علوم زیستی ورزشی – پاییز ۱۳۹۹
دورهٔ ۱۲، شمارهٔ ۳، ص: ۲۹۰ –۲۷۷
تاریخ دریافت : ۱۸ / ۱۰ / ۹۸
تاریخ پذیرش : ۱۶ / ۱۲ / ۹۸

تأثیر آسیب عضلانی ناشی از فعالیت برون‌گرا در زمان‌های مختلف بر مقادیر میتسوگمین۵۳ و دیسفرلین در عضلهٔ نعلی موش‌های نر صحرایی

توحید همت زاده بدولی[۱] – مریم نورشاهی *[۲] – رعنا فیاض میلانی[۳] – سیاوش پرورده [۴]

۱. دانشجوی دکتری گروه علوم زیستی ورزش، دانشکدهٔ علوم ورزشی و تندرستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران ۲. دانشیار گروه علوم زیستی ورزش، دانشکدهٔ علوم ورزشی و تندرستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران ۳. استادیار گروه علوم زیستی ورزش، دانشکدهٔ علوم ورزشی و تندرستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران ۴. دانشیار گروه فارماکولوژی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

انقباض برون‌گرا حین فعالیت‌های ورزشی موجب آسیب عضلانی و سارکولما می‌شود. میتسوگمین۵۳ و دیسفرلین، عمده پروتئین‌های ترمیم سارکولما هستند. بنابراین هدف از تحقیق حاضر، بررسی اثر آسیب عضلانی ناشی از فعالیت برون‌گرا در زمان‌های مختلف بر میتسوگمین۵۳ و دیسفرلین در عضلهٔ اسکلتی است. ۵۰ سر موش نر صحرایی بعد از آشناسازی با محیط و نوار گردان به پنج گروه کنترل و پنج گروه فعالیت برون‌گرا تقسیم شدند. عضلهٔ نعلی حیوانات نیم، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۶۸ ساعت (یک هفته) بعد از انجام فعالیت برون‌گرا (۹۰ دقیقه دویدن تناوبی با سرعت ۱۶ متر در دقیقه و شیب ۱۶- درجه) در شرایط استریل‌شده خارج شد. برای اندازه‌گیری تعداد سلول‌های التهابی و استخراج پروتئین‌های میتسوگمین ۵۳ و دیسفرلین از روش‌های رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین و وسترن بلات استفاده شد. از آزمون تحلیل واریانس دوطرفه و تی-مستقل برای مقایسه میانگین‌ها با سطح معناداری $p\leq ۰/۰۵$ استفاده شد. تعداد سلول‌های التهابی، پروتئین‌های میتسوگمین۵۳ و دیسفرلین در زمان‌های نیم، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۶۸ ساعت (یک هفته) بعد از فعالیت برون‌گرا در گروه فعالیت برون‌گرا به‌طور معناداری بیشتر از گروه کنترل بود ($P<۰/۰۰۱$). افزایش سلول‌های التهابی آسیب عضلانی ناشی از فعالیت ورزشی را نشان می‌دهد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که افزایش سلول‌های التهابی، آسیب عضلانی ناشی از فعالیت ورزشی را نشان می‌دهد. آسیب سارکولما موجب فعال شدن مکانیسم‌های ترمیم غشا می‌شود. افزایش پروتئین‌های میتسوگمین۵۳ و دیسفرلین موجب افزایش ترمیم و ثبات سارکولما می‌شود که متعاقب آن آسیب عضلانی و سلول‌های التهابی کاهش می‌یابد.

واژه‌های کلیدی

EIMD، دیسفرلین، سلول‌های التهابی، فعالیت برون‌گرا، میتسوگمین۵۳.

* نویسندهٔ مسئول: تلفن: ۰۹۱۲۶۳۰۶۳۵۸ Email:nourshahi@sbu.ac.ir

مقدمه

هر برنامهٔ ورزشی شامل جلسات تمرینی با شدت فزاینده است که با جلسات کم‌حجم، کم‌شدت یا ریکاوری مجزا می‌شود (۱). هموستاز بدن در جلسات تمرین مختل می‌شود و متعاقباً ظرفیت‌های عملکردی از طریق بیش‌جبرانی بهبود می‌یابد (۲). بنابراین بخشی از تحقیقات فیزیولوژی ورزشی به چالش‌های یک جلسه فعالیت ورزشی اختصاص داده شده است (۳).

فعالیت ورزشی که برای اولین بار انجام شده باشد، انقباض برون‌گرا، با شدت بالا یا برای مدت طولانی انجام گیرد، می‌تواند فشار بیشینه‌ای را بر عضله وارد کند (۴) که این فشار می‌تواند به‌صورت مکانیکی، متابولیکی یا ترکیبی از این دو باشد (۵). فشار مکانیکی و متابولیکی به آسیب عضلانی (EIMD)[1]، کوفتگی عضلانی و کاهش قدرت عضلانی منجر می‌شود و سلول‌های ماهواره‌ای، سلول‌های عروقی، فیبروبلاست‌ها و سلول‌های التهابی (لکوسیت‌ها) را فعال می‌کند که متعاقباً ترمیم و بازسازی عضله اتفاق می‌افتد (۶). مطالعات نشان می‌دهد که آسیب عضلانی ناشی از انقباض برون‌گرا با افزایش التهاب همراه است و با افزایش لکوسیت‌ها و سایتوکاین‌ها مشخص می‌شود (۷-۹). همچنین، سارکولما و دستگاه انقباضی در اثر فشار مکانیکی انقباض‌های برون‌گرا تخریب می‌شود (۴). آسیب و ترمیم سارکولما حین انقباض‌های برون‌گرا رخ می‌دهد (۱۰).

فرایند ترمیم سارکولما نیازمند وزیکول‌های درون‌سلولی است (۱۱). این فرایند وزیکول‌ها را به شکل یک قطعهٔ غشایی و با روش وابسته به کلسیم به محل آسیب‌دیدهٔ غشا انتقال می‌دهد (۱۳، ۱۲). میتسوگمین۵۳[2](نام دیگر آن TRIM72 است) و دیسفرلین[3]نقش عمده‌ای در فرایند ترمیم سارکولما دارند (۱۴). میتسوگمین۵۳ در انتقال وزیکول‌ها نقش تسهیل‌کننده دارد (۱۵) و بعد از تخریب سارکولما به‌سرعت در محل آسیب‌دیده افزایش می‌یابد (۱۶). نقص ژنتیکی میتسوگمین۵۳ به میوپاتی[4]و عدم تجمع وزیکول‌ها در ناحیهٔ آسیب‌دیده منجر می‌شود. به محض آسیب غشا، جابه‌جایی میتسوگمسن۵۳ با روشی مستقل از کلسیم و توسط کلسترول و اکسیداسیون انجام می‌شود (۱۶). بعد از جابه‌جایی وزیکول و تشکیل قطعهٔ غشایی، ترکیب قطعهٔ غشایی با غشای پلاسما توسط دیسفرلین و وابسته به کلسیم انجام

1 . Exercise-Induced Muscle Damage
2 . Mitsogomin53 (MG53)
3 . Dysferlin

۴ . بیماری عضلانی

می‌گیرد (۱۷). دیسفرلین مشابه با سیناپتوتاگمین[1] بخش‌های حساس به کلسیم دارد و با روش وابسته به کلسیم می‌تواند به فسفولیپیدها متصل شود (۱۸). دیسفرلین نقش مهمی در ترمیم غشای عضله دارد (۱۹) و مستقیماً در ترکیب وزیکول به غشا درگیر می‌شود (۲۰).

فقدان دیسفرلین و میتسوگمین۵۳ ترمیم سارکولما را کاهش می‌دهد و به رها شدن سایتوکاین‌های پیش‌التهابی و افزایش تخریب عضلانی می‌انجامد (۲۰-۲۲). از طرف دیگر، اضافه کردن میتسوگمین۵۳ به عضلهٔ موش‌های دیستروفی‌شده، آسیب عضلانی ناشی از انقباض برون‌گرا را کاهش می‌دهد (۲۳). همچنین، جنا آلوش و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که ۸ هفته تمرین اینتروال استقامتی روی نوار گردان (۵ روز در هفته به مدت ۳۰ تا ۸۰ دقیقه) مقدار پروتئین‌های میتسوگمین۵۳ و دیسفرلین را تغییر نمی‌دهد (۲۴).

اگرچه بیشتر مطالعات انجام‌گرفته در زمینهٔ ترمیم عضلانی بعد از فعالیت ورزشی برون‌گرا شامل افزایش التهاب و فعال شدن سلول‌های ماهواره‌ای است، به‌نظر می‌رسد که ترمیم سارکولما که نقش مهمی در ترمیم عضلانی دارد، در مطالعات قبلی نادیده گرفته شده است. همچنین، با توجه به اینکه میتسوگمین۵۳ و دیسفرلین دو پروتئین مهم در ترمیم سارکولما هستند و بیشتر تحقیقات انجام‌گرفته در مورد این پروتئین‌ها جنبه پاتولوژیکی دارند، بنابراین هدف از این تحقیق بررسی تأثیر آسیب عضلانی ناشی از فعالیت برون‌گرا در زمان‌های مختلف بر مقادیر پروتئین‌های دیسفرلین و میتسوگمین۵۳ در عضلهٔ نعلی موش‌های صحرایی است.

روش تحقیق

آزمودنی‌ها

تعداد ۵۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار سه‌ماهه (با میانگین وزنی ۲۸۴/۱۴±۳۸/۰۱ گرم) که هیچ نوع تحقیقی روی آنها انجام نگرفته بود، از مرکز سرم‌سازی رازی خریداری شد. موش‌ها در دمای اتاق (۲۲ درجهٔ سانتی‌گراد)، با رطوبت ۶۰ درصد، چرخهٔ معکوس ۱۲ ساعت خواب و بیداری و با در دسترس بودن آب و غذا نگهداری و کنترل شدند. تحقیق حاضر با کد اخلاق IR.SSRC.1398.065 مورد تأیید کمیتهٔ سازمانی اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی پژوهشگاه تربیت بدنی است.

1 . Synaptotagmin

روش اجرا

حیوانات برای سازگار شدن با محیط آزمایشگاه، به مدت یک هفته در قفس‌های پلاستیکی با درپوش فلزی مشبک (۴ موش صحرایی در یک قفس) با دادن غذا و آب کافی در محیط آزمایشگاه قرار گرفتند. سپس برای آشناسازی با نوار گردان به مدت یک هفته روی نوار گردان با حداکثر سرعت ۱۰ متر در دقیقه و شیب صفر درجه دویدند. بعد از دو هفته آشناسازی با محیط و نوار گردان به‌طور تصادفی به ۱۰ گروه، ۵ گروه کنترل و ۵ گروه فعالیت برون‌گرا تقسیم شدند.

پروتکل فعالیت برون‌گرا

پروتکل فعالیت برون‌گرا شامل ۹۰ دقیقه دویدن اینتروال بر روی نوار گردان مخصوص جوندگان است. به این ترتیب که حیوانات ۱۸ ست ۵ دقیقه‌ای را با سرعت ۱۶ متر در دقیقه و با شیب ۱۶ درجه منفی دویدند و ۲ دقیقه استراحت غیرفعال بین ست‌ها داشتند (۲۵). همچنین ۵ دقیقه گرم کردن و ۵ دقیقه سرد کردن برای رعایت اصول تمرین در ابتدا و انتهای فعالیت برون‌گرا قرار داده شد.

تشریح حیوانات

حیوانات به‌ترتیب نیم ساعت، ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت، ۷۲ ساعت و یک هفته (۱۶۸ ساعت) بعد از انجام فعالیت برون‌گرا ابتدا از طریق تزریق صفاقی ترکیب کتامین ۱۰ درصد با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و زایلزین ۲ درصد با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بی‌هوش و تشریح شدند. عضلهٔ نعلی آنها در شرایط استریل‌شده خارج شد. عضلهٔ نعلی پای راست حیوان در ازت مایع فریز شد و سپس برای انجام مراحل بعدی به یخچال فریزر ۸۰- درجه منتقل شدند. عضلهٔ نعلی پای چپ حیوان برای رنگ‌آمیزی در فرمالین ۷ درصد قرار داده شد.

اندازه‌گیری سلول‌های التهابی

بعد از اینکه بافت‌ها به مدت حدود یک هفته در فرمالدهید ۷ درصد نگهداری شدند، برای انجام مراحل آب‌گیری (با الکل‌های صعودی)، شفاف‌سازی (با زایلول) و آغشتگی (با پارافین)، نمونه‌ها به‌ترتیب در فرمالین، الکل ۷۰ درصد، الکل ۸۰ درصد، الکل ۹۶ درصد، الکل مطلق، زایلول (دو بار) و پارافین ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد (دو بار)، در دستگاه پروسسور قرار داده شد. برای قالب‌گیری، نمونه‌ها در قالب قرار داده شده و پارافین روی آن ریخته شد. برش‌گیری عرضی با استفاده از دستگاه میکروتوم روتاری[1] با ضخامت

1 . Microtome Rotary

۵ میکرون انجام گرفت. بافت‌های برش داده‌شده به حالت شناور در آب گرم تیشوفلوت[1] با دمای ۵۲-۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شده و با کمک لام‌های ژلاتینه‌شده برداشته شدند. لام‌ها بعد از پارافین‌زدایی در رک‌های مخصوص رنگ‌آمیزی قرار داده شدند و مراحل رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین به این ترتیب انجام گرفت: ۵ دقیقه در گزیلل (۳ مرتبه)، ۵ دقیقه در الکل ۹۶٪ (۳ مرتبه)، شست‌وشو با آب جاری، ۸-۵ دقیقه در هماتوکسیلین، شست‌وشو با آب جاری، اسید الکل (یک مرتبه)، شست‌وشو با آب جاری، کربنات سدیم (۳ مرتبه)، شست‌وشو با آب جاری، ائوزین ۵۰-۴۰ ثانیه، شست‌وشو با آب جاری، ۵ دقیقه در الکل ۹۶٪ (۳ مرتبه)، ۵ دقیقه در الکل ۱۰۰٪ (۳ مرتبه)، ۵ دقیقه در گزیلل (۲ مرتبه). بعد از انجام مراحل قبلی لامل به لام چسبانده و برای عکس‌برداری آماده شدند. در انتها با استفاده از میکروسکوپ الکترونیک با رزولیشن ۵۰، عکس‌برداری شدند و تعداد سلول‌های التهابی (لکوسیت‌ها[2]) شمارش شدند (۲۶).

وسترن بلات

برای استخراج پروتئین‌ها، ۱۰۰ میلی‌گرم بافت عضلهٔ نعلی در ۵۰۰ میکرو لیتر بافر حاوی آنتی پروتئاز قرار داده شده و با هموژنایزر دستی هموژن شد. محلول نیم ساعت در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شده و سپس با دور ۱۲۰۰۰ و دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی جمع‌آوری شده و غلظت پروتئین اندازه‌گیری و در دمای ۲۰ درجه زیر صفر نگهداری شد. هموژن به‌دست‌آمده به نسبت ۱:۱ با بافر مخلوط شد، سپس نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه جوشانده شد تا تمام پروتئین‌ها کاملاً دناتوره شوند. ژل آکریل آمید ۱۰٪ تهیه شد. از هر نمونه به اندازهٔ ۱۰ میکرولیتر (تقریباً ۵۰ میکروگرم) در چاهک قرار داده شد و سپس با برقراری جریان الکتریکی ۱۰۰ ولت و ۳۵ میلی‌آمپر پروتئین‌ها در ژل به بالا حرکت کردند و با رسیدن رنگ برم فنل بلو به انتهای ژل جریان قطع و ژل از قالب خارج شد. بعد از خروج غشا از PBS به مدت ۳۰ ثانیه در داخل محلول سوبسترای آماده‌شده قرار گرفت و بعد از پوشانده شدن با ورقهٔ نازک نایلونی، فیلم رادیوگرافی در معرض نور لومینسانس ساطع‌شونده از غشا قرار داده شد. چگالی باندها با استفاده از نسخهٔ ۱/۶۲ بستهٔ نرم‌افزاری دانسیتومتری[3] تعیین شد.

1 . Tissue Floating Bath
2 . Leukocytes
3 . Imagej, National Institues of Health, Bethesda, Maryland, USA

بعد از نرمالیزه کردن باندها با بتا اکتین برای کمی کردن دانسیته‌ها نمودار بار پلات ترسیم شد. از آنتی‌بادی‌های میتسوگمین۵۳،[۱] دیسفرلین[۲] و بتا-اکتین[۳] استفاده شد (۲۷).

روش آماری

برای تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها از نرم‌افزار Spss نسخهٔ ۱۶ استفاده شد. ابتدا توزیع نرمال داده‌ها توسط آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. سپس از طریق آزمون تحلیل واریانس دوطرفه (آنوای دوطرفه) معنادار بودن تغییرات میانگین گروه‌ها در زمان‌های مختلف بررسی شد. همچنین از آزمون تعقیبی توکی برای بررسی اختلاف میانگین‌های گروه‌های کنترل و فعالیت برون‌گرا در زمان‌های مختلف استفاده شد. سطح معناداری در این تحقیق $P\leq0/05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

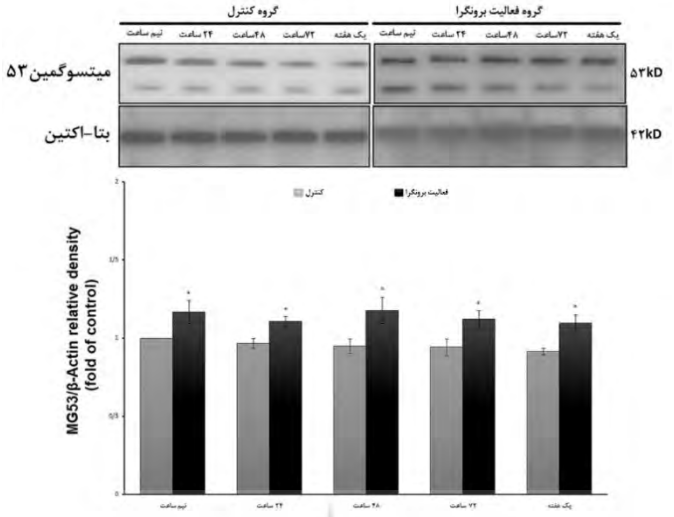
آزمون کولموگروف-اسمیرنوف نشان می‌دهد که تمامی داده‌های سلول‌های التهابی، میتسوگمین۵۳ و دیسفرلین توزیع نرمال دارند ($P >۰/۰۵$).

نتایج آزمون تحلیل واریانس دوطرفه نشان داد که پروتئین میتسوگمین۵۳ در زمان‌های مختلف بین گروه کنترل و گروه فعالیت برون‌گرا به‌طور معناداری متفاوت است ($P<۰/۰۰۱$، $F_{(۹و۴۹)}=۲۳/۷۷۴$) (شکل ۱). آزمون تعقیبی توکی در زمان‌های نیم، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۶۸ ساعت (یک هفته) بعد از فعالیت برون‌گرا نشان داد که پروتئین میتسوگمین۵۳ در گروه فعالیت برون‌گرا به‌طور معناداری بیشتر از گروه کنترل است ($P<۰/۰۰۱$).

نتایج آزمون تحلیل واریانس دوطرفه نشان داد که میانگین پروتئین دیسفرلین در زمان‌های مختلف بین گروه‌های کنترل و فعالیت برون‌گرا به‌طور معناداری متفاوت است ($P<۰/۰۰۱$، $F_{(۹و۴۹)}=۱۵۶/۴۴۵$) (شکل ۲). آزمون تعقیبی توکی در زمان‌های نیم، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۶۸ ساعت بعد از فعالیت برون‌گرا نیز نشان داد که این پروتئین در گروه فعالیت برون‌گرا به‌طور معناداری بیشتر از گروه کنترل است ($P<۰/۰۰۱$).

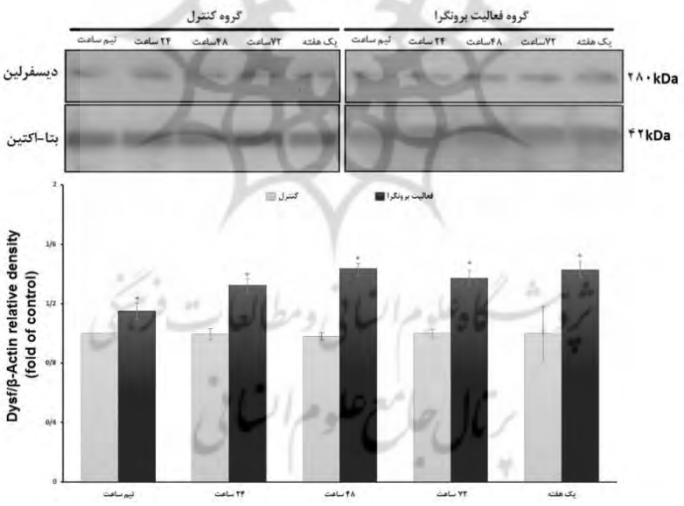
---

۱. شرکت SANTA CRUZ، کد sc-514706
۲. شرکت Abcam، کد ab124684
۳. شرکت SANTA CRUZ، sc-130657



شکل ۱. میتسوگمین ۵۳ در بافت عضلانی Soleus

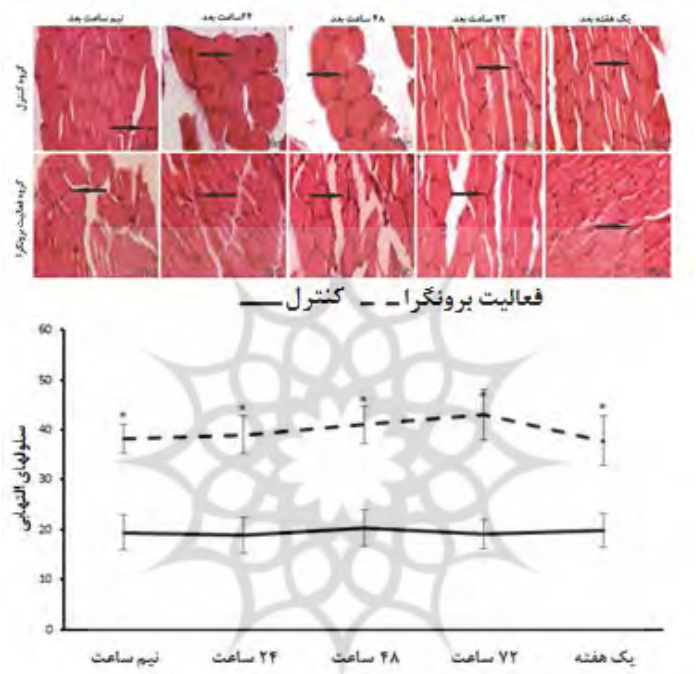
شکل بالا عکس باندهای وسترن پروتئین‌های میتسوگمین ۵۳ و بتا-اکتین است که در ۵ زمان مختلف بعد از فعالیت برون‌گرا اندازه‌گیری شده و وزن مولکولی پروتئین‌ها نیز در انتهای تصویر گزارش شده است. نمودار پایین مقدار کمی‌شدهٔ باندهای وسترن است. (※: علائم معناداری)



شکل ۲. دیسفرلین در بافت عضلانی Soleus

شکل بالا عکس باندهای وسترن پروتئین‌های دیسفرلین و بتا-اکتین است که در ۵ زمان مختلف بعد از فعالیت برون‌گرا اندازه‌گیری‌شده و وزن مولکولی پروتئین‌ها نیز در انتهای تصویر گزارش شده است. نمودار پایین مقدار کمی‌شدهٔ باندهای وسترن است. (※: علائم معناداری)

نتایج آزمون تحلیل واریانس دوطرفه نشان داد که تعداد سلول‌های التهابی (لکوسیت‌ها) در زمان‌های مختلف بین گروه کنترل و گروه فعالیت برون‌گرا به‌طور معناداری متفاوت است ($P<۰/۰۰۱$، $F_{(۹و۴۹)}=۴۳/۳۰۱$) (شکل ۳). آزمون تعقیبی توکی در زمان‌های نیم، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۶۸ ساعت (یک هفته) بعد از فعالیت برون‌گرا نشان داد که لکوسیت‌ها در گروه فعالیت برون‌گرا به‌طور معناداری بیشتر از گروه کنترل است ($P<۰/۰۰۱$).



شکل ۳. تعداد سلول‌های التهابی (لکوسیت‌ها) در بافت عضلانی Soleus
تصویر بالا عکس گرفته‌شده از نتایج رنگ‌آمیزی H&E است و نمودار پایین تعداد سلول‌های التهابی را نشان می‌دهد (فلش‌ها: لکوسیت‌ها را نشان می‌دهد *: علائم معناداری).

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که در زمان‌های نیم، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۶۸ ساعت بعد از فعالیت برون‌گرا در عضلهٔ نعلی مقدار پروتئین میتسوگمین۵۳ به‌ترتیب ۱۷، ۱۴، ۲۳، ۱۸ و ۱۸ درصد و پروتئین دیسفرلین نیز به‌ترتیب ۱۵، ۳۲، ۴۵، ۳۷ و ۲۴ درصد افزایش یافت. پروتئین‌های زیادی در فرایند ترمیم سارکولما درگیرند، ولی پروتئین‌های دیسفرلین و میتسوگمین۵۳ نقش مهمی در ترمیم سارکولما دارند (۲۸).

مطالعات ورزشی انجام‌گرفته بر روی این پروتئین‌ها محدود است. جنا آلوش و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که ۸ هفته تمرین اینتروال استقامتی مقدار پروتئین‌های میتسوگمین۵۳ و دیسفرلین را تغییر نمی‌دهد (۲۴). تحقیق حاضر مخالف تحقیق جنا آلوش و همکاران است. تحقیق آنها موجب سازگاری به تمرینات می‌شود، درحالی‌که در این تحقیق یک جلسه فعالیت برون‌گرا انجام گرفته است و این نوع فعالیت موجب آسیب عضلانی و سارکولما می‌شود. سازگاری عضله بعد از تمرینات ورزشی موجب کاهش آسیب عضلانی و التهاب می‌شود (۲۹). به‌نظر می‌رسد که پروتئین‌های میتسوگمین۵۳ و دیسفرلین در پاسخ به آسیب عضلانی ناشی از فعالیت ورزشی افزایش می‌یابند و زمانی‌که بدن به فعالیت ورزشی سازگار می‌شود، مقدار این پروتئین‌ها تغییر نمی‌کند. ترمیم غشای آسیب‌دیده برای سلول مهم است (۳۱، ۳۰)، بنابراین آسیب غشا، پروتئین‌های میتسوگمین۵۳ و دیسفرلین را فرا می‌خواند (۳۲) تا بی‌ثباتی غشا از بین برود (۲۸). به همین سبب، چندین مطالعه ثابت کرده‌اند که به‌دنبال آسیب سارکولما و به محض ریزش کلسیم خارج‌سلولی از قسمت آسیب‌دیده، فرایند ترمیم سارکولما فعال شده (۳۲، ۳۰) و انتقال وزیکول‌ها به سمت قسمت آسیب‌دیده آغاز می‌شود (۳۴-۳۶). تحقیق حاضر موافق این مطالعات است، زیرا افزایش مهم‌ترین پروتئین‌های ترمیم سارکولما یعنی میتسوگمین۵۳ و دیسفرلین، بعد از فعالیت آسیب‌زا فرایندهای ترمیم سارکولما را افزایش می‌دهند تا ثبات سارکولما افزایش و آسیب آن کاهش یابد.

بیشتر مطالعات انجام‌گرفته بر روی ترمیم سارکولما جنبهٔ پاتولوژیک دارند. ویسلدر و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که تزریق میتسوگمین۵۳ به عضلهٔ موش‌های دیستروفی‌شده، آسیب عضلانی ناشی از انقباض برون‌گرا را کاهش می‌دهد (۲۳). بیوندی و همکاران (۲۰۱۳) نیز نشان دادند تارهای عضلانی که پروتئین دیسفرلین کمتری داشتند، در پاسخ به انقباض‌های برون‌گرا بیشتر آسیب می‌بینند (۳۷). تحقیق حاضر موافق نتایج تحقیق ویسلدر و همکاران (۲۰۱۲) و مخالف نتیج تحقیق بیوندی و همکاران (۲۰۱۳) است، زیرا افزایش پروتئین‌های میتسوگمین۵۳ و دیسفرلین یک مکانیسم جبرانی است تا شرایط ثبات سلول برقرار شود و آسیب ناشی از فعالیت کاهش یابد. حداکثر افزایش پروتئین‌های میتسوگمین ۵۳ و دیسفرلین، ۴۸ ساعت بعد از فعالیت است و سپس کاهش می‌یابند، ولی یک هفته (۱۶۸ ساعت) بعد از فعالیت مقادیر این پروتئین‌ها در گروه فعالیت برون‌گرا بیشتر از گروه کنترل است. این تغییرات نشان می‌دهد که ۴۸ ساعت بعد از فعالیت برون‌گرا اوج افزایش فرایند ترمیم سارکولماست و به‌نظر می‌رسد که بعد از این زمان سارکولما به ثبات نسبی برسد.

هان و همکاران (۲۰۱۱) در مقاله‌ای مروری نشان دادند که یکپارچگی غشا برای جلوگیری از تراوش مولکول‌های درون‌سلولی و متعاقب آن پاسخ سیستم ایمنی مهم است و بین ترمیم سارکولما و التهاب ارتباط وجود دارد، به این شکل که معیوب بودن ترمیم سارکولما موجب افزایش التهاب می‌شود (۲۰). بنابراین افزایش پروتئین‌های ترمیم سارکولما بعد از فعالیت برون‌گرا می‌تواند مقاومت در برابر آسیب عضلانی و التهاب را افزایش می‌دهد.

همچنین، نتایج حاضر نشان داد که سلول‌های التهابی (لکوسیت‌ها) نیم ساعت بعد از فعالیت ورزشی ۹۷ درصد افزایش یافت، ۷۲ ساعت بعد به بیشترین مقدار خود رسید (۱۲۶ درصد) و سپس یک هفته بعد ۳۵ درصد کاهش یافت، ولی همچنان بیشتر از گروه کنترل بود. تجمع لکوسیت‌ها در عضلهٔ اسکلتی بعد از فعالیت ورزشی، آسیب عضلانی ناشی از فعالیت ورزشی را نشان می‌دهد (۳۸). جاناتان پیک و همکاران (۲۰۱۶) در مقاله‌ای مروری نشان دادند که تجمع لکوسیت‌ها بعد از فعالیت با شدت بالا، مدت زیاد و ناسازگار، همچنین، دویدن در سراشیبی و فوق‌استقامتی مشاهده می‌شود (۳۸). پالسن و همکاران (۲۰۱۲) نیز در مقاله‌ای مروری نشان دادند که آسیب عضلانی موجب افزایش لکوسیت‌ها می‌شود و میزان این افزایش با آسیب عضلانی ناشی از فعالیت ورزشی ارتباط مستقیم دارد (۳۹). آلبنا و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که فعالیت ورزشی وامانده‌ساز لکوسیت‌ها را تا ۲۴ ساعت بعد از فعالیت افزایش می‌دهد، به‌طوری‌که ۱۲ ساعت بعد از فعالیت اوج افزایش لکوسیت‌ها بود (۴۰). تحقیقات انجام‌گرفته در مورد سلول‌های التهابی زیاد است، به‌ویژه مقالات مروری جاناتان پیک (۲۰۱۶) و پالسان (۲۰۱۲) نشان می‌دهند که افزایش لکوسیت‌ها آسیب عضلانی ناشی از فعالیت ورزشی را نشان می‌دهد. تحقیق حاضر نیز موافق این مطالعات است و افزایش لکوسیت‌ها نشان می‌دهد که فعالیت برون‌گرا در این تحقیق موجب آسیب عضلانی شده است. زمان اوج افزایش در تحقیق آلبنا و همکاران (۲۰۱۴) زودتر از تحقیق حاضر بود. یکی از دلایل نوع فعالیت ورزشی است. اگرچه فعالیت آنها فعالیت وامانده‌ساز است، به‌دلیل اینکه در این تحقیق از فعالیت برون‌گرا استفاده شده، آسیب عضلانی بیشتر بوده و اوج افزایش لکوسیت‌ها نیز دیرتر اتفاق افتاده است. نوتروفیل‌ها، ائوزینوفیل‌ها، بازوفیل‌ها، لنفوسیت‌ها، منوسیت‌ها و گاهی پلاسموسل‌ها از انواع لکوسیت‌ها هستند. افزایش لکوسیت‌ها بعد از آسیب عضلانی به این شکل است که نوتروفیل‌ها تا ۲۴ ساعت بعد از فعالیت برون‌گرا و منوسیت‌ها و ماکروفاژها ۴۸ ساعت تا یک هفته بعد از فعالیت افزایش می‌یابند (۲۹). پاسخ‌های التهابی به آسیب عضلانی، ابتدا ماکروفاژها را افزایش می‌دهد. ماکروفاژها نوعی نوتروفیل هستند که هم به تخریب و هم بازسازی عضله کمک می‌کنند (۴۱). کانزو و همکاران بعد از ۹۰

دقیقه فعالیت اینتروال برون‌گرا (مشابه این تحقیق) نشان دادند که ماکروفاژها تا دو هفته بعد از فعالیت برون‌گرا در محل آسیب‌دیده وجود دارند؛ به این شکل که بعد از آسیب عضلانی ماکروفاژهای M1 در مراحل اولیهٔ آسیب (۱ تا ۳ روز بعد از فعالیت) در محل آسیب‌دیده تجمع می‌یابند و قسمت‌های آسیب‌دیده را پاکسازی می‌کنند و در مراحل بعدی آسیب، ماکروفاژهای M2 افزایش می‌یابند و با آزادسازی فاکتورهای رشد و سایتوکاین‌های ضدالتهابی ترمیم و بازسازی بافت را تسهیل می‌کنند (۴۲). تحقیق حاضر نیز موافق تحقیق کانزو و همکاران است و به‌نظر می‌رسد که افزایش لکوسیت‌ها در روزهای نخست، آسیب عضلانی، و در روزهای بعدی، ترمیم و بازسازی عضلانی را نیز نشان می‌دهد.

نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که پروتئین‌های ترمیم سارکولما و لکوسیت‌ها بعد از فعالیت برون‌گرا افزایش می‌یابد. افزایش لکوسیت‌ها آسیب عضلانی را نشان می‌دهد. آسیب و ترمیم سارکولما حین و بعد از فعالیت برون‌گرا اتفاق می‌افتد. افزایش پروتئین‌های میتسوگمین۵۳ و دیسفرلین بعد از فعالیت‌های آسیب‌زا مهم است و موجب افزایش ترمیم و ثبات سارکولما می‌شود. زمانی‌که آسیب عضلانی بیشتر شود، پاسخ‌های التهابی نیز افزایش می‌یابد. به‌نظر می‌رسد که افزایش ترمیم سارکولما ثبات سلول را افزایش و التهاب را کاهش می‌دهد. به‌طوری‌که اوج افزایش لکوسیت‌ها بعد از اوج افزایش پروتئین‌های ترمیم سارکولماست. بنابراین، بعد از افزایش ثبات سارکولما، التهاب عضلانی کاهش می‌یابد. تحقیقات انجام‌گرفته در این زمینه کم بوده و یکی از محدودیت‌های تحقیق است. انجام تحقیقات جدید در این زمینه می‌تواند علت تغییر مقادیر پروتئین‌های ترمیم سارکولما بعد از انواع فعالیت‌های ورزشی، به‌ویژه فعالیت‌های آسیب‌زا، را بهتر نشان داد.

منابع و مآخذ

1. Murray A, Cardinale M. Cold applications for recovery in adolescent athletes: a systematic review and meta analysis. Extreme physiology & medicine. 2015;4(1):17.
2. Mujika I. The influence of training characteristics and tapering on the adaptation in highly trained individuals: a review. International journal of sports medicine. 1998;19(07):439-46.
3. Luttrell MJ, Halliwill JR. Recovery from exercise: vulnerable state, window of opportunity, or crystal ball? Frontiers in physiology. 2015;6:204.
4. White GE, Wells GD. Cold-water immersion and other forms of cryotherapy: physiological changes potentially affecting recovery from high-intensity exercise. Extreme physiology & medicine. 2013;2(1):26.
5. Leeder J, Gissane C, van Someren K, Gregson W, Howatson G. Cold water immersion and recovery from strenuous exercise: a meta-analysis. Br J Sports Med. 2012;46(4):233-40.

6. Hyldahl RD, Hubal MJ. Lengthening our perspective: morphological, cellular, and molecular responses to eccentric exercise. Muscle & nerve. 2014;49(2):155-70.
7. Evans W, Meredith C, Cannon JG, Dinarello C, Frontera W, Hughes V, et al. Metabolic changes following eccentric exercise in trained and untrained men. Journal of Applied Physiology. 1986;61(5):1864-8.
8. Fielding RA, Meredith CN, O'Reilly KP, Frontera WR, Cannon JG, Evans WJ. Enhanced protein breakdown after eccentric exercise in young and older men. Journal of applied Physiology. 1991;71(2):674-9.
9. Peake J, Nosaka KK, Suzuki K. Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans. 2005.
10. Banfi G, Colombini A, Lombardi G, Lubkowska A. Metabolic markers in sports medicine. Advances in clinical chemistry. 2012;56:2.
11. McNeil PL, Miyake K, Vogel SS. The endomembrane requirement for cell surface repair. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2003;100(8):4592-7.
12. Bi G-Q, Alderton JM, Steinhardt RA. Calcium-regulated exocytosis is required for cell membrane resealing. The Journal of cell biology. 1995;131(6):1747-58.
13. Steinhardt RA, Bi G, Alderton JM. Cell membrane resealing by a vesicular mechanism similar to neurotransmitter release. Science. 1994;263(5145):390-3.
14. Rawat R, Cohen TV, Ampong B, Francia D, Henriques-Pons A, Hoffman EP, et al. Inflammasome up-regulation and activation in dysferlin-deficient skeletal muscle. The American journal of pathology. 2010;176(6):2891-900.
15. Wang X, Xie W, Zhang Y, Lin P, Han L, Han P, et al. Cardioprotection of ischemia/reperfusion injury by cholesterol-dependent MG53-mediated membrane repair. Circulation research. 2010;107(1):76-83.
16. Cai C, Masumiya H, Weisleder N, Matsuda N, Nishi M, Hwang M, et al. MG53 nucleates assembly of cell membrane repair machinery. Nature cell biology. 2009;11(1):56.
17. Südhof TC, Rizo J. Synaptotagmins: C2-domain proteins that regulate membrane traffic. Neuron. 1996;17(3):379-88.
18. Therrien C, Di Fulvio S, Pickles S, Sinnreich M. Characterization of lipid binding specificities of dysferlin C2 domains reveals novel interactions with phosphoinositides. Biochemistry. 2009;48(11):2377-84.
19. Lapointe BM FJ, Cote CH. Lengthening contraction-induced inflam-mation is linked to secondary damage but devoid of neutrophil invasion. J Appl Physiological research. 2002;92:1995-2004.
20. Han R. Muscle membrane repair and inflammatory attack in dysferlinopathy. Skeletal muscle. 2011;1(1):10.
21. Defour A, Medikayala S, Van der Meulen JH, Hogarth MW, Holdreith N, Malatras A, et al. Annexin A2 links poor myofiber repair with inflammation and adipogenic replacement of the injured muscle. Human molecular genetics. 2017;26(11):1979-91.
22. Cao C-M, Zhang Y, Weisleder N, Ferrante C, Wang X, Lv F, et al. MG53 constitutes a primary determinant of cardiac ischemic preconditioning. Circulation. 2010;121(23):2565.

23. Weisleder N, Takizawa N, Lin P, Wang X, Cao C, Zhang Y, et al. Recombinant MG53 protein modulates therapeutic cell membrane repair in treatment of muscular dystrophy. Science translational medicine. 2012;4(139):139ra85-ra85.
24. Alloush J, Roof SR, Beck EX, Ziolo MT, Weisleder N. Expression levels of sarcolemmal membrane repair proteins following prolonged exercise training in mice. Indian journal of biochemistry & biophysics. 2013;50(5):428.
25. Tsumiyama W, Oki S, Takamiya N, Umei N, Shimizu ME, Ono T, et al. Aerobic interval exercise with an eccentric contraction induces muscular hypertrophy and augmentation of muscular strength in rats. Journal of physical therapy science. 2015;27(4):1083-6.
26. Wang C, Yue F, Kuang S. Muscle histology characterization using H&E staining and muscle fiber type classification using immunofluorescence staining. Bio-protocol. 2017;7(10).
27. Gushchina LV, Bhattacharya S, McElhanon KE, Choi JH, Manring H, Beck EX, et al. Treatment with recombinant human MG53 protein increases membrane integrity in a mouse model of limb girdle muscular dystrophy 2B. Molecular Therapy. 2017;25(10):2360-71.
28. McElhanon KE, Bhattacharya S. Altered membrane integrity in the progression of muscle diseases. Life sciences. 2018;192:166-72.
29. Peake JM, Neubauer O, Della Gatta PA, Nosaka K. Muscle damage and inflammation during recovery from exercise. Journal of applied physiology. 2016;122(3):559-70.
30. Cooper ST, McNeil PL. Membrane repair: mechanisms and pathophysiology. Physiological reviews. 2015;95(4):1205-40.
31. Blazek AD, Paleo BJ, Weisleder N. Plasma membrane repair: a central process for maintaining cellular homeostasis. Physiology. 2015;30(6):438-48.
32. Zhou L, Middel V, Reischl M, Strähle U, Nienhaus GU. Distinct amino acid motifs carrying multiple positive charges regulate membrane targeting of dysferlin and MG53. PloS one. 2018;13(8):e0202052.
33. Mellgren RL, Miyake K, Kramerova I, Spencer MJ, Bourg N, Bartoli M, et al. Calcium-dependent plasma membrane repair requires m-or μ-calpain, but not calpain-3, the proteasome, or caspases. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. 2009;1793(12):1886-93.
34. Lin P, Zhu H, Cai C, Wang X, Cao C, Xiao R, et al. Nonmuscle myosin IIA facilitates vesicle trafficking for MG53-mediated cell membrane repair. The FASEB Journal. 2012;26(5):1875-83.
35. Weisleder N, Takeshima H, Ma J. Mitsugumin 53 (MG53) facilitates vesicle trafficking in striated muscle to contribute to cell membrane repair. Communicative & integrative biology. 2009;2(3):225-6.
36. Weisleder N, Lin P, Zhao X, Orange M, Zhu H, Ma J. Visualization of MG53-mediated cell membrane repair using in vivo and in vitro systems. JoVE (Journal of Visualized Experiments). 2011(52):e2717.
37. Biondi O, Villemeur M, Marchand A, Chretien F, Bourg N, Gherardi RK, et al. Dual effects of exercise in dysferlinopathy. The American journal of pathology. 2013;182(6):2298-309.

38. Peake JM, Neubauer O, Della Gatta PA, Nosaka K. Muscle damage and inflammation during recovery from exercise. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2016.
39. Paulsen G, Ramer Mikkelsen U, Raastad T, Peake JM. Leucocytes, cytokines and satellite cells: what role do they play in muscle damage and regeneration following eccentric exercise? Exercise immunology review. 2012;18.
40. Nunes-Silva A, Bernardes PT, Rezende BM, Lopes F, Gomes EC, Marques PE, et al. Treadmill exercise induces neutrophil recruitment into muscle tissue in a reactive oxygen species-dependent manner. An intravital microscopy study. PLoS One. 2014;9(5).
41. Pizza F. Peterson JM, Baas JH, Koh TJ. Neutrophils contribute to muscle injury and impair its resolution after lengthening contractions in mice J Physiol. 2005;562:899-913.
42. Qun Zuo S-CW, Xin-Kai Yu, Wei-Wei Chao. Response of macrophages in rat skeletal muscle after eccentric exercise. Chinese Journal of Traumatology. 2018:1-8.

پژوهشگاه علوم انسانی و مطالعات فرهنگی
پرتال جامع علوم انسانی

The effect of eccentric exercise induced muscle damage at different times on Mitsogomin53 and Dysferlin levels in rat Soleus muscle

Tohid Hemmatzade Beddovli[1] - Maryam Nourshahi*[2]- Rana fayaz milani[3] - Siavash parvardeh[4]

1. PHD student, Department of Biological Sciences in Sport and Health, Faculty of Sports Sciences and Health, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran 2. Associated professor, Department of Biological Sciences in Sport and Health, Faculty of Sports Sciences and Health, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran 3. Assistant Professor, Department of Biological Sciences in Sport and Health, Faculty of Sports Sciences and Health, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran 4. Associated professor, Department of Pharmacology, Faculty of medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences,Tehran,Iran

(Received:2020/01/08; Accepted: 2020/03/06)

Abstract

Eccentric contraction during exercise causes muscle and sarcolemma damage. Mitsogomin53 and Dysferlin are the major sarcolemma repair proteins. Therefore, the aim of the present study was to investigate the effect of eccentric exercise-induced muscle damage at different times on skeletal muscle Mitsogomin53 and Dysferlin. Fifty male Wistar rats, after familiarization with the environment and the treadmill were divided into five control groups and five eccentric exercise groups. Soleus muscle in sterile conditions disassociate half, 24, 48, 72 and 168 hours (one week) after eccentric exercise (90 min interval running with 16 meter/min and -16 degree slope). Hematoxylin-eosin and western blotting methods were used to measure the number of inflammatory cells and extract the proteins of Mitsogomin53 and Dysferlin. Two-way ANOVA and independent t-test were used to compare the means with the significance level of $p \leq 0.05$. The number of inflammatory cells, Mitsogomin53 and Dysferlin proteins at the half, 24, 48, 72 and 168 hours (one week) after eccentric exercise in the exercise group were significantly higher than the control group ($p<0.001$). The results of the present study showed that increased inflammatory cells show exercise-induce muscle and sarcolemma damage. Sarcolemma damaging activates the mechanisms of membrane repair. Increasing the levels of Mitsogomin 53 and Dysferlin increases the repair and stability of sarcolemma and subsequently reduces muscle damage and inflammatory cells.

Keywords:

EIMD, Dysferlin, inflammatory cells, eccentric exercise, Mitsogomin53.

* Corresponding author; E-mail: m-nourshahi@sbu.ac.ir ; Tell: +989126306358