

Research Paper

Investigating the Effects of Four Weeks of Spinal Nerve Ligation After a Period of Combined Training on the Expression of Involved Genes in Calcium Current in Plantaris Muscle of Male Wistar Rats



*Abdolreza Kazemi¹, Hadi Kerendi², Sobhan Naghizadeh³

1. Department of Sports Sciences, Faculty of Literature and Humanities, Vali-e-Asr University, Rafsanjan, Iran.
2. Department of Physical Education and Sports Sciences, Faculty of Literature and Humanities, Lorestan University, Khorramabad, Iran.
3. Department of Sports Sciences, Faculty of Literature and Humanities, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran.



Citation Kazemi A, Kerendi H, Naghizadeh S. [Investigating the Effects of Four Weeks of Spinal Nerve Ligation After a Period of Combined Training on the Expression of Involved Genes in Calcium Current in Plantaris Muscle of Male Wistar Rats (Persian)]. *Internal Medicine Today*. 2022; 28(4):448-463. <https://doi.org/10.32598/hms.28.4.3812.1>

doi <https://doi.org/10.32598/hms.28.4.3812.1>



Received: 08 Feb 2022

Accepted: 29 May 2022

Available Online: 01 Oct 2022

Key words:

Exercise training, Ligation, *STIM1*, *ORAI1*, *MG29*

ABSTRACT

Aims This study aims to investigate the effect of spinal nerve ligation (SNL) after a period of combined training on the expression of some genes that are involved in the calcium flow in the plantaris muscle of male Wistar rats.

Methods & Materials A total of 16 adult male Wistar rats were randomly divided into 2 groups, namely the control-SNL (n=8) and combined training-SNL (n=8). The animals in the training group participated in a training program for 6 weeks. After this period, the protocol of spinal SNL was performed on the research groups for 4 weeks. Finally, the rats were dissected and the plantaris muscle was removed. Real-time polymerase chain reaction was used to measure the mRNA expression of *STIM1*, *ORAI1*, and *MG29* genes.

Findings In the combined training-SNL group, an increase in the expression of *STIM1* (P=0.01), *ORAI1* (P=0.002), and *MG29* (P=0.02) was observed when compared to the control-SNL group.

Conclusion The results of the present study showed that SNL reduces the expression of *STIM1*, *ORAI1*, and *MG29* in the plantaris muscle. Meanwhile, combined training before SNL has a compensatory effect in this regard.

* Corresponding Author:

Abdolreza Kazemi, Associate Professor.

Address: Department of Sports Sciences, Faculty of Literature and Humanities, Vali-e-Asr University, Rafsanjan, Iran.

Tel: +98 (913) 3982706

E-mail: a.kazemi@vru.ac.ir

English Version

Introduction

Muscle atrophy can be related to some physical injuries. Decreased muscle function is one of the most important factors related to decreased mobility which affects the quality of life (QoL). Although the mechanisms involved in muscle atrophy are not fully understood, it is believed that disruption of intracellular calcium homeostasis can play a role in the development of muscle function [1]. At the beginning of muscle contraction, calcium is released from the sarcoplasmic reticulum into the cytosol through ryanodine and dihydropyridine receptors, and at the end of the contraction, calcium is returned to the sarcoplasmic reticulum. During each phase of contraction, a fraction of calcium is released through the membrane calcium pump. Accordingly, maintaining the functional levels of calcium inside the sarcoplasmic reticulum and the influx of calcium-regulated by the cytosol across the plasma membrane is important for the function of muscle fibers in different stages of growth and response to stressful situations. Store-operated calcium entry (SOCE) is a mechanism for the entry of extracellular calcium into the cell in response to calcium released from intracellular stores [2] and plays an important role in controlling calcium homeostasis [3]. Many studies have related the role of SOCE to growth, proliferation, and apoptotic processes in many cells. In situations where the need for calcium increases, SOCE acts as a passageway for calcium entry to adapt to the increased need for calcium-dependent processes in muscle fibers [1]. Research evidence shows that calcium signaling pathways in skeletal muscles are dependent on incoming calcium and SOCE is important to maintain calcium to prevent muscle weakness and provide calcium needed to modulate the expression of muscle-specific genes [4].

Several proteins are involved in the coordination of SOCE. Stromal interaction molecule 1 (STIM1) is a calcium sensor located in the sarcoplasmic reticulum. It has been shown that mice lacking STIM1 have weak muscles and both tetanic and stimulated forces are reduced in the state of fatigue [4]. STIM1 protein is involved in controlling the entry of calcium ions into cells when calcium levels are low, especially through calcium release-activated calcium channel protein 1 (CRAC). The flow of calcium ions through CRAC causes intracellular signals that play an important role in many cellular functions, such as controlling gene activity, cell growth, and division, as well as immune function [5]. When calcium levels in the endoplasmic reticulum are low, changes occur in the cell that enables STIM1 to bind to the protein ORAI1 (calcium

conductor in the T muscle system) in the cell membrane. ORAI1 protein, which is part of CRAC, creates a hole in the cell membrane through which calcium ions can flow [6]. Also, the mitsugumin 29 (*MG29*) protein, which is a structural protein, seems to be expressed exclusively in skeletal muscle (in the transverse tubes and terminal cisterna in the sarcoplasmic reticulum) and is involved in calcium influx [7]. *MG29* protein is a muscle-specific member of the synaptophysin family, which is involved in controlling the maturation and development of transverse tubule structure and maintaining intracellular calcium signals in skeletal muscle. Genetic destruction of *MG29* leads to incomplete formation of transverse tube network in skeletal muscles [8]. In addition, mice lacking the *MG29* gene show abnormal performance in skeletal muscles, such as low contractile force and impaired SOCE. In chronic muscle-wasting diseases or disorders, such as atrophy and sarcopenia, mice lacking the *MG29* gene are more prone to fatigue [9].

Sports activity can improve sports and muscle performance by creating different physiological adaptations [10]. It is also presented as an effective intervention in reducing the loss of muscle mass and function [2]. The ability of muscle fibers to respond to external stimuli is considered muscle variability. Various intracellular changes, such as changes in metabolites, hypoxia, mechanical stress, and free intracellular calcium are involved in these changes. It has been shown that calcium cell cycle changes with muscle activity are the most abundant and potential secondary messengers in skeletal muscles [11]. Intracellular calcium plays an important role in muscle fibers to produce force, maintaining the cell's energy supply, regulating the expression of muscle-specific genes, and the process of apoptosis [12]. It has been shown that aerobic exercises improve the movement of calcium in skeletal muscles and are associated with the improvement of sports activity and skeletal muscle performance. In this regard, it has been stated that sports activity increases the levels of proteins involved in the release and uptake of calcium in the sarcoplasmic reticulum [13]. In addition, an increase in dihydropyridine gene and protein expression has been observed in response to muscle activity [14]. Based on this, understanding the mechanisms involved in muscle atrophy and the role of genes involved in calcium flow is important for the development of new treatment methods to deal with conditions and diseases, such as muscular dystrophy and atrophy caused by inactivity. Accordingly, the present study aims to investigate the effect of reduced physical activity after a combined training period on the expression of *STIM1*, *ORAI1*, and *MG29* genes in the plantaris muscle of male Wistar rats.

Materials and Methods

In this experimental study, a total of 16 adult male Wistar rats in the weight range of 250 ± 20 g were selected. To get familiar with the environment of the animal house, the rats were kept in the animal laboratory at a temperature of $22 \pm 4^\circ\text{C}$ under a 12/12 h dark-light cycle and were fed with special food and water. Throughout the research, the mice were moved and manipulated by two individuals, and all the processes of the present research were carried out following all the ethical principles of working with animals.

Research groups

Animal samples were randomly divided into two groups. The groups were divided as follows: 1) Control group-spinal nerve ligation (SNL) (8 rats), 2) Combined training group-SNL (8 rats). At the beginning of the research, the animals of the combined exercise-SNL group participated in the exercise program (combined resistance and endurance exercise) for 6 weeks. The animals of the control-combined-SNL group did not perform any sports activities during this period. Subsequently, the SNL protocol was implemented for 4 weeks in both research groups. In the end, the mice were dissected and tissue samples were taken to perform cellular and molecular tests.

Combined exercise program (endurance-resistance)

The combined training program in this research was performed as follows: The animals of the training group performed a combination of endurance and resistance training. At the beginning and before the start of the endurance training program, the animals walked for 5 days a week for 10 to 15 min at a speed of 10 m/min on the treadmill for rodents. For endurance training in the present study, moderate training intensity (60% to 70% of maximum oxygen consumption) was used. Thus, the animals of the training group were subjected to endurance training on the treadmill for 6 weeks and 3 sessions every week. The speed and duration of training increased gradually (Table 1). To achieve the obtained adaptations to a uniform state, all training variables were kept constant in the final week (sixth week) [15].

Resistance training was in the form of climbing a ladder for rodents with weights. In the familiarization phase with resistance training, the mice were introduced to how to climb the ladder for 10 to 15 min daily for 3 days. The main exercise was performed with target weights connected to the mouse's tail through the cylinder and the mouse climbed the ladder in this state. This exercise was

performed for six weeks by climbing a 1-m ladder with weights at an 85-degree incline. Training sessions were held twice in the morning (at 9:00), in the evening (at 14:00), and once every 3 days. The rats performed 3 sets of 5 repetitions in each session. The rest interval between sets was 2 min while it was 1 min between repetitions. When necessary, electric shock (0.2-0.3 mA) was used to stimulate the rats to climb the ladder. To increase the load, in the first week, 50% of the body weight of the mice was used and the load was gradually increased during the training program.

Physical activity reduction protocol using spinal nerve ligation model

The SNL model is a method that is widely used to study the mechanisms of neuropathic pain and the effect of drugs and behaviors related to pain. To create an SNL model, the rats were first anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg per kg of body weight; intraperitoneally), and then their fifth lumbar spinal nerve was ligated and tightly tied according to the method of Kim and Chung (1992) [17]. The duration of the spinal cord ligation protocol was 4 weeks. In this method, after ensuring that the animal is anesthetized, the intervertebral muscles at the level of the fourth lumbar and second sacral vertebrae were separated and the transverse appendage of the sixth lumbar vertebra was removed. Then, the fifth lumbar nerve on the left side of the spinal cord was separated from the adjacent nerves with special delicacy and firmly tied using special thread silk (made in Japan), exactly at the distal end to ensure disruption of all fibers. This method was performed with great precision to prevent damage to the fourth lumbar nerve.

Tissue extraction method

After 4 weeks of ligation, the rats were anesthetized and immediately weighed. Then, under completely sterile conditions using a surgical blade, the plantaris muscle was extracted by cutting the proximal and distal tendons and weighed with a laboratory scale (accuracy 0.0001; AND GR model made in Japan), immediately frozen in liquid nitrogen, and kept in the freezer until the cell-molecular tests.

RNA extraction and cDNA synthesis

About 50 mg of plantaris muscle tissue was homogenized in QIAzol lysis reagent at a ratio of 1: 10 to extract total RNA. To remove the protein components, the product was centrifuged at 12000 g for 10 min at 4°C and then mixed with chloroform at a ratio of 0.5: 1 and shaken vigorously for 15 s. The product was centrifuged at 4°C , 15

min, and 12000 g, and the mineral and aqueous fractions were separated. Then, the part containing RNA was removed and mixed with isopropanol at a ratio of 0.5: 1 and left for 10 min at room temperature and then centrifuged at 12000 g for 10 min at 4°C. Next, the pellet containing RNA was washed in ethanol and dissolved in 20 µL of RNAS-free water. Also, the RNA concentration was measured (using the Eppendorf device, Germany) and the ratio of 260 to 280 between 1.8 and 2 was defined as the optimal purity. cDNA synthesis was done using 1 µg of RNA and using the cDNA synthesis kit to make fermentate and Mulv reverse transcriptase enzyme.

Real-time polymerase chain reaction

The measurement of the expression levels of the desired genes in the present study was done by quantitative real-time-PCR method using the Primix cyber green II (USA Applied Biosystems). The reaction mixture was in a final volume of 20 µL and each reaction was performed in duplicate. Primers were designed based on the information of genes in the NCBI gene bank and by Macrogen Inc. Seoul, Korea. The sequence of primers used in the research is reported in Table 2. In addition, GAPDH was used as a control gene. The temperature program used in the real time-PCR included 95°C for 10 min, 95°C for 15 s, and 60°C for 1 min (repetition of 40 cycles). The expression level of the desired genes was also measured by the CTAA-2 method.

Data analysis

Descriptive statistics were used to describe the data and inferential statistics were used to test the research hypotheses. In the inferential statistics section, the Kolmogorov-Smirnov and Levene tests were used to check the normality of the data along with the homogeneity of the variances. After verifying these assumptions, to determine the significance of the difference in gene expression, an independent t-test was used at a significance level of 0.05 using the SPSS software, version 20.

Results

The results of the independent t test showed a significant effect of the exercise factor on the *STIMI* gene expression levels in the plantaris muscle in the combined exercise-SNL group compared to the control group-SNL (P=0.01). Accordingly, performing a combined training period before the SNL leads to an increase in *STIMI* gene expression in the plantaris muscle (Figure 1).

Also, a significant effect of the training factor on *ORAI1* gene expression levels in the plantaris muscle was observed in the combined exercise-SNL group compared to the control group-SNL (P=0.002). Therefore, performing a combined training session before SNL leads to an increase in *ORAI1* gene expression in the plantaris muscle (Figure 2).

In addition, a significant effect of the exercise factor on *MG29* gene expression levels in the plantaris muscle was observed in the combined exercise-SNL group compared to the control group-SNL (P=0.02). Therefore, performing a combined training period before SNL leads to an increase in *MG29* gene expression in the plantaris muscle (Figure 3).

Discussion

Atrophy of muscle mass occurs in conditions of long-term non-use of organs. Some physiological (without mechanical loading of organs) and pathological conditions (disturbance in blood supply) lead to atrophy and loss of muscle mass [18, 19]. In this situation, the decrease in power production and atrophy can affect the QoL of people [20]. Therefore, it is important to discover the mechanisms related to muscle atrophy to prevent and treat this phenomenon. In the current study, the effect of reduced physical activity in the form of SNL after a period of combined training on the expression of genes involved in calcium flow was evaluated. The results of the research showed that an increase in the expression of *STIMI*, *ORAI1*, and *MG29* genes was observed in the combined exercise-SNL group compared to the control group-SNL. These results show that SNL leads to a decrease in the expression of these genes in the plantaris muscle, and performing a combined training session before SNL has a compensatory effect in this regard.

Intracellular calcium ions represent a signaling mediator that plays an important role in regulating various cellular processes in muscles. Maintaining calcium homeostasis is essential for maintaining the structure and function of skeletal muscles. SOCE, which is activated by the depletion of intracellular calcium stores (helps regulate various functions in many cell types) is critical for ensuring proper calcium homeostasis in muscle cells and is coordinated by *STIMI* and *ORAI1*. The influx of calcium through SOCE plays an important role in the short-term and long-term functions of muscles, regulation, and adaptation of many cellular processes, including muscle contraction, postnatal growth, phenotype, and plasticity of myofibers. The loss or mutation of *STIMI/ORAI1* genes and changes in SOCE are associated with serious consequences for muscle function. Also, evidence shows that changes in SOCE can cause changes in intracellular calcium signals

Table 1. Numerical representation of endurance training protocol

Week	1 st	2 nd	3 rd	4 th	5 th	6 th
Exercise duration (min)	10	20	20	30	30	30
Reel speed (m/min)	10	20	15	15	18	18

Internal Medicine Today

Table 2. The sequence of primers used in the present study

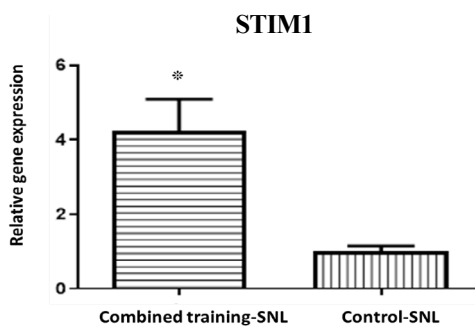
Gene	Sequence of Primers	NCBI	Amplicon Size, Basis Pairs	Melting Point
<i>ORAI1</i>	F: 5'-ccataagacggaccgacagt-3' R: 5'-gggaaggtgaggacttaggc-3'	NM_001013982. 1	132	82. 02
<i>STIM1</i>	F: 5'-tggagctgccacagtatgag-3' R: 5'-tgattgtggcgagtcaagag-3'	NM_001108496. 2	196	82. 02
<i>MG29</i>	F: 5'-GGAATCCGCTGGGCTTCATCAAAGTTCTCC-3' R: 5'-CGGGATCCGACTCACCTGAAGGGATAGCC-3'	AB158471. 1	196	82. 02
<i>GAPDH</i>	F: 5'-gtcaggtcatcactatcggaat-3' R: 5'-agaggtctttacggatgcaacgt-3'	NM_031144. 3	147	82. 02

Internal Medicine Today

in skeletal muscle, which are involved in the pathogenesis of various progressive muscle diseases, such as tubular myopathy, muscular dystrophy, cachexia, and sarcopenia [21]. It has been reported that new junctions between the sarcoplasmic reticulum and transverse tubules formed during exercise, which contain STIM1 and ORAI1, act as calcium entry units. These junctions provide a path for the rapid recovery of calcium ions from the extracellular space during repetitive muscle activity [22]. The *MG29* protein is involved in controlling the maturation and expansion of the structure of the transverse tubes and maintaining intracellular calcium signals in skeletal

muscle. Genetic destruction of *MG29* leads to incomplete formation of transverse tube network in skeletal muscles. The amount of *MG29* protein decreases significantly in animal models with muscular dystrophy, and the reduced expression of *MG29* and the disturbed structure of the transverse tubules have been seen in human samples suffering from muscular dystrophy [8].

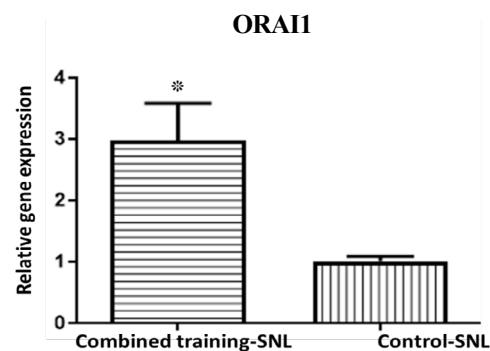
As a result of reducing physical activity (without muscle loading), the gene and protein expression of *TRPC1* and *TRPC3* channels decreases in the skeletal muscles of rats, and with reloading, their expression returns to the initial



Internal Medicine Today

Figure 1. *STIM1* gene expression changes

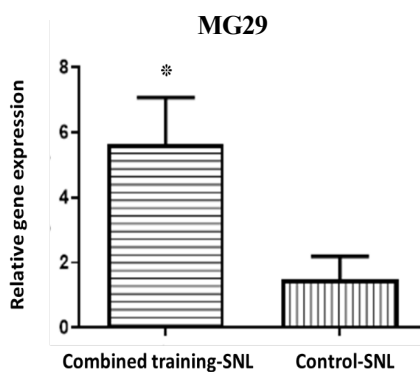
*A significant difference between research groups (P<0.05).



Internal Medicine Today

Figure 2. *ORAI1* gene expression changes

*A significant difference between research groups (P<0.05).



Internal Medicine Today

Figure 3. *MG29* gene expression changes

*A significant difference between research groups ($P < 0.05$)

state. Considering the role of these channels in muscle growth, the observed changes in *TRPC1* and *TRPC3* may be closely related to the processes of muscle atrophy and regeneration [23]. Also, in the investigation of the functional role and effect of painful nerve damage on calcium influx stored in sensory nerve cells, axon damage due to SNL increases SOCE and CRAC. However, when calcium stores were depleted, SOCE was similar in injured and control neurons, and *STIM1* and *ORAI1* levels were not altered by SNL. These results show that the reset of SOCE after nerve ligation is done by the depletion of calcium stores. Also, suppression of SOCE increases the excitability of neurons in control conditions as well as damaged neurons. This is while damaged nerve cells show special dependence on SOCE to maintain cytoplasmic levels and store calcium. This dependence shows the compensatory role of SOCE after nerve damage [24].

Some researchers have investigated the effect of exercise on homeostasis and calcium influx. For example, Izadi et al. (2017) showed that intense intermittent exercise in diabetic rats improves the inappropriate regulation of *RyR2* using a mechanism that targets the intensity and duration of exercise, and the type of exercise normalizes or reduces the effect of the reduction of *RyR2* gene expression and its inappropriate function caused by diabetic cardiomyopathy [25]. In addition, it has been shown that the expression of cellular calcium regulatory genes, such as *STIM1* and *ORAI1*, is significantly reduced by moderate-intensity endurance exercise and improves intracellular calcium signals in liver lymphocytes [26]. These results are consistent with the present study. Also, in line with the findings of the present study, Sazvar et al. (2016), investigating the effect of intense intermittent exercise on *RyR2* calcium channels and calcium pump in ischemia rats showed that the expression of *SERCA2a* gene increased in both exercise and exercise-ischemia groups. It was found that this increase was significantly higher in the

exercise-ischemia group, and intense intermittent exercise increased *RyR2* gene expression in both exercise-ischemia and trained groups which can eliminate abnormal contractions associated with cardiomyopathy caused by ischemia of the heart muscle and regulate the flow of calcium in the heart muscle [27]. In addition, Pecorai et al. (2018) in their study, titled “the effect of exercise training in the form of repetitive electrical stimulation in old mice with condensed transverse tubular myopathy disease,” which leads to the accumulation of *STIM1* and *ORAI1* in an ineffective form showed that exercise limits the formation of this disease and improves muscle function [28]. In examining the effect of endurance training on myogenic responses and ion flow caused by muscle atrophy, the possible increase in hemodynamic stimuli plays an important role in maintaining the myogenic response and calcium ion flow from TRPC channels. This explains the positive effect of endurance training in patients with limb paralysis because endurance training reduces myogenic response and calcium ion currents caused by atrophy [29]. Edwards et al. (2010) in the study of the effect of aerobic training on calcium influx associated with metabolic syndrome and coronary atherosclerosis showed that this training method has a protective effect on calcium influx by reducing the expression of *TRPC1* and *STIM1* genes and leads to decreased calcium influx associated with metabolic syndrome and coronary atherosclerosis [30].

Conclusion

According to the results of the present research, it was found that SNL leads to a decrease in the expression of *STIM1*, *ORAI1*, and *MG29* genes in the plantaris muscle, and performing a combined training session before SNL has a compensatory effect, which is probably one of the mechanisms related to the beneficial effects of exercise training on calcium homeostasis. However, more research is needed to clarify the main mechanisms in this regard. Performing a combination exercise was one of the strengths of the present study because this type of exercise can bring different answers and adaptations compared to other exercise programs. One of the limitations of the current research was the lack of evaluation of genes related to muscle atrophy.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study was approved by the ethics committee of **Kerman University of Medical Sciences** (Code: IR.KMU.REC.1399.190).

Funding

This article was extracted from the master's thesis of Sobhan Naghizadeh, registered by the Department of Sports Sciences, [Islamic Azad University, Kerman Branch](#). This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Authors' contributions

All authors have contributed equally to the preparation of this article.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.



مقاله پژوهشی

تأثیر ۴ هفته لیگاسیون عصب نخاعی پس از یک دوره تمرین ترکیبی بر بیان ژن‌های درگیر در جریان کلسیم در عضله پلاتناریس موش‌های نر ویستار

* عبدالرضا کاظمی^۱، هادی کرندی^۲، سبحان نقی‌زاده^۳

۱. گروه علوم ورزشی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه ولی عصر، رفسنجان، ایران.
۲. گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.
۳. گروه علوم ورزشی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران.

Use your device to scan and read the article online



Citation Kazemi A, Kerendi H, Naghizadeh S. [Investigating the Effects of Four Weeks of Spinal Nerve Ligation After a Period of Combined Training on the Expression of Involved Genes in Calcium Current in Plantaris Muscle of Male Wistar Rats (Persian)]. *Internal Medicine Today*. 2022; 28(4): 448-463. <https://doi.org/10.32598/hms.28.4.3812.1>

doi <https://doi.org/10.32598/hms.28.4.3812.1>

چکیده

تاریخ دریافت: ۱۹ بهمن ۱۴۰۰

تاریخ پذیرش: ۰۸ خرداد ۱۴۰۱

تاریخ انتشار: ۰۹ مهر ۱۴۰۱

اهداف: شناخت سازوکارهای درگیر در آتروفی عضلانی و نقش ژن‌های درگیر در جریان کلسیم در آتروفی ناشی از بی‌تحرکی، اهمیت بسزایی دارد. هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی اثر لیگاسیون عصب نخاعی پس از یک دوره تمرین ترکیبی بر بیان ژن‌های درگیر در جریان کلسیم در عضله پلاتناریس موش‌های نر ویستار بود.

مواد و روش‌ها: تعداد ۱۶ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار به‌طور تصادفی به ۲ گروه ۸ تایی تقسیم شدند: ۱. گروه کنترل-لیگاسیون عصب نخاعی، ۲. گروه تمرین ترکیبی-لیگاسیون عصب نخاعی. حیوانات گروه تمرینی به‌مدت ۶ هفته در برنامه تمرینی شرکت کردند. پس از این مدت، پروتکل لیگاسیون عصب نخاعی به‌مدت ۴ هفته بر روی گروه‌های پژوهش اجرا شد. در پایان، موش‌ها تشریح شدند و عضله پلاتناریس استخراج شد. به‌منظور اندازه‌گیری بیان mRNA ژن‌های مولکول برهمکنش استرومایی ۱، تعدیل‌کننده کلسیم فعال شده با آزادسازی کلسیم ۱ و میتسوگیومین ۲۹ از روش Real-Time PCR استفاده شد.

یافته‌ها: در گروه تمرین ترکیبی-لیگاسیون عصب نخاعی افزایش بیان ژن‌های مولکول برهمکنش استرومایی ۱، ($P=0/01$) تعدیل‌کننده کلسیم فعال شده با آزادسازی کلسیم ۱ ($P=0/002$) و میتسوگیومین ۲۹ ($P=0/02$) نسبت به گروه کنترل-لیگاسیون عصب نخاعی مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: نتایج پژوهش پیش‌رو نشان داد لیگاسیون عصب نخاعی منجر به کاهش بیان ژن‌های مولکول برهمکنش استرومایی ۱، تعدیل‌کننده کلسیم فعال شده با آزادسازی کلسیم ۱ و میتسوگیومین ۲۹ در عضله پلاتناریس می‌شود و تمرین ترکیبی پیش‌از لیگاسیون عصب نخاعی یک اثر جبرانی در این رابطه دارد.

کلیدواژه‌ها:

تمرین ورزشی، لیگاسیون، مولکول برهمکنش استرومایی ۱، تعدیل‌کننده کلسیم فعال شده با آزادسازی کلسیم ۱، میتسوگیومین ۲۹

* نویسنده مسئول:

دکتر عبدالرضا کاظمی

نشانی: رفسنجان، دانشگاه ولی عصر، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، گروه علوم ورزشی.

تلفن: ۳۹۸۲۷۰۶ (۹۱۳) ۹۸+

پست الکترونیکی: a.kazemi@vru.ac.ir

مقدمه

زمانی که سطوح کلسیم در شبکه آندوپلاسمیک پایین است، تغییراتی در سلول ایجاد می‌شود که STIM1 را قادر می‌سازد تا به پروتئین ORAI1 (هدایت‌کننده کلسیم در سیستم T عضلات) در غشای سلولی متصل شود. پروتئین ORAI1 که بخشی از CRAC است، یک روزنه در غشای سلولی ایجاد می‌کند که از طریق آن یون‌های کلسیم می‌توانند جریان پیدا کنند [۶]. همچنین پروتئین میتسوگومین^۴ ۲۹۴ که یک پروتئین ساختاری است به نظر می‌رسد منحصر در عضله اسکلتی (در لوله‌های عرضی و ترمینال سیسترنای در شبکه سارکوپلاسمیک) بیان می‌شود و در جریان ورودی کلسیم دخیل است [۷]. پروتئین MG29 یک عضو ویژه عضلاتی از خانواده سیناپتوفیزین^۵ است که در کنترل بلوغ و توسعه ساختار لوله‌های عرضی و حفظ سیگنال‌های داخل سلولی کلسیم در عضله اسکلتی شرکت دارد. تخریب ژنتیکی MG29 منجر به تشکیل ناقص شبکه لوله‌های عرضی در عضلات اسکلتی می‌شود [۸]. علاوه بر این موش‌های فاقد ژن MG29 عملکرد غیرطبیعی را در عضلات اسکلتی از قبیل نیروی انقباضی پائین و اختلال در SOCE نشان می‌دهند. در بیماری‌های تخریب عضلاتی مزمن یا اختلالاتی از قبیل آتروفی و سارکوپنیا، موش‌های فاقد ژن MG29 بیشتر مستعد خستگی هستند [۹].

فعالیت ورزشی می‌تواند با ایجاد سازگاری‌های فیزیولوژیک مختلف، عملکرد ورزشی و عضلات را بهبود بخشد [۱۰]. همچنین به‌عنوان یک مداخله مؤثر در کاهش از دست دادن توده و عملکرد عضلاتی ارائه شده است [۲]. توانایی تارهای عضلاتی در پاسخ به تحریکات خارجی به‌عنوان تغییرپذیری عضلاتی در نظر گرفته می‌شود. تغییرات درون سلولی مختلفی از قبیل تغییر در متابولیت‌ها، هیپوکسی، استرس مکانیکی، کلسیم آزاد درون سلولی در این تغییرپذیری‌ها نقش دارند. نشان داده شده است تغییرات درون سلولی کلسیم با فعالیت عضلاتی، فراوان‌ترین و بالقوه‌ترین پیامبر ثانویه در عضلات اسکلتی است [۱۱]. کلسیم درون سلولی نقش مهمی در تارهای عضلاتی با هدف تولید نیرو، حفظ تأمین انرژی سلول، تنظیم بیان ژن‌های ویژه عضله و فرایند آپوپتوز ایفا می‌کند [۱۲].

نشان داده شده است تمرینات هوازی، جابه‌جایی کلسیم را در عضلات اسکلتی بهبود می‌دهند و این همراه با بهبود فعالیت ورزشی و عملکرد عضلات اسکلتی است. در همین راستا، عنوان شده است فعالیت ورزشی، سطوح پروتئین‌های درگیر در رهاسازی و برداشت کلسیم در شبکه سارکوپلاسمی را افزایش می‌دهد [۱۳]. علاوه بر این، افزایش در بیان ژن و پروتئین دی هیدروپیریدین در پاسخ به فعالیت عضلاتی مشاهده شده است [۱۴]. براین اساس شناخت سازوکارهای درگیر در آتروفی عضلاتی و نقش ژن‌های درگیر در جریان کلسیم به توسعه روش‌های

آتروفی عضلاتی می‌تواند با برخی آسیب‌های بدنی در ارتباط باشد. کاهش عملکرد عضلاتی، یکی از مهم‌ترین عوامل مرتبط با کاهش تحرک است که کیفیت زندگی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. مکانیسم‌های درگیر در آتروفی عضلاتی به‌طور کامل شناخته نشده است، اما اعتقاد بر این است که اختلال در هموستاز کلسیم درون سلولی می‌تواند در پیشرفت عملکرد عضلاتی نقش داشته باشد [۱]. در شروع انقباض عضلاتی، کلسیم از شبکه سارکوپلاسمیک و از طریق گیرنده‌های رایانودین و دی هیدروپیریدین به درون سیتوزول رها می‌شود و در پایان انقباض، کلسیم به داخل شبکه سارکوپلاسمیک برگشت داده می‌شود. در طول هر مرحله از انقباض، کسری از کلسیم از طریق پمپ کلسیم غشایی خارج می‌شود؛ بنابراین، حفظ سطوح عملکردی کلسیم در داخل شبکه سارکوپلاسمیک و جریان ورودی کلسیم تنظیم‌شده توسط سیتوزول در سراسر غشای پلاسمایی برای عملکرد تارهای عضلاتی در مراحل مختلف رشد و در پاسخ به وضعیت‌های استرس‌زا اهمیت بسزایی دارد.

کلسیم ورودی از ذخایر عملیاتی (SOCE)^۱، مکانیسمی در جهت ورود کلسیم خارج سلولی به داخل سلول در پاسخ به کلسیم رهاشده از ذخایر درون سلولی است [۲] و نقش بسیار مهمی در کنترل هموستاز کلسیم دارد [۳]. پژوهش‌های بسیاری SOCE را به رشد، تکثیر و فرآیندهای آپوپتوزی در بسیاری از سلول‌ها ارتباط داده‌اند. در شرایطی که نیاز به کلسیم افزایش می‌یابد، SOCE به‌عنوان گذرگاهی برای ورود کلسیم عمل می‌کند تا به نیاز افزایش‌یافته برای فرآیندهای وابسته به کلسیم در تارهای عضلاتی سازگار شود [۱]. شواهد پژوهشی نشان می‌دهد مسیرهای پیام‌رسانی کلسیم در عضلات اسکلتی، وابسته به کلسیم ورودی است و SOCE برای حفظ کلسیم، بسیار مهم است تا از ضعف عضلاتی جلوگیری و کلسیم موردنیاز را برای تعدیل بیان ژن‌های ویژه عضله تأمین کند [۴].

پروتئین‌های متعددی در هماهنگی SOCE درگیر هستند. STIM1^۲، حسگر کلسیمی قرارگرفته در شبکه سارکوپلاسمیک است. نشان داده شده است موش‌های فاقد STIM1 عضلات ضعیفی دارند و در آن‌ها، هر دو نیروی تتانی و نیروی تحریک‌شده در وضعیت خستگی کاهش می‌یابد [۴]. پروتئین STIM1 در کنترل ورود یون کلسیم به سلول‌ها در هنگام پایین بودن سطوح کلسیم به‌ویژه از طریق CRAC^۳، دخیل است. جریان یون‌های کلسیم از طریق CRAC موجب سیگنال‌های درون سلولی می‌شود که در بسیاری از عملکردهای سلولی مانند کنترل فعالیت ژنی، رشد و تقسیم سلولی و همچنین عملکرد ایمنی نقش مهمی دارد [۵].

1. Store-operated Ca²⁺ entry (SOCE)

2. Stromal interaction molecule 1

3. Calcium release-activated calcium channel protein 1 (CRAC)

4. Mitsugumin 29

5. Synaptophysin

درمانی جدید برای مقابله با وضعیت‌ها و بیماری‌هایی از قبیل دیستروفی عضلانی و آتروفی ناشی از بی‌حرکی اهمیت بسزایی دارد؛ بنابراین هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی اثر فعالیت بدنی کاهش یافته پس از یک دوره تمرین ترکیبی بر بیان ژن‌های مولکول برهمکنش استرومایی ۱، تعدیل‌کننده کلسیم فعال شده با آزادسازی کلسیم ۱ و میتسوگومین ۲۹ در عضله پلانتریس موش‌های نروبیستار بود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش که به روش تجربی انجام شد، تعداد ۱۶ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار در محدوده وزنی 25.0 ± 2.0 گرم انتخاب شد. جهت آشنایی با محیط حیوان‌خانه، حیوانات در شرایط دمایی 22 ± 4 درجه سانتی‌گراد و تحت چرخه ۱۲:۱۲ ساعت تاریکی-روشنایی در آزمایشگاه حیوانات نگهداری و با غذای مخصوص و آب تغذیه می‌شدند. در سراسر دوره پژوهش موش‌ها توسط دو نفر جابه‌جا و دستکاری شدند و تمام فرایندهای پژوهش حاضر مطابق با کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات انجام شد.

گروه‌های پژوهش

نمونه‌های حیوانی به‌طور تصادفی به ۲ گروه تقسیم شدند. تقسیم‌بندی گروه‌ها به این صورت بود:

۱. گروه کنترل- لیگاسیون عصب نخاعی^۶ (۸ سر موش)،
۲. گروه تمرین ترکیبی- لیگاسیون عصب نخاعی (۸ سر موش).

در آغاز پژوهش، حیوانات گروه تمرین ترکیبی-لیگاسیون عصب نخاعی به مدت ۶ هفته در برنامه تمرینی (تمرین مقاومتی و استقامتی به‌صورت ترکیبی) شرکت کردند. حیوانات گروه کنترل-ترکیبی-لیگاسیون عصب نخاعی در این مدت هیچ‌گونه فعالیت ورزشی انجام ندادند. پس از این مدت، پروتکل لیگاسیون عصب نخاعی به مدت ۴ هفته در هر دو گروه پژوهش اجرا شد. در پایان، موش‌ها تشریح شدند و بافت‌برداری جهت انجام آزمایش‌های سلولی و مولکولی به عمل آمد.

برنامه تمرین ترکیبی (استقامتی-مقاومتی)

برنامه تمرین ترکیبی در این پژوهش به این صورت بود که

6. Spinal nerve ligation

جدول ۱. نمایش عددی پروتکل تمرین استقامتی

حیوانات گروه تمرین به‌صورت ترکیبی، تمرین استقامتی و مقاومتی را انجام می‌دادند. در آغاز و پیش از شروع برنامه تمرین استقامتی، حیوانات به منظور آشناسازی، ۵ روز در هفته و به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه و با سرعت ۱۰ متر در دقیقه بر روی نوارگردان مخصوص جوندگان راه رفتند. برای تمرین استقامتی در پژوهش حاضر از شدت تمرینی متوسط (۶۰-۷۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه) استفاده شد. بدین صورت که حیوانات گروه تمرین بر روی نوارگردان به مدت ۶ هفته و هر هفته ۳ جلسه در معرض تمرین استقامتی قرار گرفتند. سرعت و مدت تمرین به تدریج افزایش می‌یافت (جدول شماره ۱). جهت رسیدن سازگاری‌های به‌دست‌آمده به حالت یکنواخت، تمامی متغیرهای تمرینی در هفته پایانی (هفته ششم) ثابت نگه داشته شد [۱۵].

تمرین مقاومتی به شکل بالارفتن از نردبان مخصوص جوندگان همراه با وزنه بود. در مرحله آشنایی با تمرین مقاومتی، موش‌ها به مدت ۳ روز و هر روز ۱۰ تا ۱۵ دقیقه با نحوه چگونگی صعود از نردبان آشنا شدند. تمرین اصلی به این صورت بود که وزنه‌های موردنظر از طریق سیلندر به دم موش متصل شدند و موش در این حالت از نردبان بالا می‌رفت. این تمرین به مدت ۶ هفته و به‌صورت صعود همراه با وزنه از نردبان ۱ متری و با شیب ۸۵ درجه انجام می‌شد. جلسات تمرینی در ۲ نوبت صبح (ساعت ۹) و عصر (ساعت ۲) و هر ۳ روز یک بار انجام می‌شد. موش‌ها در هر جلسه، ۳ ست ۵ تکراری انجام می‌دادند. فاصله استراحتی بین ست‌ها، ۲ دقیقه و بین تکرارها ۱ دقیقه بود. در مواقع ضروری از شوک الکتریکی (۲/۳-۰/۳ میلی‌آمپر) برای تحریک موش‌ها به بالا رفتن از نردبان استفاده می‌شد. نحوه افزایش بار بدین صورت بود که در هفته اول ۵۰ درصد وزن بدن موش استفاده شد و افزایش تدریجی بار در طول برنامه تمرینی اعمال می‌شد [۱۶].

پروتکل کاهش فعالیت بدنی با استفاده از مدل لیگاسیون عصب نخاعی

مدل لیگاسیون عصب نخاعی روشی است که به‌طور گسترده برای مطالعه سازوکارهای درد نوروپاتی و تأثیر داروها و رفتارهای مرتبط با درد مورد استفاده قرار می‌گیرد. جهت ایجاد مدل لیگاسیون عصب نخاعی، ابتدا موش‌ها با سدیم پنتوباریتال (۶۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم وزن بدن به‌صورت درون صفاقی) بیهوش شدند و سپس عصب پنجم کمری نخاعی آن‌ها بر اساس

هفته	اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم
مدت تمرین (دقیقه)	۱۰	۲۰	۲۰	۳۰	۳۰	۳۰
سرعت نوارگردان (متر بر دقیقه)	۱۰	۱۰	۱۵	۱۵	۱۸	۱۸

Real time – PCR

اندازه‌گیری سطوح بیان ژن‌های موردنظر در پژوهش حاضر به‌وسیله روش کمی Real time-PCR با استفاده از Primix syber green II انجام شد^۹. مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر و هر واکنش به‌صورت تکراری^{۱۰} انجام شد. طراحی پرایمرها براساس اطلاعات ژن‌ها در مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی^{۱۱} و توسط شرکت ماکروژن^{۱۲} انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش در جدول شماره ۲ گزارش شده است. در ضمن از GAPDH به‌عنوان ژن کنترل استفاده شد. برنامه دمایی مورد استفاده در Real time-PCR شامل: ۹۵ سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه، ۹۵ سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه (تکرار ۴۰ چرخه) است. میزان بیان ژن‌های موردنظر نیز با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ اندازه‌گیری شد.

روش آماری

از آمار توصیفی جهت توصیف داده‌ها و از آمار استنباطی جهت آزمون فرضیه‌های پژوهش استفاده شد. در بخش آمار استنباطی برای بررسی طبیعی بودن داده‌ها و نیز همگن بودن واریانس‌ها به ترتیب آزمون‌های کولموگروف-اسمیرنوف^{۱۳} و لون^{۱۴} مورد استفاده قرار گرفت. پس از احراز این مفروضه‌ها، جهت تعیین معناداری تفاوت در بیان ژن‌ها از آزمون تی مستقل^{۱۵} در سطح معناداری ۰/۰۵ و با استفاده از نسخه ۲۰ نرم‌افزار SPSS استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج آزمون تی مستقل، اثر معناداری در عامل تمرین بر سطوح بیان ژن STIM1 در عضله پلاتناریس در گروه تمرین ترکیبی-لیگاسیون عصب نخاعی نسبت به گروه کنترل-لیگاسیون عصب نخاعی نشان داد ($P=0/01$)؛ بنابراین، انجام یک دوره تمرین ترکیبی قبل از لیگاسیون عصب نخاعی منجر به افزایش بیان ژن STIM1 در عضله پلاتناریس می‌شود (تصویر شماره ۱).

همچنین اثر معناداری در عامل تمرین بر سطوح بیان ژن ORAI1 در عضله پلاتناریس در گروه تمرین ترکیبی-لیگاسیون عصب نخاعی نسبت به گروه کنترل-لیگاسیون عصب نخاعی مشاهده شد ($P=0/002$)؛ بنابراین، انجام یک دوره تمرین ترکیبی قبل از لیگاسیون عصب نخاعی منجر به افزایش بیان ژن ORAI1 در عضله پلاتناریس می‌شود (تصویر شماره ۲).

روش کیم و چانگ^۷ [۱۷] به‌طور محکم گره زده شد. مدت پروتکل لیگاسیون عصب نخاعی، ۴ هفته بود. در این روش، پس از اطمینان از بیهوشی حیوان، عضلات بین مهره‌ای در سطح مهره چهارم کمری و دوم خاجی جدا و زائده عرضی مهره ششم کمری برداشته شد. سپس عصب پنجم کمری سمت چپ نخاع مشخص و با ظرافت خاصی از اعصاب مجاور جدا و به‌طور محکم با استفاده از نخ مخصوص^۸ (ساخت کشور ژاپن)، دقیقاً در انتهای دیستال جهت اطمینان از ایجاد اختلال در تمام فیبرها گره زده شد. این روش جهت جلوگیری از آسیب به عصب چهارم کمری، با دقت بسیار بالایی انجام شد.

روش استخراج بافت

موش‌ها پس از ۴ هفته لیگاسیون، بیهوش و بلافاصله وزن‌کشی شدند. سپس در شرایط کاملاً استریل و با استفاده از تیغ جراحی، عضله پلاتناریس با قطع تاندون پروگزیمال و دیستال استخراج شد و با ترازوی آزمایشگاهی (دقت ۰/۰۰۰۱؛ مدل GR ساخت شرکت A&D کشور ژاپن) وزن‌کشی شدند و بلافاصله در نیتروژن مایع، منجمد و تا انجام آزمایش‌های سلولی-مولکولی در فریزر نگهداری شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA

حدود ۵۰ میلی‌گرم بافت عضله پلاتناریس جهت استخراج total RNA، به نسبت ۱ به ۱۰ در QIAzol Lysis Reagent هموزن شد. به‌منظور برداشتن اجزاء پروتئینی، محصول در دمای ۴ سانتی‌گراد، ۱۰ دقیقه، ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد و سپس به نسبت ۱ به ۵ با کلروفرم مخلوط و به‌مدت ۱۵ ثانیه به‌شدت تکان داده شد. محصول در ۴ سانتی‌گراد، ۱۵ دقیقه، ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ و بخش معدنی و آبی از هم جدا شد. سپس بخش محتوی RNA برداشته شد و با نسبت ۱ به ۵ با ایزوپروپانول مخلوط و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق رها و سپس در ۴ سانتی‌گراد، ۱۰ دقیقه، ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. در ادامه، پلت حاوی RNA در اتانول شست‌وشو و در ۲۰ میکرولیتر آب RNase-Free حل شد. همچنین غلظت RNA با استفاده از دستگاه Ep-pendorff، Germany مورد سنجش قرار گرفت و نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ به‌عنوان تخلیص مطلوب تعریف شد. سنتز cDNA با استفاده از ۱ میکروگرم از RNA و با استفاده از کیت سنتز cDNA ساخت فرمنتاز و آنزیم Transcriptase Reverse Mulv انجام شد.

9. USA Applied Biosystems

10. Duplicate

11. National Center for Biotechnology Information (NCBI)

12. Macrogen Inc. Seoul، Korea

13. Kolmogorov-Smirnov

14. Levene's test

15. Independent Samples T-Test

7. Kim and Chung

8. Thread silk

جدول ۲. توالی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر

ژن	توالی پرایمر	NCBI	Amplicon Size, bp	دمای ذوب
مولکول برهمکنش استرومایی ۱	F=5'-ccataagacggaccgacagt-3' R=5'-gggaaggtgaggacttaggc-3'	NM_001013982. 1	۱۳۲	۸۲/۰۲
تعدیل کننده کلسیم فعال شده با آزادسازی کلسیم ۱	F=5'-tggagctgccacagtatgag-3' R=5'-tgattgtggcgagtcaagag-3'	NM_001108496. 2	۱۹۶	۸۲/۰۲
میتسوگیومین ۲۹	F=GGAATTCGGCTGGGCTTCATCAAAGTTCTCC R=CGGGATCCGACTCACCTGAAGGGATAGCC	AB158471. 1	۱۹۶	۸۲/۰۲
گلیسرآلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز	F=5'-gtcaggtcatcactatcgcaat-3' R=5'-agaggtctttacggatgtcaacgt-3'	NM_031144. 3	۱۴۷	۸۲/۰۲

طب داخلی روز

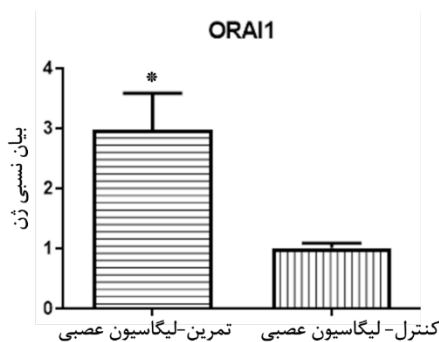
ارزیابی شد. نتایج پژوهش نشان داد در گروه تمرین ترکیبی-لیگاسیون عصب نخاعی نسبت به گروه کنترل-لیگاسیون عصب نخاعی افزایش بیان ژن‌های مولکول برهمکنش استرومایی ۱، تعدیل کننده کلسیم فعال شده با آزادسازی کلسیم ۱ و میتسوگیومین ۲۹ مشاهده شد. این نتایج نشان می‌دهد لیگاسیون عصب نخاعی منجر به کاهش بیان این ژن‌ها در عضله پلاتناریس می‌شود و انجام یک دوره تمرین ترکیبی پیش از لیگاسیون عصب نخاعی یک اثر جبرانی در این رابطه دارد.

یون‌های کلسیم داخل سلولی نشان‌دهنده یک واسطه سیگنالینگ هستند که نقش مهمی در تنظیم فرآیندهای مختلف سلولی در عضلات ایفا می‌کند. حفظ هموستاز کلسیم برای حفظ ساختار و عملکرد عضلات اسکلتی بسیار ضروری است. SOCE که با کاهش ذخایر درون سلولی کلسیم فعال می‌شود (به تنظیم عملکردهای مختلف در بسیاری از انواع سلول‌ها کمک می‌کند) برای اطمینان از هموستاز مناسب کلسیم در سلول‌های عضلانی حیاتی است و توسط STIM1 و ORAI1 هماهنگ می‌شود. عموماً پذیرفته شده است که جریان ورودی کلسیم از طریق SOCE نقش مهمی در عملکردهای کوتاه‌مدت و بلندمدت عضلات،

علاوه بر این اثر معناداری در عامل تمرین بر سطوح بیان ژن MG29 در عضله پلاتناریس در گروه تمرین ترکیبی-لیگاسیون عصب نخاعی نسبت به گروه کنترل-لیگاسیون عصب نخاعی مشاهده شد ($P=0/02$)؛ بنابراین، انجام یک دوره تمرین ترکیبی قبل از لیگاسیون عصب نخاعی منجر به افزایش بیان ژن MG29 در عضله پلاتناریس می‌شود (تصویر شماره ۳).

بحث

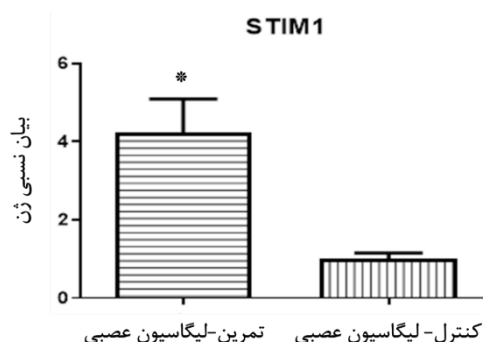
تحلیل توده عضلانی در شرایط عدم استفاده طولانی مدت از اندام‌ها ایجاد می‌شود. برخی شرایط فیزیولوژیک (بدون بار کردن مکانیکی اندام‌ها) و پاتولوژیک (اختلال در خون‌رسانی) منجر به آتروفی و تحلیل توده عضلانی می‌شود [۱۹، ۱۸]. در این شرایط، کاهش تولید نیرو و آتروفی ایجاد شده می‌تواند کیفیت زندگی افراد را تحت تأثیر قرار دهد [۲۰]؛ بنابراین کشف سازوکارهای مرتبط با آتروفی عضلانی جهت پیشگیری و درمان این پدیده از اهمیت بالایی برخوردار است. در پژوهش حاضر اثر فعالیت بدنی کاهش یافته به شکل لیگاسیون عصب نخاعی پس از یک دوره تمرین ترکیبی بر بیان ژن‌های درگیر در جریان کلسیم



طب داخلی روز

تصویر ۲. تغییرات بیان ژن ORAI1.

* نشان‌دهنده تفاوت معنادار بین گروه‌های پژوهش است ($P<0/05$).



طب داخلی روز

تصویر ۱. تغییرات بیان ژن STIM1.

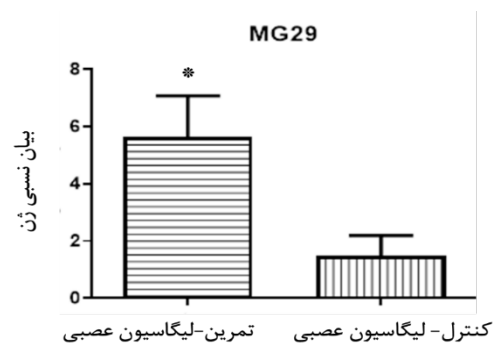
* نشان‌دهنده تفاوت معنادار بین گروه‌های پژوهش است ($P<0/05$).

نشان داده شده است در اثر کاهش فعالیت بدنی (بدون بار کردن عضلات)، بیان ژن و پروتئین کانال‌های TRPC1 و TRPC3 در عضلات اسکلتی موش‌ها کاهش می‌یابد و با بارگذاری مجدد، بیان آن‌ها به حالت ابتدایی برمی‌گردد. با توجه به نقش شناخته شده این کانال‌ها در رشد عضلات، تغییرات مشاهده شده در TRPC1 و TRPC3 ممکن است با فرایندهای آتروفی و بازسازی عضله ارتباط نزدیکی داشته باشد [۲۳].

همچنین در بررسی نقش عملکردی و تأثیر آسیب عصبی دردناک بر جریان ورودی کلسیم ذخیره شده در سلول‌های عصبی حسی، گزارش شده است که آسیب آکسون در اثر لیگاسیون عصب نخاعی باعث افزایش SOCE و CRAC می‌شود. باین حال، زمانی که ذخایر کلسیم تخلیه شد، SOCE در سلول‌های عصبی آسیب دیده و کنترل شبیه به هم بود و سطح STIM1 و ORAI1 توسط لیگاسیون عصب نخاعی تغییری نشان نداد. این نتایج نشان می‌دهد که تنظیم مجدد SOCE پس از لیگاسیون عصبی توسط تخلیه ذخایر کلسیم انجام می‌شود. همچنین سرکوب SOCE، تحریک پذیری سلول‌های عصبی را در شرایط کنترل و همچنین نورون‌های آسیب دیده افزایش می‌دهد، در حالی که سلول‌های عصبی آسیب دیده وابستگی خاصی به SOCE برای حفظ سطوح سیتوپلاسمی و ذخیره کلسیم نشان می‌دهند. این وابستگی، نقش جبرانی SOCE پس از آسیب عصبی را نشان می‌دهد [۲۴].

برخی پژوهشگران به بررسی تأثیر تمرینات ورزشی بر هموستاز و جریان ورودی کلسیم پرداخته‌اند. برای مثال ایزدی و همکاران در پژوهشی نشان دادند تمرین تناوبی شدید در موش‌های مبتلا به دیابت، تنظیم نامناسب RYR2²¹ را به وسیله یک سازوکار که شدت و مدت تمرین را هدف قرار داده است، بهبود می‌بخشد و این نوع تمرین اثر کاهشی بیان ژن RYR2 و عملکرد نامناسب آن را که از کاردیومیوپاتی دیابتی ناشی می‌شود، طبیعی می‌سازد یا کاهش می‌دهد [۲۵]. علاوه بر این نشان داده شده است که بیان ژن‌های تنظیم کننده کلسیم سلولی مانند STIM1 و ORAI1 به طور قابل توجهی در اثر تمرین استقامتی با شدت متوسط کاهش می‌یابد و باعث بهبود سیگنال‌های کلسیم داخل سلولی در لنفوسیت‌های کبدی می‌شود [۲۶]. این نتایج با پژوهش حاضر هم‌خوانی دارد.

همچنین هم‌راستا با پژوهش حاضر، سازوار و همکاران در بررسی تأثیر تمرین تناوبی شدید بر کانال‌های کلسیمی RYR2 و پمپ کلسیمی در موش‌های صحرایی ایسکمی شده نشان دادند که بیان ژن SERCA2a²² در هر دو گروه تمرین و تمرین-ایسکمی افزایش داشت که این افزایش به طور معناداری در گروه تمرین-ایسکمی بیشتر بود و تمرین تناوبی شدید موجب افزایش



طب داخلی روز

تصویر ۳. تغییرات بیان ژن MG29

* نشان دهنده تفاوت معنادار بین گروه‌های پژوهش است ($P < 0.05$).

تنظیم و تطبیق بسیاری از فرآیندهای سلولی از جمله انقباض عضلانی، رشد پس از تولد، فنوتیپ و شکل پذیری مایوفایبرها^{۱۶} دارد.

نشان داده شده است فقدان یا جهش ژن‌های STIM1/ORAI1 و در نتیجه تغییر در SOCE با عواقب جدی برای عملکرد عضلانی همراه است. همچنین، شواهد نشان می‌دهد تغییر در SOCE می‌تواند باعث تغییر سیگنال‌های کلسیم داخل سلولی در عضله اسکلتی شود که در پاتوز بیماری‌های پیش رونده عضلانی مختلف مانند مایوپاتی توبولار^{۱۷}، دیستروفی عضلانی^{۱۸}، کاشکسی^{۱۹} و سارکوپنیا^{۲۰} نقش دارد [۲۱]. گزارش شده است اتصالات جدید میان شبکه سارکوپلاسمیک و لوله‌های عرضی که در حین فعالیت ورزشی تشکیل شده‌اند که حاوی STIM1 و ORAI1 هستند، به عنوان واحدهای ورودی کلسیم عمل می‌کنند. این اتصالات، مسیری را برای بازیابی سریع یون‌های کلسیم از فضای خارج سلولی در طی فعالیت تکراری عضلات فراهم می‌کنند [۲۲]. همچنین نشان داده شده است که پروتئین MG29 در کنترل بلوغ و گسترش ساختار لوله‌های عرضی و حفظ سیگنال‌های داخل سلولی کلسیم در عضله اسکلتی شرکت دارد. تخریب ژنتیکی MG29 منجر به تشکیل ناقص شبکه لوله‌های عرضی در عضلات اسکلتی می‌شود. همچنین مشاهده شده است میزان پروتئین MG29 به طور قابل توجهی در مدل‌های حیوانی دارای دیستروفی عضلانی کاهش می‌یابد و بیان کاهش یافته MG29 و ساختار مختل شده لوله‌های عرضی در نمونه‌های انسانی مبتلا به دیستروفی عضلانی دیده شده است [۸].

16. Myofibers
17. Tubular aggregate myopathy
18. Muscular dystrophy
19. Cachexia
20. Sarcopenia

21. Ryanodine receptor 2

22. Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-adenosine triphosphatase-2a

حامی مالی

این پژوهش برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد سبحان نقی‌زاده در گروه علوم ورزشی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان است. این پژوهش هیچ‌گونه کمک مالی از سازمانی‌های دولتی، خصوصی و غیرانتفاعی دریافت نکرده است.

مشارکت نویسندگان

تمام نویسندگان در آماده‌سازی این مقاله مشارکت یکسان داشتند.

تعارض منافع

براساس نظر نویسندگان، هیچ‌گونه تعارض منافی در این مقاله وجود ندارد

بیان ژن RyR2 در دو گروه تمرین-ایسکمی و تمرین‌نشده می‌تواند انقباضات غیرطبیعی همراه با کاردیومیوپاتی ناشی از ایسکمی عضله قلبی را از بین ببرد و جریان کلسیم در عضله قلبی را تنظیم کند [۲۷]. علاوه بر این، گلودیا پکرای و همکاران در بررسی خود با عنوان تأثیر تمرین ورزشی به شکل تحریکات الکتریکی تکراری در موش‌های پیر مبتلا به بیماری مایوپاتی لوله‌های عرضی متراکم‌شده که منجر به انباشته شدن STIM1 و ORAI1 به شکل ناکارآمد می‌شود، نشان دادند تمرین ورزشی، تشکیل این بیماری را محدود می‌کند و عملکرد عضلانی را بهبود می‌بخشد [۲۸].

در بررسی تأثیر تمرین استقامتی بر پاسخ‌های مایوژنیک و جریان یونی ناشی از آتروفی عضلانی نشان داده شده است که افزایش احتمالی محرک‌های همودینامیک نقش مهمی در حفظ پاسخ مایوژنیک و جریان یون کلسیم از کانال‌های TRPC^۳ دارد. این امر، تأثیر مثبت تمرین استقامتی در بیماران با فلج اندام را توضیح می‌دهد، زیرا تمرین استقامتی کاهش پاسخ مایوژنیک و جریان‌های یون کلسیم ناشی از آتروفی را کمتر می‌کند [۲۹]. ادواردز و همکاران در بررسی تأثیر تمرین هوازی بر جریان ورودی کلسیم مرتبط با سندرم متابولیک و آترواسکلروز کرونری نشان داده شده است که این شیوه تمرینی با کاهش بیان ژن‌های TRPC1 و STIM1 یک تأثیر محافظتی بر جریان ورودی کلسیم دارد و منجر به کاهش جریان ورودی کلسیم مرتبط با سندرم متابولیک و آترواسکلروز کرونری می‌شود [۳۰].

نتیجه‌گیری

باتوجه به نتایج پژوهش پیش‌رو مشخص شد لیگاسیون عصب نخاعی منجر به کاهش بیان ژن‌های STIM1، ORAI1 و MG29 در عضله پلاتتاریس می‌شود و انجام یک دوره تمرین ترکیبی پیش‌از لیگاسیون عصب نخاعی یک اثر جبرانی در این رابطه دارد که احتمالاً یکی از سازوکارهای مرتبط با اثرات مفید تمرین ورزشی بر هموستاز کلسیم است. باین حال برای مشخص شدن سازوکارهای اصلی در این رابطه به پژوهش‌های بیشتری نیاز است. انجام تمرین ترکیبی از نقاط قوت پژوهش حاضر بود، زیرا این نوع تمرین می‌تواند پاسخ‌ها و سازگاری‌های متفاوتی نسبت به برنامه‌های تمرینی دیگر در پی داشته باشد. از محدودیت‌های پژوهش حاضر می‌توان به عدم ارزیابی ژن‌های مرتبط با آتروفی عضلانی اشاره کرد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

پژوهش حاضر دارای کد اخلاق به شماره IR. KMU. REC. 190. 1399 از دانشگاه علوم پزشکی کرمان است.

23. Transient Receptor Potential Canonical (TRPC)

References

- [1] Zhao X, Weisleder N, Thornton A, Oppong Y, Campbell R, Ma J, et al. Compromised store-operated Ca²⁺ entry in aged skeletal muscle. *Aging Cell*. 2008; 7(4): 561-8. [DOI: 10.1111/j.1474-9726.2008.00408.x] [PMID] [PMCID]
- [2] Edwards JN, Blackmore DG, Gilbert DF, Murphy RM, Launikonis BS. Store-operated calcium entry remains fully functional in aged mouse skeletal muscle despite a decline in STIM1 protein expression. *Aging Cell*. 2011; 10(4): 675-85. [DOI: 10.1111/j.1474-9726.2011.00706.x] [PMID]
- [3] Zhao X, Min CK, Ko JK, Parness J, Kim DH, Weisleder N, et al. Increased store-operated Ca²⁺ entry in skeletal muscle with reduced calsequestrin-1 expression. *Biophysical Journal*. 2010; 99(5): 1556-64. [DOI: 10.1016/j.bpj.2010.06.050] [PMID] [PMCID]
- [4] Rosenberg PB. Calcium entry in skeletal muscle. *The Journal of Physiology*. 2009; 587(Pt 13): 3149-51. [DOI: 10.1113/jphysiol.2009.172585] [PMID] [PMCID]
- [5] Lee KJ, Hyun C, Woo JS, Park CS, Kim DH, Lee EH. Stromal interaction molecule 1 (STIM1) regulates sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 1a (SERCA1a) in skeletal muscle. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*. 2014; 466(5): 987-1001. [DOI: 10.1007/s00424-013-1361-6] [PMID]
- [6] Nesin V, Wiley G, Kousi M, Ong EC, Lehmann T, Nicholl DJ, et al. Activating mutations in STIM1 and ORAI1 cause overlapping syndromes of tubular myopathy and congenital myosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014; 111(11): 4197-202. [DOI: 10.1073/pnas.1312520111] [PMID] [PMCID]
- [7] Shimuta M, Komazaki S, Nishi M, Iino M, Nakagawara K, Takeshima H. Structure and expression of mitsugumin29 gene. *FEBS Letters*. 1998; 431(2): 263-7. [DOI: 10.1016/S0014-5793(98)00770-4] [PMID]
- [8] Jin F, Choi K-H, Ko J-K, Park K-H, Cheng C, Yao X, et al. Mir181A Targets the 3'UTR of MG29, a Muscle-Specific Synaptophysin Family Gene, for Down-Regulation of MG29 Expression in Dystrophic Skeletal Muscle. *Biophysical Journal*. 2015; 108(2): 590a. [DOI: 10.1016/j.bpj.2014.11.3216]
- [9] Woo JS, Hwang JH, Huang M, Ahn MK, Cho CH, Ma J, et al. Interaction between mitsugumin 29 and TRPC3 participates in regulating Ca²⁺ transients in skeletal muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015; 464(1): 133-9. [DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.06.096] [PMID] [PMCID]
- [10] Gibala MJ, Little JP, van Essen M, Wilkin GP, Burgomaster KA, Safdar A, et al. Short-term sprint interval versus traditional endurance training: Similar initial adaptations in human skeletal muscle and exercise performance. *The Journal of Physiology*. 2006; 575(3): 901-11. [DOI: 10.1113/jphysiol.2006.112094] [PMID] [PMCID]
- [11] Gundersen K. Excitation-transcription coupling in skeletal muscle: The molecular pathways of exercise. *Biological Reviews of The Cambridge Philosophical Society*. 2011; 86(3): 564-600. [DOI: 10.1111/j.1469-185X.2010.00161.x] [PMID] [PMCID]
- [12] Chin ER. Intracellular Ca²⁺ signaling in skeletal muscle: decoding a complex message. *Exercise and Sport Sciences Reviews*. 2010; 38(2): 76-85. [DOI: 10.1097/JES.0b013e3181d495d2] [PMID]
- [13] Bueno Jr CR, Ferreira JCB, Pereira MG, Bacurau AV, Brum PC. Aerobic exercise training improves skeletal muscle function and Ca²⁺ handling-related protein expression in sympathetic hyperactivity-induced heart failure. *Journal of Applied Physiology*. 2010; 109(3): 702-9. [DOI: 10.1152/jappphysiol.00281.2010] [PMID]
- [14] Song W, Kwak HB, Lawler JM. Exercise training attenuates age-induced changes in apoptotic signaling in rat skeletal muscle. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2006; 8(3-4): 517-28. [DOI: 10.1089/ars.2006.8.517] [PMID]
- [15] Chae CH, Kim HT. Forced, moderate-intensity treadmill exercise suppresses apoptosis by increasing the level of NGF and stimulating phosphatidylinositol 3-kinase signaling in the hippocampus of induced aging rats. *Neurochemistry International*. 2009; 55(4): 208-13. [DOI: 10.1016/j.neuint.2009.02.024] [PMID]
- [16] Lee S, Farrar RP. Resistance training induces muscle-specific changes in muscle mass and function in rat. *Journal of Exercise Physiology online*. 2003; 6(2). [Link]
- [17] Ho Kim S, Mo Chung J. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain*. 1992; 50(3): 355-63. [DOI: 10.1016/0304-3959(92)90041-9] [PMID]
- [18] Hodges P, Holm AK, Hansson T, Holm S. Rapid atrophy of the lumbar multifidus follows experimental disc or nerve root injury. *Spine*. 2006; 31(25): 2926-33. [DOI: 10.1097/01.brs.0000248453.51165.0b] [PMID]
- [19] Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: A brief review. *Neurosurgical Focus*. 2004; 16(5): E1. [DOI: 10.3171/foc.2004.16.5.2] [PMID]
- [20] 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. [DOI: 10.1007/s13539-012-0074-6] [PMID] [PMCID]
- [21] Conte E, Imbrici P, Mantuano P, Coppola MA, Camerino GM, De Luca A, et al. Alteration of STIM1/Orai1-Mediated SOCE in Skeletal Muscle: Impact in genetic muscle diseases and beyond. *Cells*. 2021; 10(10): 2722. [DOI: 10.3390/cells10102722] [PMID] [PMCID]
- [22] Boncompagni S, Michelucci A, Pietrangelo L, Dirksen RT, Protasi F. Exercise-dependent formation of new junctions that promote STIM1-Orai1 assembly in skeletal muscle. *Scientific Reports*. 2017; 7(1): 14286. [DOI: 10.1038/s41598-017-14134-0] [PMID] [PMCID]
- [23] Zhang BT, Yeung SS, Cheung KK, Chai ZY, Yeung EW. Adaptive responses of TRPC1 and TRPC3 during skeletal muscle atrophy and regrowth. *Muscle & Nerve*. 2014; 49(5): 691-9. [DOI: 10.1002/mus.23952] [PMID]
- [24] Gemes G, Bangaru MLY, Wu HE, Tang Q, Weihrauch D, Koopmeiners AS, et al. Store-operated Ca²⁺ entry in sensory neurons: Functional role and the effect of painful nerve injury. *Journal of Neuroscience*. 2011; 31(10): 3536-49. [DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5053-10.2011] [PMID] [PMCID]
- [25] Izadi MR, Gaeini AA, Ravasi AA, Delfan M. [Effect of 4 weeks high intensity interval training on gene expression of Ryanodine receptor calcium channels (RyR2), SERCA2a and Phospholamban in diabetic rat's heart (Persian)]. *Journal of Sport Biosciences*. 2018; 10(1): 1-12. [Link]
- [26] Liu R, Fan W, Krüger K, Xiao Y, Pilat C, Seimetz M, et al. Exercise affects T-Cell function by modifying intracellular calcium homeostasis. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 2017; 49(1): 29-39. [DOI: 10.1249/MSS.0000000000001080] [PMID]
- [27] Sazvar A, Mehrialvar Y, Ghardashi AA, Nazari MH. [The effect of eight weeks of interval training on gene expression of ryanodine receptors/calcium channels and calcium pump in ischemic rats (Persian)]. *J Sabzevar Univ Med Sci*. 2018; 25(2): 89-98. [Link]

- [28] Pecorai C, Michelucci A, Pietrangelo L, Protasi F, Boncompagni S. Exercise prevents formation of tubular aggregates in ageing skeletal muscle fibers of wild-type mice. *Biophysical Journal*. 2018; 114(3): 470A. [DOI: [10.1016/j.bpj.2017.11.2588](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.11.2588)]
- [29] Yin MZ, Kim HJ, Suh EY, Zhang YH, Yoo HY, Kim SJ. Endurance exercise training restores atrophy-induced decreases of myogenic response and ionic currents in rat skeletal muscle artery. *Journal of Applied Physiology*. 2019; 126(6): 1713-24. [DOI: [10.1152/jappphysiol.00962.2018](https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00962.2018)] [PMID]
- [30] Edwards JM, Neeb ZP, Alloosh MA, Long X, Bratz IN, Peller CR, et al. Exercise training decreases store-operated Ca²⁺ entry associated with metabolic syndrome and coronary atherosclerosis. *Cardiovascular Research*. 2010; 85(3): 631-40. [DOI: [10.1093/cvr/cvp308](https://doi.org/10.1093/cvr/cvp308)] [PMID] [PMCID]