Journal of
Arak University of Medical Sciences

April & May 2020. Vol 23. Issue 1

Research Paper

Effect of a 6-Week Resistance Training Program on Transforming Growth Factor Beta-1 and Myostatin Genes Expression in Tendons of Extensor Digitorum Longus and Soleus Muscles in Rats

Ghasem Mohammadnezhad[1], *Hassan Matin Homayi[1], Farshad Ghazalian[2]

1. Department of Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Science, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Department of Physiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation: Mohammadnezhad Gh, Matin Homayi H, Ghazalian F. [Effect of a 6-Week Resistance Training Program on Transforming Growth Factor Beta-1 and Myostatin Genes Expression in Tendons of Extensor Digitorum Longus and Soleus Muscles in Rats (Persian)]. Journal of Arak University of Medical Sciences (JAMS). 2020; 23(1):82-91. https://doi.org/10.32598/JAMS.23.1.5849.1

https://doi.org/10.32598/JAMS.23.1.5849.1

CC BY NC

Article Info:
Received: 15 Dec 2019
Accepted: 21 Jan 2020
Available Online: 01 Apr 2020

Key words:
Resistance training, Tendon, TGF-β1, Myostatin.

ABSTRACT

Background and Aim Tendon is the extracellular matrix of the muscle that mechanically and structurally adapts to the mechanical load. However, the cellular and molecular mechanisms of this adaptation are not known yet. The purpose of this study was to investigate the effect of 6 weeks of resistance training on expression of two Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF-β1) and myostatin genes in the tendon of fast- and slow-twitch muscles including Extensor Digitorum Longus (EDL) and Soleus (SOL).

Methods & Materials Twelve male Wistar rats with 8 weeks of age were randomly divided into two groups of exercise (n=6) and control (n=6). The exercise group performed resistance training (Carrying weights with 40-160% body weight on the ladder) for 6 weeks, 5 sessions per week. Forty-eight hours after the last training session, all rats were sacrificed and the tendons of SOL and EDL muscles were extracted. The mRNA expression level of TGF-β1 and myostatin genes was assayed using real time polymerase chain reaction. Independent t-test was used for statistical analysis.

Ethical Considerations All experiments on animals were according to the ethical guidelines of Research Ethics Committee of Islamic Azad University, Central Tehran Branch (Ethical Code: IR.IAU.PS.REC.1398.296)

Results The expression of TGF-β1 gene in EDL (P≤0.001) and SOL (P≤0.01) muscle tendons significantly increased, while the expression of myostatin gene in EDL (P≤0.001) and SOL (P≤0.05) tendons were significantly reduced.

Conclusion Resistance training appears to up-regulate the basal levels of TGF-β1 gene and down-regulate the basal levels of myostatin gene in tendons of fast- and slow-twitch muscles, where these effects are significantly more pronounced in the tendon of fast-twitch muscle.

Extended Abstract

Introduction

Tendon is the Extracellular Matrix (ECM) of muscle that mechanically and structurally adapts to the mechanical load [2]. While the mechanical and morphological changes in response to resistance training in tendons are well documented, less is known about the basic cellular and molecular mechanisms that regulate these responses. It seems that the messaging pathway of the Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF-β1) plays a key role in adaptation of the tendon muscle to resistance training. Myostatin is a member of the

* *Corresponding Author:*
Hassan Matin Homayi, PhD.
Address: Department of Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Science, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
Tel: +98 (912) 3680810
E-mail: hasanmatinhomaee@gmail.com

TGF-β family, the expression of which negatively regulates skeletal muscle growth [5]. Both TGF-β1 and myostatin stimulate tendon fibroblast proliferation and type I collagen synthesis [4، 6]. Based on laboratory studies on adult tendon fibroblasts and collagen synthesis studies in adult subjects in response to resistance training, it is thought that TGF-β1 and myostatin play an important role in the growth and adaptation of adult tendons to resistance training **[11]**. The aim of this study was to investigate the effect of 6 weeks of resistance training on the expression of TGF-β1 and myostatin genes in Tendons Of Soleus (SOL) and Extensor Digitorum Longus (EDL) muscles of Vistar male rats.

Materials and Methods

In this study, 12 adult male Wistar rats with 8 weeks of age were randomly divided into two groups: exercise (n=6) and control (n=6). The exercise group performed resistance training for 6 weeks (Table 1). Forty-eight hours after the last training session, all ranks were sacrificed. Then, the tendons of SOL and EDL muscles of their right foot were immediately and carefully extracted and stored at -80° C for subsequent measurements. Expression levels of TGF-β1 and myostatin mRNAs were assayed using RealTime-PCR. Independent t-test was used for statistical analysis.

Results

The results showed a significant difference between the mRNA values of TGF-β1 and myostatin genes in EDL and SOL tendons of exercise group compared to the control group. MRNA expression of TGF-β1 gene in EDL (0.48±0.14 in exercise group vs. 0.14±0.04 in control group, P<0.001) and SOL (0.32±0.08 in exercise group vs. 0.17±0.14 in control group, P<0.01) muscles increased significantly, while the myostatin gene expression level in EDL (0.27±0.1 in exercise group vs. 0.56±0.07 in control group, P<0.001) and SOL (0.21±0.07 in exercise group vs. 0.29±0.05 in control group, P<0.05) muscles decreased significantly (Figures 1 and 2).

Discussion

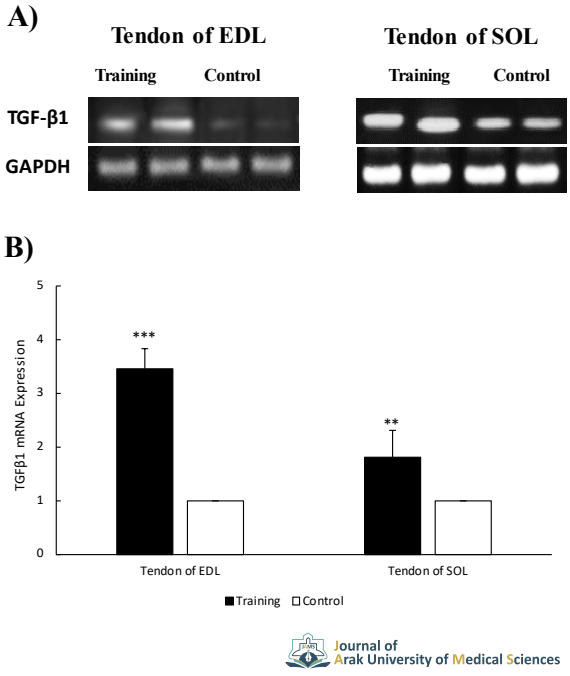
The results of the present study showed that after 6 weeks of resistance training program, the mRNA expression of TGF-β1 gene in both EDL and SOL muscles increased significantly. On the other hand, it significantly reduced mRNA expression of myostatin gene in both muscles. Heinemeier et al. (2007) reported an increase in mRNA levels of the TGF-β1 gene and type I and III collagens in tendon and skeletal muscle following isometric, concentric and eccentric contractions by stimulating the sciatic nerve for 4 days [14]. Evidence suggests that TGF-β1 has been a major mediator in the induction of collagen synthesis in fibroblasts by mechanical load [14], and a similar role has been suggested for this gen in tendons [15]. A 245% increase in TGF-β1 mRNA expression in the EDL muscle tendon compared to an 81% increase in the SOL muscle tendon reported in the present study is likely to indicate a higher involvement of fast-twitch muscles in resistance training which leads to greater adaptations in collagen tissue and higher tolerance of the force exerted by the fast-twitch muscle to the tendon.

There is ample evidence that the regulation of myostatin is a characteristic of the type of muscle fibers, and is strongly associated with the myosin heavy chain IIb isoform [18] and the high concentration of myostatin protein in the contractile muscle. Has been [19], and high concentrations of myostatin protein have been observed in the fast-twitch muscle compared to the slow-twitch muscles [19]. These reports could justify the results of the present study regarding a 53% reduction in myostatin mRNA expression in the EDL muscle compared to a slight 28% reduction in its expression in the SOL muscle.

In overall, resistance training appears to positively regulate the baseline mRNA levels of TGF-β1 gene and negatively regulate the baseline mRNA levels of myostatin gene in fast- and slow-twitch muscles; where its effect was significantly higher on the fast-twitch muscle than the slow-twitch muscle.

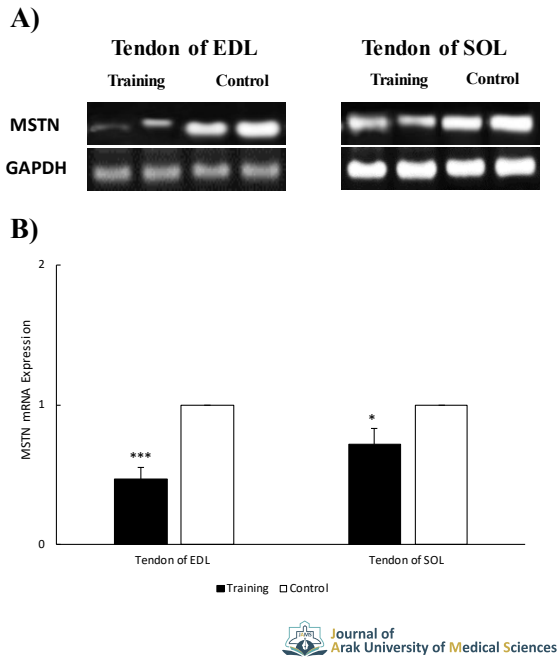
Table 1. The resistance training protocol

Week	1	2	3	4	5	6
Load (body weight percentage)	40-50	60-70	80-90	100-110	130-140	150-160
Sets	5	5	5	6	6	6
Repetitions	8	8	8	8	8	8



Journal of
Arak University of Medical Sciences

Figure 1. a. RNA agarose gel electrophoresis and b. mRNA expression level of TGF-β1 gene in the EDL and SOL muscles of rats in exercise and control groups. **P<0.01; ***P<0.001.



Journal of
Arak University of Medical Sciences

Figure 2. a. RNA agarose gel electrophoresis; and b. mRNA expression level of myostatin gene in the EDL and SOL muscles of rats in exercise and control groups. **P<0.01; ***P<0.001.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

All experiments on animals were according to the ethical guidelines of Research Ethics Committee of Islamic Azad University, Central Tehran Branch (Ethical code: IR.IAU.PS.REC.1398.296)

Funding

The present paper was extracted from the PhD thesis of the first author, Ghasem Mohammadnezhad, Department of Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Science, Central Tehran Branch, Islamic Azad University.

Authors' contributions

Conceptualization: All authors; Methodology and Data Analysis: Ghasem Mohammadnejhad; Editing and Review: all authors.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Department of Physiology and Pharmacology of the Pasteur Institute of Iran, as well as the head of the Laboratory Animal Housing of Tarbiat Modares University for their cooperation in conducting this study.

اثر ۶ هفته تمرین مقاومتی بر بیان ژن‌های TGF-β1 و میوستاتین در تاندون عضلات EDL و سولئوس موش‌های نر ویستار

قاسم محمدنژاد[۱]، *حسن متین همائی[۲]، فرشاد غزالیان[۱]

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. گروه فیزیولوژی، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

اطلاعات مقاله:
تاریخ دریافت: ۲۴ آذر ۱۳۹۸
تاریخ پذیرش: ۰۱ بهمن ۱۳۹۸
تاریخ انتشار: ۱۳ فروردین ۱۳۹۹

کلیدواژه‌ها:
تمرین مقاومتی، تاندون، TGF-β1؛ میوستاتین

چکیده

زمینه و هدف تاندون امتداد ماتریکس خارج سلولی عضله است که به صورت مکانیکی و ساختاری با بار مکانیکی سازگاری می‌یابد. سازوکارهای سلولی و مولکولی مربوط به این سازگاری به طور کامل شناخته نشده است؛ ازاین‌رو هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر ۶ هفته تمرین مقاومتی بر بیان ژن‌های TGF-β1 و میوستاتین در تاندون عضلات تند و کند انقباض بود.

مواد و روش‌ها بدین منظور تعداد ۱۲ سر رت نر بالغ نژاد ویستار ۸ هفته‌ای به روش تصادفی ساده به ۲ گروه ورزش (تعداد = ۶ سر) و شاهد (تعداد = ۶ سر) تقسیم شدند. گروه ورزش به مدت ۶ هفته و ۵ بار در هفته، تمرین مقاومتی (حمل وزنه با ۴۰ الی ۱۶۰ درصد وزن بدن روی نردبان) را اجرا کردند. ۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی، تمامی رت‌ها کشته شدند و تاندون عضلات سولئوس و بازکننده بلند انگشتان (EDL) استخراج شد. بیان mRNA ژن‌های TGF-β1 و میوستاتین با استفاده از روش RealTime-PCR سنجیده شد و برای تجزیه‌وتحلیل آماری از آزمون t مستقل استفاده شد.

ملاحظات اخلاقی کلیه مراحل مطالعه با توجه به دستورالعمل اخلاقی و مجوز معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی با شماره IR.IAU.PS.REC.1398.296 انجام شد.

یافته‌ها نتایج نشان داد که بیان ژن TGF-β1 در تاندون عضلات EDL ($P\leq0/001$) و سولئوس ($P\leq0/01$) به طور معنی‌داری افزایش یافت، درحالی‌که بیان ژن میوستاتین در تاندون عضلات EDL ($P\leq0/001$) و سولئوس ($P\leq0/05$) به طور معنی‌داری کاهش یافت.

نتیجه‌گیری به نظر می‌رسد که تمرین مقاومتی باعث تنظیم مثبت سطوح پایه ژن TGF-β1 و تنظیم منفی سطوح پایه ژن میوستاتین در تاندون عضلات تند و کند انقباض می‌شود و این اثرات در تاندون عضله تند انقباض به طور قابل‌توجهی بیشتر است.

مقدمه

عضله اسکلتی نقشی مهم در حفظ وضعیت بدن، حرکت، صحبت کردن، تنفس، تأمین حرکت و نیازهای سوخت‌وسازی دارد. از منظر فیزیولوژیکی، عضله اسکلتی بافتی پویاست که قادر است با تحریکات فیزیولوژیک گوناگون ازجمله تمرینات ورزشی سازگاری یابد [۱].

بافت تاندون امتداد ماتریکس خارج سلولی (ECM) عضلانی است که به صورت مکانیکی و ساختاری به صورت هماهنگ با عضله با بار مکانیکی سازگاری می‌یابد [۲]. قبلاً تصور می‌شد که تاندون یك بافت غیرفعال از نظر متابولیك است، اما مطالعات اخیر نشان داده‌اند که تاندون نیز مانند عضله اسکلتی، بافتی پویاست و فعالیت سوخت‌وسازی آن با بار مکانیکی افزایش می‌یابد. به دنبال یک ورزش منفرد، تاندون جذب گلوکز و سنتز کلاژن خود را افزایش می‌دهد و این حالت ۳-۲ روز پس از آن همچنان ادامه می‌یابد [۳]. تمرین مقاومتی مزمن به افزایش سطح مقطع CSA[1] و سفتی تاندون منجر می‌شود؛ این امر به تاندون امکان می‌دهد بارهای بزرگ‌تری از عضله هایپرتروفی شده را تحمل کرده و انرژی الاستیک را به شیوه‌ای کارآمدتر ذخیره کند [۳]. همچنین تمرینات مقاومتی با تکثیر فیبروبلاست‌ها همراه است که در پاسخ به بار مکانیکی کلاژن را سنتز می‌کنند [۳، ۴].

با اینکه تغییرات مکانیکی و مورفولوژیکی که در پاسخ به تمرینات مقاومتی در تاندون‌ها رخ می‌دهد، به خوبی مستند شده است، بااین‌حال درباره سازوکارهای اساسی سلولی و مولکولی

1. Cross-sectional area

* نویسنده مسئول:
حسن متین همائی
نشانی: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی.
تلفن: ۳۶۸۰۸۱۰ (۹۱۲) ۹۸+
پست الکترونیکی: hasanmatinhomaee@gmail.com

جدول ۱. پروتکل تمرین مقاومتی

هفته	اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم
بار (درصد وزن بدن)	۵۰-۴۰	۷۰-۶۰	۹۰-۸۰	۱۱۰-۱۰۰	۱۴۰-۱۳۰	۱۶۰-۱۵۰
تعداد ست	۵	۵	۵	۶	۶	۶
تکرار در هر ست	۸	۸	۸	۸	۸	۸

که این پاسخ‌ها را تنظیم می‌کنند، اطلاعات زیادی در دسترس نیست. به نظر می‌رسد که مسیر پیام‌رسانی خانواده عامل رشدی تغییرشکل‌دهنده بتا ۱ (TGF-β1)[۲] نقش اصلی را در سازگاری تاندون با ورزش مقاومتی ایفا می‌کند. میوستاتین عضو خانواده بزرگ TGF-β است که بیان آن به طور منفی رشد عضله اسکلتی را تنظیم می‌کند [۵]. هم TGF-β1 و هم میوستاتین تکثیر فیبروبلاست تاندون و سنتز کلاژن نوع I را تحریک می‌کنند [۶، ۴]. درحالی‌که به نظر می‌رسد پیام‌رسانی TGF-β1 و میوستاتین برای فراخوانی و حفظ فیبروبلاست‌های تاندونی در طول تکامل از اهمیت زیادی برخوردار است [۶، ۷].

مطالعات متعددی وجود دارند که توانایی این سایتوکاین‌ها در القای تکثیر فیبروبلاست و سنتز کلاژن نوع I در شرایط آزمایشگاهی را نشان می‌دهند [۲]، بااین‌حال هنوز نقش این مسیرهای پیام‌رسانی در رشد و ترمیم تاندون آزمودنی بالغ با تردیدهایی روبه‌رو است. در بیشتر مطالعات صورت‌گرفته در زمینه سازگاری‌های ناشی از تمرینات ورزشی، بیشتر خود عضلات اسکلتی مد نظر بوده [۱۰-۸] و به سازگاری‌های تاندونی چندان توجه نشده است. بر اساس سوابق پژوهش، مطالعات آزمایشگاهی روی فیبروبلاست‌های تاندون بالغ و مطالعات سنتز کلاژن در آزمودنی‌های بالغ در پاسخ به تمرین مقاومتی، تصور بر این است که TGF-β1 و میوستاتین نقش مهمی در رشد و سازگاری تاندون‌های بالغ به تمرین مقاومتی ایفا می‌کنند [۱۱]؛ بنابراین این مطالعه با هدف بررسی اثر ۶ هفته تمرین مقاومتی بر بیان ژن‌های TGF-β1 و میوستاتین در تاندون عضلات تند و کند انقباض موش‌های نر ویستار انجام شد.

روش تحقیق

پژوهش حاضر از نوع تجربی است که به شیوه آزمایشگاهی انجام شد. آزمودنی‌های تحقیق حاضر تعداد ۱۲ سر رت نر بالغ نژاد ویستار ۸ هفته‌ای با میانگین وزنی ۲۰±۱۹۵ گرم بودند که از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. رت‌ها در دمای محیطی ۳±۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت حدود ۴۵ درصد و چرخه روشنایی/تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت نگهداری شدند، طوری‌که در دسترسی به آب و غذای استاندارد محدودیتی نداشته باشند. بعد از یک هفته آشناسازی با محیط نگهداری، رت‌ها به روش تصادفی ساده به ۲ گروه تقسیم شدند: گروه تمرین (تعداد =۶ سر) و گروه شاهد (تعداد =۶ سر)؛ گروه ورزش به مدت ۶ هفته تمرین مقاومتی را اجرا کردند.

رت‌های گروه تمرین مقاومتی به منظور آشناسازی با تمرین به مدت ۳ روز آموزش داده شدند؛ سپس پروتکل تمرین مقاومتی به مدت ۶ هفته، ۵ روز در هفته بر حیوانات گروه تمرین اعمال شد. تمرینات مقاومتی شامل بالا رفتن از نردبان یک متری به فاصله میله‌های ۲ سانتی‌متری و شیب ۸۵ درجه، محقق‌ساخته و حمل وزنه‌ای بود که به دم رت‌ها آویزان می‌شد. در هفته اول میزان وزنه‌های بسته شده به رت‌ها ۴۰ تا ۵۰ درصد وزن بدن آن‌ها بود که به‌تدریج افزایش و به حدود ۱۶۰ درصد وزن بدن در هفته ششم رسید. افزایش در بار تمرین در طول پروتکل تمرینی از طریق دستکاری وزنه جابه‌جا شده، تکرار در هر ست و تعداد ست‌ها اعمال شد. تعداد تکرارها در هر ست، ۸ تکرار؛ فاصله استراحت بین ست‌ها ۲ دقیقه و فاصله استراحت بین تکرارها ۲۰ – ۱۰ ثانیه بود. جزئیات پروتکل تمرینی در جدول شماره ۱ گزارش شده است [۱۲].

۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی، تمامی رت‌ها از طریق قرار گرفتن در ظرف حاوی اتر بی‌هوش شدند؛ سپس برش در ناحیه شکم و قفسه سینه ایجاد شد و حیوانات با کشیدن خون به وسیله سرنگ مستقیماً از قلب کشته شدند. در مرحله بعد، تاندون عضلات سولئوس[۳] (SOL) و بازکننده بلند انگشتان[۴] (EDL) پای راست آن‌ها بلافاصله با دقت استخراج و در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد برای سنجش‌های بعدی نگهداری شد.

به منظور استخراج RNA تام از بافت تاندون هموژن‌شده، ۱ میلی‌لیتر ترایزول (Invitrogen, CN 15596018, USA) به ۱۰۰ میلی‌گرم بافت اضافه و پس از مخلوط کردن کامل به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد؛ سپس ۴۰۰ میکرولیتر کلروفرم سرد (Merek, CAS 67-66-3 102445, Germany) به نمونه اضافه و به مدت ۱۵ ثانیه مخلوط شدند. محلول در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵

2. Transforming growth factor-β1 (TGF-β1)

3. Soleus (SOL)

4. Extensor digitorum longus (EDL)

جدول ۲. توالی پرایمرهای مورد مطالعه در تحقیق حاضر.

Accession Number	Product Length	Tm	Primer (۵′ ۳′)	Forward/ Reverse	Gene
NM_۰۲۱۵۷۸/۲	۲۰۰	۵۵,۱۷	CAACAACGCAATCTATGACAA	FW	TGF-β۱
		۵۴,۵۷	CAAGGTAACGCCAGGAAT	REV	
NM_۰۱۹۱۵۱/۱	۷۸	۵۳,۶۵	CTACCACGGAAACAATCATTA	FW	Myostatin
		۵۹,۰۲	AGCAACATTTGGGCTTTCCAT	REV	
XM_۰۱۷۵۹۳۹۶۳/۱	۱۲۱	۶۱,۵۸	AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG	FW	GAPDH
		۶۱,۳۲	CATACTCAGCACCAGCATCACC	REV	

دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع حاوی RNA به میکروتیوب دیگری انتقال داده شد، سپس ۵۰۰ میکرولیتر اتانول (Merek, CAS 64-17-5 107017, Germany) به محلول RNA اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. این محلول نیز پس از ۲۴ ساعت به مدت ۱۵ دقیقه (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه) سانتریفیوژ شد. مایع رویی با دقت خارج و ۱ میلی‌لیتر اتانول خالص سرد به رسوب RNA اضافه شد و سپس به مدت ۵ دقیقه (در دمای ۴ درجه با ۷۵۰۰ دور در دقیقه) سانتریفیوژ شد.

در ادامه، مایع رویی به‌دقت خارج و رسوب RNA با ۱۰۰ میکرولیتر ایلوشن بافر (Sigma Aldrich, H5413, Germany) رقیق شد. تمام مراحل استخراج زیر هود و با مواد و وسایل کاملاً استریل انجام گرفت. در پایان، غلظت و نسبت جذبی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (Eppendorf, Germany) ارزیابی و نسبت جذبی ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ -۱/۶ به عنوان تخلیص مطلوب تعریف شد. برای اطمینان بیشتر از صحت تخلیص RNA، تعدادی از RNAs تخلیص‌شده به طور تصادفی روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد.

پس از استخراج RNA با خلوص و غلظت بالا، مراحل سنتز cDNA مطابق پروتکل شرکت سازنده (high-capacity cDNA reverse transcription kit) انجام شد. ابتدا RNA، پرایمر و آب با هم ترکیب شدند و محلول به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد، سپس محلول به مدت ۲ دقیقه روی یخ قرار گرفت. پس از آن enzyme mix و reaction buffer به محلول اضافه شدند. محلول در ۳ مرحله متوالی انکوبه شد: مرحله اول به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد؛ مرحله دوم به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و مرحله سوم به مدت ۵ ثانیه در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد. درنهایت، cDNA سنتز شده در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. تمام مراحل انجام کار روی یخ، زیر هود و با استفاده از وسایل RNase free انجام شد.

برای اندازه‌گیری سطوح بیان mRNA از روش کمّی Real time-PCR استفاده شد. در ابتدای کار میزان غلظت بهینه cDNA و همچنین پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از آزمایش سریال غلظت برای هر کدام به طور جداگانه مشخص شد، طوری‌که کمترین میزان دایمر و بهترین Ct مشاهده شود. Real time-PCR با استفاده از RealQ Plus 2x Master Mix Green شرکت AMPLIQON و با استفاده از غلظت ۲۵۰ نانوگرم از cDNA انجام گرفت. شرکت پیشگام (ایران) توالی پرایمرهای مربوط به متغیرهای مورد مطالعه را بر اساس اطلاعات این ژن‌ها در بانک ژنی NCBI طراحی کرد (جدول شماره ۲).

برنامه Real time-PCR شامل واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ دقیقه، واسرشت در هر سیکل PCR در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و با توجه به دمای اتصال پرایمرها هر سیکل به مدت ۳۰ ثانیه (۴۰ سیکل) در نظر گرفته شد. نمودار دمای ذوب برای بررسی صحت واکنش‌های انجام‌شده، به صورت اختصاصی برای هر ژن و در هر بار از واکنش به همراه نمودار کنترل منفی برای بررسی وجود آلودگی در هر واکنش ارزیابی شد. از ژن گلیسرآلدهید-۳-فسفات دهیدروژناز[5] (GAPDH) به عنوان ژن کنترل استفاده و میزان بیان ژن مورد نظر با فرمول 2-ΔΔCT محاسبه شد [۱۳].

برای بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون کولموگروف-اسمیرنف (KS) استفاده شد. به منظور تحلیل داده‌های به‌دست‌آمده از آزمون t مستقل استفاده شد. به معنی‌داری بین متغیرها در سطح P≥۰/۰۵ توجه شد. برای تجزیه‌وتحلیل داده‌ها، از نرم‌افزار SPSS ۱۶ و برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار ۲۰۱۶ Excel استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج نشان داد که بین مقادیر mRNA ژن‌های TGF-β1

5. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

و میوستاتین تاندون عضلات EDL و سولئوس گروه تمرین مقاومتی در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری وجود دارد. بیان mRNA ژن TGF-β1 تاندون عضلات EDL (۰/۰۴±۰/۱۴= گروه شاهد در مقایسه با ۰/۱۴±۰/۴۸= گروه تمرین مقاومتی، P≤۰/۰۰۱) و سولئوس (۰/۱۴±۰/۱۷ = گروه شاهد در مقایسه با ۰/۰۸±۰/۳۲ = گروه تمرین مقاومتی، P≤۰/۰۱) به طور معنی‌داری افزایش یافت، درحالی‌که بیان mRNA ژن میوستاتین تاندون عضلات EDL (۰/۰۷±۰/۵۶ = گروه شاهد در مقایسه با ۰/۱±۰/۲۷ = گروه تمرین مقاومتی، P≤۰/۰۰۱) و سولئوس (۰/۰۵±۰/۲۹ = گروه شاهد در مقایسه با ۰/۰۷±۰/۲۱ = گروه تمرین مقاومتی، P≤۰/۰۵) به طور معنی‌داری کاهش نشان داد (تصویر شماره ۱ و ۲).

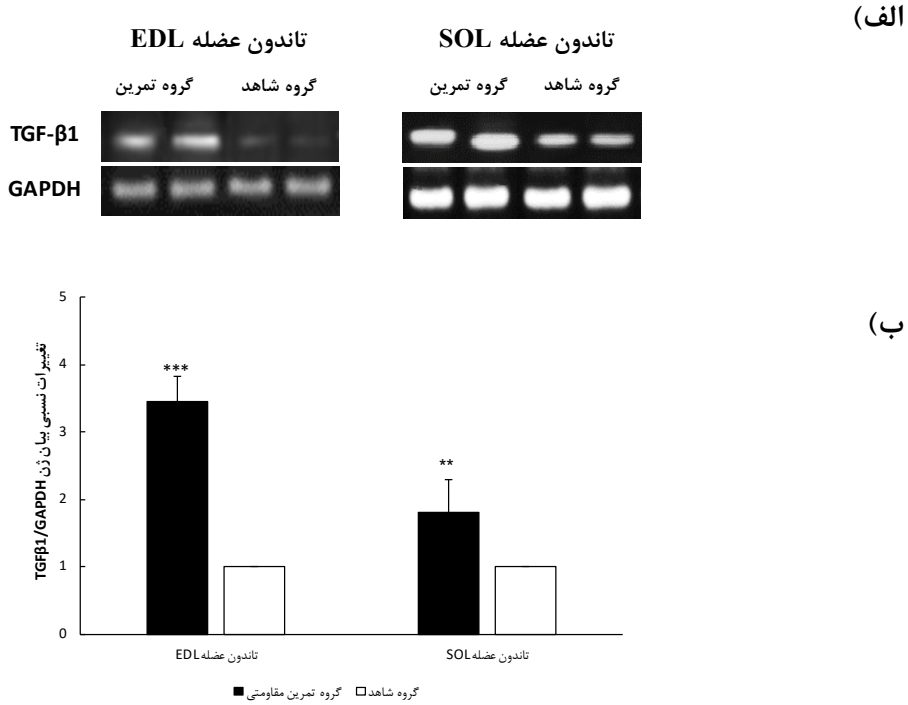
بحث

مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر ۶ هفته تمرین مقاومتی بر بیان ژن‌های TGF-β1 و میوستاتین در تاندون عضلات تند و کند انقباض موش‌های نر ویستار انجام شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که به دنبال ۶ هفته برنامه تمرین مقاومتی، میزان بیان mRNA ژن TGF-β1 در هر دو عضله EDL و سولئوس به شکل معنی‌داری افزایش می‌یابد. از سوی دیگر، ۶ هفته برنامه تمرین مقاومتی موجب کاهش چشمگیر میزان بیان mRNA ژن میوستاتین در عضلات EDL و سولئوس شد.

بررسی متون حاکی از آن است که بیشتر مطالعات صورت‌گرفته در این حوزه به پاسخ و سازگاری‌های عضلات اسکلتی به تمرین ورزشی متمرکز شده‌اند و به بافت تاندون چندان توجه نشده است. این امر مقایسه یافته‌های مطالعه حاضر با پژوهش‌های پیشین را دشوار می‌سازد. باوجوداین، هنیمیر و همکاران[6] (۲۰۰۷) افزایش سطوح mRNA ژن TGF-β1 و کلاژن‌های نوع I و III در عضله دوقلوی میانی و تاندون آشیل به دنبال انجام انقباضات ایزومتریک، کانسنتریک و اکسنتریک از طریق تحریک عصب سیاتیک به مدت ۴ روز را گزارش کردند [۱۴]؛ همچنین در تحقیق دیگری نشان داده شد که انجام تمرین استقامتی طولانی‌مدت باعث افزایش قابل‌توجهی در mRNA ژن TGF-β1 در عضله سولئوس شده است [۳].

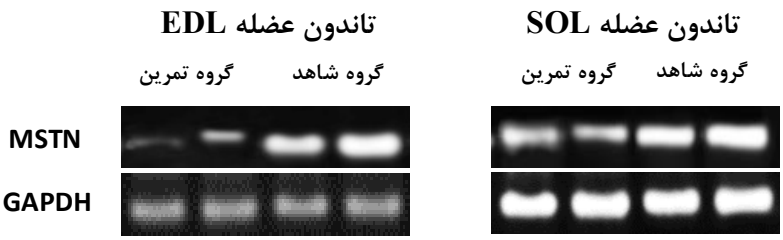
سازوکارهایی که در طول تمرینات ورزشی بار مکانیکی را به افزایش سطوح کلاژن در واحد عضله-تاندون مرتبط می‌کنند، هنوز به طور کامل شناخته نشده‌اند. بااین‌حال، شواهد موجود نشان‌دهنده آن است که TGF-β1 واسطه اصلی القای سنتز کلاژن در فیبروبلاست‌ها از طریق بار مکانیکی بوده [۱۴] و چنین نقشی برای TGF-β1 در تاندون‌ها نیز پیشنهاد شده است [۱۵]. افزایش بالای ۲۴۵ درصدی میزان بیان mRNA ژن TGF-β1 در تاندون عضله EDL در برابر افزایش ۸۱ درصدی آن در تاندون عضله سولئوس که در مطالعه حاضر مشاهده شد، به احتمال زیاد

6. Heinemeier et al.

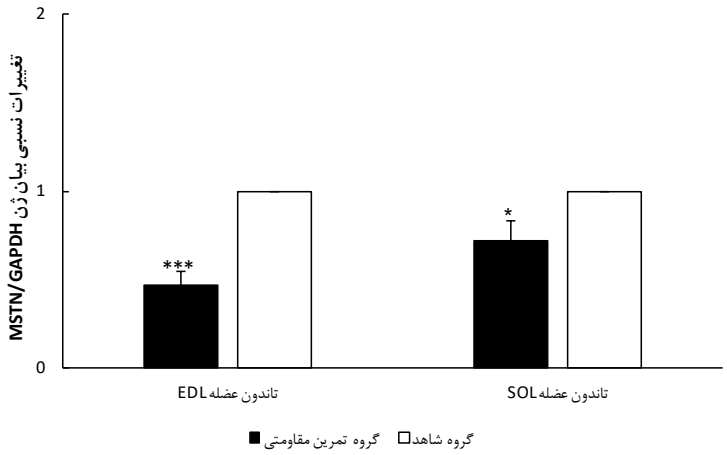


نمودار ۱. الف) نمونه صحت تخلیص RNA توسط الکتروفورز ژل آگارز. ب) میزان بیان ژن TGF-β1 در تاندون عضلات EDL و SOL.
**P ≤ ۰/۰۱؛ ***P ≤ ۰/۰۰۱

الف)



ب)



نمودار ۲. الف) نمونه صحت تخلیص RNA توسط الکتروفورز ژل آگارز. ب) میزان بیان ژن میوستاتین درتاندون عضلات EDL و SOL.
***P≤۰/۱۰۰؛ * P≤۰/۵۰

حاکی از درگیری بالاتر عضلات تند انقباض در تمرینات مقاومتی است که موجب ایجاد سازگاری‌های بیشتر در بافت کلاژنی و تحمل نیروی بالاتر وارده از سوی عضله تند انقباض به تاندون می‌شود.

در مطالعه حاضر، تمرینات مقاومتی باعث کاهش سطوح پایه بیان mRNA ژن میوستاتین در تاندون عضلات EDL و سولئوس شد. کاهش سطوح سرمی و عضلانی میوستاتین به دنبال تمرینات ورزشی در بیشتر مطالعات گزارش شده است [۹، ۱۰، ۱۶]؛ بااین‌حال، بر اساس جستجوهای ما تنها مطالعه‌ای که تغییرات میوستاتین در اثر سازگاری ورزشی در تاندون را اندازه‌گیری کرده است، عدم تغییر سطوح بیان mRNA ژن میوستاتین در تاندون آشیل و کاهش آن در عضله دوقلوی میانی به دنبال انجام تمرینات مقاومتی کوتاه‌مدت را نشان داده است [۱۴]. از دلایل تفاوت در یافته‌ها می‌توان به مدت و نوع پروتکل تمرین مقاومتی اشاره کرد. در مطالعه مذکور از تحریک عصب سیاتیک به منظور اعمال برنامه تمرین مقاومتی در رت‌ها استفاده شده بود که تنها ۴ روز ادامه داشت، درحالی‌که برنامه تمرین مقاومتی استفاده‌شده در مطالعه حاضر بالابردن وزنه از نردبان به مدت ۶ هفته بود.

در تحقیقی جالب گزارش شده است که نوع ورزش عامل اصلی تعیین‌کننده برای فراوانی رونویسی RNA میوستاتین به شمار نمی‌رود [۱۷]. عطارزاده حسینی و همکاران (۱۳۹۵) کاهش سطوح مایوستاتین سرمی در زنان را به دنبال ۸ هفته تمرینات مقاومتی با شدت بالا گزارش کردند [۱۶]. هیتل و همکاران[7] (۲۰۱۰) تأثیر شش‌ماه تمرین هوازی متوسط را بر مقادیر میوستاتین عضلانی و پلاسمایی مردان میانسال بررسی و کاهش متوسط ۳۷ درصدی میوستاتین عضلانی و پلاسمایی را بعد از تمرین گزارش کرده‌اند [۹]. در تحقیقی دیگر، ماتساکاس و همکاران[8] (۲۰۰۵) نتایج متفاوتی را در بیان ژن میوستاتین در پاسخ به تمرین استقامتی در بافت‌های مختلف گزارش کرده‌اند. در عضله دوقلو موش‌های صحرایی تمرین‌کرده در بیان ژن میوستاتین کاهش ۶۵ درصدی گزارش شد، درحالی‌که در عضله پهن خارجی این کاهش متوسط و به مقدار ۴۹ درصد بود و در عضله نعلی بین موش‌های تمرین‌کرده و بی‌تمرین تغییری مشاهده نشد [۱۰].

درحقیقت، شواهد زیادی از این ایده حمایت می‌کنند که تنظیم میوستاتین با توجه به نوع تارهای عضلانی ویژگی حساسیت و پاسخ دقیق تری دارند و به‌شدت با ایزوفرم IIb زنجیره سنگین میوزین عضله ارتباط دارد [۱۸] و غلظت بالای

7. Hittel et al.
8. Matsakas et al.

پروتئین میوستاتین در عضلهٔ تندانقباض در مقایسه با تارهای کندانقباض مشاهده شده است [۱۹]. این گزارش‌ها می‌تواند نتایج حاصل از مطالعه حاضر مبنی بر کاهش بالای ۵۳ درصدی بیان mRNA ژن میوستاتین در عضله EDL در مقایسه با کاهش اندک ۲۸ درصدی بیان آن در عضله سولئوس را توجیه کند.

میوستاتین علاوه بر اینکه اندازه، نوع و انقباض‌پذیری عضله را کنترل می‌کند، ترکیب ECM عضله و تاندون را احتمالاً از طریق القای بیان کلاژن نوع I تنظیم می‌کند [۶]. بااین‌حال، مندیاس و همکاران[9] (۲۰۱۵) نشان داده‌اند که غیرفعالسازی ژنتیکی میوستاتین در رت‌ها ضمن افزایش حجم عضلانی، تأثیر منفی بر ویژگی‌های مکانیکی تاندون ندارد [۲۰]. بر اساس نتایج حاصل از مطالعه حاضر و با در نظر گرفتن گزارش مندیاس و همکاران (۲۰۱۵) به نظر می‌رسد که سازگاری‌های تاندونی ناشی از تمرینات مقاومتی بیشتر متأثر از پیام‌رسانی TGF-β1 بوده و میوستاتین نقش چندانی در این زمینه ایفا نمی‌کند. البته باید توجه داشت که جمع‌آوری نمونه‌ها در مطالعه حاضر، ۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی صورت گرفته و این احتمال وجود دارد که سطح بیان میوستاتین در ساعات اولیه بعد از تمرین افزایش داشته است که این موضوع سبب سازگاری‌های تاندونی می‌شود. عدم اندازه‌گیری سطوح بیان میوستاتین به صورت سریال زمانی که یکی از محدودیت‌های مطالعه حاضر به شمار می‌رود، این تفسیر را دشوار می‌کند.

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی، تمرین مقاومتی باعث تنظیم مثبت سطوح پایه mRNA ژن TGF-β1 و تنظیم منفی سطوح پایه mRNA ژن میوستاتین در تاندون عضلات تند و کند انقباض می‌شود و این اثرات در عضله تندانقباض در مقایسه با عضله کندانقباض به طور قابل‌توجهی بیشتر است.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

همه مراحل مربوط به حیوانات با توجه به دستورالعمل اخلاقی و مجوز معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی با شماره IR.IAU.PS.REC.1398.296 انجام شد.

حامی مالی

مقاله حاضر برگرفته از رساله دکتری نویسنده اول آقای محمدنژاد، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی است.

مشارکت نویسندگان

تعریف موضوع و بیان مسأله: تمام نویسندگان؛ روش پژوهش: قاسم محمدنژاد؛ تحلیل داده‌ها: قاسم محمدنژاد؛ نگارش متن و بازبینی: تمام نویسندگان

تعارض منافع

نویسندگان مقاله هیچ‌گونه تعارضی در منافع اعلام نکردند.

تشکر و قدردانی

از پرسنل محترم بخش فیزیولوژی و فارماکولوژی انستیتو پاستور ایران و همچنین مسئول محترم حیوان‌خانه دانشگاه تربیت مدرس به خاطر همکاری در اجرای این مطالعه کمال تشکر و قدردانی را داریم.

9. Mendias et al.

References

[1] Schiaffino S, Reggiani C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: Gene regulation and functional significance. Physiol Rev. 1996; 76(2):371-423. [DOI:10.1152/physrev.1996.76.2.371] [PMID]

[2] Davis ME, Gumucio JP, Sugg KB, Bedi A, Mendias CL. MMP inhibition as a potential method to augment the healing of skeletal muscle and tendon extracellular matrix. J Appl Physiol. 2013; 115(6):884-91. [DOI:10.1152/japplphysiol.00137.2013] [PMID] [PMCID]

[3] Kjær M, Langberg H, Heinemeier K, Bayer M, Hansen M, Holm L, et al. From mechanical loading to collagen synthesis, structural changes and function in human tendon. Scandinavian J Med Sci Sports. 2009; 19(4):500-10. [DOI:10.1111/j.1600-0838.2009.00986.x] [PMID]

[4] Mendias CL, Gumucio JP, Bakhurin KI, Lynch EB, Brooks SV. Physiological loading of tendons induces scleraxis expression in epitenon fibroblasts. J Orthop Res. 2012; 30(4):606-12. [DOI:10.1002/jor.21550] [PMID] [PMCID]

[5] McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-p superfamily member. Nature. 1997; 387(6628):83. [DOI:10.1038/387083a0] [PMID]

[6] Mendias CL, Bakhurin KI, Faulkner JA. Tendons of myostatin-deficient mice are small, brittle, and hypocellular. Proc Natl Acad Sci. 2008; 105(1):388-93. [DOI:10.1073/pnas.0707069105] [PMID] [PMCID]

[7] Pryce BA, Watson SS, Murchison ND, Staverosky JA, Dünker N, Schweitzer R. Recruitment and maintenance of tendon progenitors by TGFβ signaling are essential for tendon formation. Development. 2009; 136(8):1351-61. [DOI:10.1242/dev.027342] [PMID] [PMCID]

[8] Czarkowska-Paczek B, Zendzian-Piotrowska M, Bartlomiejczyk I, Przybylski J, Gorski J. The effect of acute and prolonged endurance exercise on transforming growth factor-beta1 generation in rat skeletal and heart muscle. J Physiol Pharmacol. 2009; 60(4):157-62. [PMID]

[9] Hittel DS, Axelson M, Sarna N, Shearer J, Huffman KM, Kraus WE. Myostatin decreases with aerobic exercise and associates with insulin resistance. Med Sci Sports Exerc. 2010; 42(11):2023-9. [DOI:10.1249/MSS.0b013e3181e0b9a8] [PMID] [PMCID]

[10] Matsakas A, Friedel A, Hertrampf T, Diel P. Short-term endurance training results in a muscle-specific decrease of myostatin mRNA content in the rat. Acta physiologica scandinavica. 2005; 183(3):299-307. [DOI:10.1111/j.1365-201X.2005.01406.x] [PMID]

[11] Gumucio JP, Sugg KB, Mendias CL. TGF-β superfamily signaling in muscle and tendon adaptation to resistance exercise. Exerc Sport Sci Rev. 2015; 43(2):93-9. [DOI:10.1249/JES.0000000000000041] [PMID] [PMCID]

[12] Jaafari Sardoui S, Nikoei R, Sheibani V. The effect of time series of resistance training on TGF-β1 expression and muscle hypertrophy in male wistar rats. J Appl Exerc Physiol. 2015; 11(22):23-32. [DOI:10.22080/JAEP.2016.1205]

[13] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001; 29(9):e45. [DOI:10.1093/nar/29.9.e45] [PMID] [PMCID]

[14] Heinemeier K, Olesen J, Haddad F, Langberg H, Kjær M, Baldwin K, et al. Expression of collagen and related growth factors in rat tendon and skeletal muscle in response to specific contraction types. J Physiol. 2007; 582(3):1303-16. [DOI:10.1113/jphysiol.2007.127639] [PMID] [PMCID]

[15] Yang G, Crawford RC, Wang JH. Proliferation and collagen production of human patellar tendon fibroblasts in response to cyclic uniaxial stretching in serum-free conditions. J Biomech. 2004; 37(10):1543-50. [DOI:10.1016/j.jbiomech.2004.01.005] [PMID]

[16] Attarzadeh Hosseini SR, Moeinnia N, Motahari Rad M. The effect of two intensities resistance training on muscle growth regulatory myokines in sedentary young women. Obes Medi. 2017; 5:25-8. [DOI:10.1016/j.obmed.2017.01.004]

[17] Matsakas A, Bozzo C, Cacciani N, Caliaro F, Reggiani C, Mascarello F, et al. Effect of swimming on myostatin expression in white and red gastrocnemius muscle and in cardiac muscle of rats. Exp Physiol. 2006; 91(6):983-94. [DOI:10.1113/expphysiol.2006.033571] [PMID]

[18] Carlson CJ, Booth FW, Gordon SE. Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. Am J Physiol. 1999; 277(2):R601-6. [DOI:10.1152/ajpregu.1999.277.2.R601] [PMID]

[19] Wehling M, Cai B, Tidball JG. Modulation of myostatin expression during modified muscle use. FASEB J. 2000; 14(1):103-10. [DOI:10.1096/fasebj.14.1.103] [PMID]

[20] Mendias CL, Lynch EB, Gumucio JP, Flood MD, Rittman DS, Van Pelt DW, et al. Changes in skeletal muscle and tendon structure and function following genetic inactivation of myostatin in rats. J Physiol. 2015; 593(8):2037-52. [DOI:10.1113/jphysiol.2014.287144] [PMID] [PMCID]