance exercise. *J Appl Physiol* 1999; **87**(3): 1075-1082.
11. Molanouri Shamsi M, Hassan ZH, Gharakhanlou R, Quinn LS, Azadmanesh K, Baghersad L, et.al. Expression of interleukin-15 and inflammatory cytokines in skeletal muscles of STZ-induced diabetic rats: effect of resistance exercise training. *Endocrine* 2013; 6: 58-64.
12. Frier BC, Noble EG, Locke M. Diabetes-induced atrophy is associated with a muscle-specific alteration in NF-kappaB activation and expression. *Cell Stress Chaperones* 2008; **13**(3): 287-296.
13. Costelli P, Almendro V, Figueras MT, Reffo P, Penna F, Aragno M, et.al. Modulations of the calcineurin/NF-AT pathway in skeletal muscle atrophy. *Biochim Biophys Acta* 2007; **1770**(7): 1028-1036.
14. Price SR, Bailey JL, Wang X, Jurkovitz C, England BK, Ding X, et.al. Muscle wasting in insulinopenic rats results from activation of the ATP-dependent, ubiquitin-proteasome proteolytic pathway by a mechanism including gene transcription. *J Clin Invest* 1996; **98**(8): 1703-1708 .
15. Glass DJ. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; **37**(10): 1974-84.
16. Witt SH, Granzier H, Witt CC, Labeit S. MURF-1 and MURF-2 target a specific subset of myofibrillar proteins redundantly: towards understanding MURF-dependent muscle ubiquitination. *J Mol Biol* 2005; **350**(4): 713-722.
17. Clarke BA, Drujan D, Willis MS, Murphy LO, Corpina RA, Burova E, et.al. The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metab* 2007; **6**(5): 376-385.
18. Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, et.al. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J* 2004; **18**(1): 39-51 .
19. Senf SM, Dodd SL, McClung JM, Judge AR. Hsp70 overexpression inhibits NF-κB and Foxo3a transcriptional activities and prevents skeletal muscle atrophy. *FASEB J* 2008; **22**(11): 3836-3845.
20. Golbidi S, Badran M, Laher I. Antioxidant and anti-inflammatory effects of exercise in diabetic patients. *Exp Diabetes Res* 2012; **12**: 941868.
21. Mastrocola R, Reffo P, Penna F, Tomasinelli CE, Boccuzzi G, Baccino FM, et.al. Muscle wasting in diabetic and in tumor-bearing rats: role of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2008; **44**(4): 584-593.
22. Smith IJ, Alamdari N, O'Neal P, Gonnella P, Aversa Z, Hasselgren PO. Sepsis increases the expression and activity of the transcription factor Forkhead Box O 1 (FOXO1) in skeletal muscle by a glucocorticoid-dependent mechanism. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; **42**(5): 701-711.
23. Foletta VC, White LJ, Larsen AE, Leger B, Russell AP. The role and regulation of MAFbx/atrogin-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy. *Pflugers Arch* 2011; **461**(3): 325-335 .
24. Drummond MJ, Fujita S, Takashi A, Dreyer HC, Volpi E, Rasmussen BB. Human Muscle Gene Expression following Resistance Exercise and Blood Flow Restriction. *Med Sci Sports Exerc* 2008; **40**(4): 691-698 .
25. Zanchi NE, de Siqueira Filho MA, Lira FS, Rosa JC, Yamashita AS, de Oliveira Carvalho CR, et.al. Chronic resistance training decreases MuRF-1 and Atrogin-1 gene expression but does not modify Akt, GSK-3beta and p70S6K levels in rats. *Eur J Appl Physiol* 2009; **106**(3): 415-423.
26. Murton AJ, Constantin D, Greenhaff PL. The involvement of the ubiquitin proteasome system in human skeletal muscle remodelling and atrophy. *Biochim Biophys Acta* 2008; **1782**(12): 730-743.
27. Nedergaard A, Vissing K, Overgaard K, Kjaer M, Schjerling P. Expression patterns of atrogenic and ubiquitin proteasome component genes with exercise: effect of different loading patterns and repeated exercise bouts. *J Appl Physiol* 2007; **103**(5): 1513-1522.
28. Wang XH, Hu J, Du J, Klein JD. X-chromosome linked inhibitor of apoptosis protein inhibits muscle proteolysis in insulin-deficient mice. *Gene Ther* 2007; **14**(9): 711-720.

Archive of SID

www.SID.ir