

بررسی تأثیر لیگاتور بندی عصب نخاعی بر بیان ژن نورو تروفین-۴ عضلانی در موش های صحرائی ویستار نر

محمد پوررنجبر^۱، سمانه مهري^۲، مسعود رحمتی^۳، عبدالرضا کاظمی^{۴*}

۱) گروه تربیت بدنی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

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

۳) گروه تربیت بدنی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه لرستان، قرم آباد، ایران

۴) گروه تربیت بدنی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۵/۵/۲۷

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۲۰

چکیده

مقدمه: نورون های حرکتی در طناب نخاعی ویژگی های انقباضی و ساختاری عضلات را دیکته می کنند. آسیب به نورون های حرکتی موجب تغییر الگوی بیان ژن در عضلات می گردند. با توجه به این که نورو تروفین-۴ (NT-4) جهت حیات و عملکرد طبیعی تار های عضلانی مورد نیاز است، هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر کاهش فعالیت به شکل لیگاتور بندی عصب نخاعی بر بیان ژن NT-4 در عضله نعلی است.

مواد و روش ها: ۱۰ سر موش صحرائی نر نژاد ویستار با میانگین وزن 250 ± 20 گرم به دو گروه شاهد سالم (C) و گروه لیگاتور بندی عصب نخاعی (SNL) تقسیم شدند. در طول ۶ هفته پس از ایجاد SNL، آزمون های رفتاری درد نورو پاتیک در گروه های پژوهشی به طور مستمر انجام شد. در پایان هفته ششم تغییرات بیان ژن NT-4 در عضله نعلی با تکنیک Real time اندازه گیری شد. **یافته های پژوهش:** آزمون های رفتاری نشان دادند که SNL موجب آلوداینیای مکانیکی و پر دردی حرارتی در گروه SNL می شود که این آستانه کاهش درد در تمام طول تحقیق مشاهده گردید ($p < 0.05$) هم چنین در مقایسه با گروه شاهد میزان بیان ژن NT-4 عضله نعلی در گروه SNL بالا تر بود ($p < 0.05$).

بحث و نتیجه گیری: پژوهش حاضر نشان داد که کاهش فعالیت به شکل SNL با کاهش آستانه درد و افزایش جبرانی بیان ژن NT-4 در عضله نعلی همراه است. با این حال سازوکار ها و پیامد های پاتو فیزیولوژیک این افزایش نا مشخص باقی مانده است.

واژه های کلیدی: کاهش فعالیت، بیان ژن NT-4، درد نوروپاتی، عضله نعلی

* نویسنده مسئول: گروه تربیت بدنی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران

Email: a.kazemi@vru.ac.ir

Copyright © 2017 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

استیل کولینی پس سیناپسی، تغییرات انطباقی در فیبر عضلانی همانند اختلال در فعال سازی پروتئین های انقباضی همراه است (۹). از سوی دیگر افزایش بیان NT-4 عضلانی ممکن است با بهبود عملکرد آکسون حرکتی همانند رشد نورونی مرتبط باشد که احتمالاً به عنوان پیام وابسته به میزان فعالیت، جهت رشد و تجدید ساختار نورون های حرکتی عمل می کند (۱۰). از سوی دیگر، ایجاد آسیب در اعصاب محیطی در برخی شرایط سبب ایجاد درد مزمن می کند که به آن درد نورو پاتی گفته می شود (۱۱). برخلاف درد حاد که جهت محافظت از بدن عمل می کند، درد مزمن نوروپاتی علت مفیدی نداشته و اثرات عمیقی بر کیفیت زندگی و هم چنین هزینه های درمانی بیماران ایجاد می کند (۱۲). معمولاً در بیماران دچار درد مزمن کاهش فعالیت بدنی امری شایع به نظر می رسد که این حالت به شدت سبب کاهش کیفیت زندگی بیماران شده (۱۳) و عوارضی هم چون چاقی، کاهش ظرفیت عملکرد قلبی-عروقی و تنفسی، آتروفی عضلانی و اسکلتی را موجب می گردد (۱۴). با توجه به مطالب ذکر شده بالا، در مطالعه حاضر از روش لیگاتور بندی عصب نخاعی (Spinal Nerve Ligation) به عنوان مدلی از کاهش فعالیت جهت بررسی پیامد فیزیولوژیکی آن در عضله نعلی استفاده گردید. به علاوه، با توجه به اهمیت فرآیند های شکل پذیری عضلات اسکلتی در شرایط کاهش و افزایش فعالیت های بدنی در توسعه فرآیند و راه های درمانی و بهبود روند باز توانی آسیب های عضلانی (۱۵)، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر کاهش فعالیت به شکل SNL بر میزان بیان ژن NT-4 در عضله نعلی موش های صحرایی نر ویستار است.

مواد و روش ها

این مطالعه به روش تجربی روی ۱۰ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار در محدوده وزنی 20 ± 250 گرم انجام گرفت. جهت آشنایی با محیط حیوان خانه، حیوانات پس از خریداری از انستیتو پاستور در شرایط دمایی 4 ± 22 درجه سانتی گراد و تحت چرخه ۱۲:۱۲ ساعت تاریکی-روشنایی در آزمایشگاه حیوانات

صدمات به نورن های حرکتی واقع در طناب نخاعی، تغییرات انقباضی و مورفو لوژیک چشم گیری را در عضلات اسکلتی مربوطه ایجاد می کنند. این تغییرات بسیار گسترده بوده که برخی از آن ها شامل افزایش نسبت زنجیره سنگین میوزین (MHC) نوع سریع و کاهش MHC نوع آهسته، آتروفی و کاهش آنزیم های اکسایشی، کاهش نیرو، توان و استقامت تار عضلانی می باشند و در نهایت کاهش مقاومت در برابر خستگی را در پی دارند (۱). این تغییرات پاتو فیزیولوژیک مشاهده شده در عضلات کاملاً مشابه وضعیتی است که حرکتی، بی تحرکی، بی باری در اثر فضا نوردی، استراحت مطلق و یا حتی بی تمرینی در عضلات ایجاد می کنند (۲،۳). از سوی دیگر مدارک گسترده علمی نشان می دهند که نورو تروفین ها مولکول های پیام رسان رو به عقبی (Retrograde) هستند که تمایز و حیات سلول ها را در اعصاب مرکزی و محیطی تنظیم می کنند (۴). از نورو تروفین ها می توان به عامل رشد عصبی (Nerve Growth Factor)، عامل رشد عصبی مشتق شده از مغز (Brain Derived Neurotrophic Factor)، نورو تروفین-۳ و نورو تروفین-۴ اشاره کرد (۵). نورو تروفین ها علاوه بر نقش مهم در حیات سلولی در شکل پذیری عصبی، بهبود عملکرد سیناپسی و تحریک پذیری نوتروفینی دخیل هستند (۴). جدای از عملکرد فیزیولوژیک آن ها در بافت های عصبی، نورو تروفین ها نقش گسترده ای نیز در سایر بافت ها هم چون عضلات اسکلتی دارند (۶). با این حال، هر چند بیشتر نورو تروفین ها را می توان به عنوان کاندید های بالقوه در بررسی ویژگی ها و عملکرد سلول عضلانی در نظر گرفت، اما NT-4 به طور خاصی مورد نظر است زیرا mRNA آن به تغییرات محیطی حساسیت بالایی را نشان می دهد (۷). جدای از این، گزارش شده است که NT-4 ممکن است بر عضله به شکل اتو کرین تأثیر گذارد و هم چنین احتمالاً به عنوان پیام تنظیم گر ارتباط عصبی-عضلانی عمل می کند (۸). فقدان NT-4 در عضلات، با نا توانی در رهایش ناقل عصبی و اختلالات هدایت پذیری کانال های استیل کولینی، کاهش تراکم گیرنده

دانشگاه تربیت مدرس نگهداری و با غذای مخصوص و آب تغذیه شدند. قبل از شروع پروتکل، رت ها بر اساس همسان سازی وزن به دو گروه شاهد سالم (تعداد=۵) (C) و گروه کاهش فعالیت (تعداد=۵) (SNL) تقسیم شده و هر روز به وضعیت بهداشتی حیوانات رسیدگی می شد. در سراسر دوره پژوهش موش ها توسط دو نفر نیز جابه جا شدند و تمام فرآیند های پژوهش حاضر مطابق با کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات که توسط کمیته اخلاق دانشگاه مورد بررسی و تایید قرار گرفت بود، انجام گردید.

نحوه لیگاتور بندی: مدل SNL روشی است که به طور گسترده برای مطالعه سازوکار های درد نورو پاتیک و تأثیر دارو ها و رفتار های مرتبط با درد مورد استفاده قرار می گیرد. جهت ایجاد مدل SNL، ابتدا رت ها با سدیم پنتو باربیتول (۶۰ میلی گرم در هر کیلو گرم به صورت درون صفاقی) بیهوش شده و سپس عصب پنجم کمری نخاعی آن ها بر اساس روش کیم و چانگ به طور محکم گره زده شد (۱۶). به طور خلاصه در این روش، پس از اطمینان از بیهوشی حیوان عضلات بین مهره ای در سطح مهره چهارم کمری و دوم خاجی جدا شده و زائده عرضی مهره ششم کمری برداشته شد. عصب پنجم کمری سمت چپ نخاع مشخص و با ظرافت از اعصاب مجاور جدا می گردید. عصب پنجم کمری به طور محکم با استفاده از نخ مخصوص Thread silk، دقیقاً در انتهای دیستال جهت اطمینان از ایجاد اختلال در تمام فیبر ها گره زده شد. هم چنین، جهت اجتناب از آسیب به عصب چهارم کمری، دقت بالایی مبذول شد. تنها حیواناتی در ادامه آزمایش لحاظ شدند که درد نوروپاتی را در آزمون های رفتاری نشان دادند. در گروه C نیز پوست و عضله در ناحیه بالای ران برش داده شد و پس از نمایان شدن عصب سیاتیک، پوست و عضله نعلی بدون دست کاری عصب با نخ بخیه ۰/۴ سیلک بخیه زده شد و سپس آزمون های رفتاری انجام شد.

آزمون های رفتاری: به منظور سازگاری جهت آزمایش های رفتاری نیز حیوانات پیش از لیگاتور بندی عصب نخاعی به مدت ۳ روز در معرض آزمایشات رفتاری (۲ بار برای هر آزمایش) قرار گرفتند. بدین

صورت که حیوانات پس از انتقال به آزمایشگاه رفتار درد، بدون اجرای واقعی آزمایش، به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه در محیط اصلی آزمایش قرار می گرفتند. سرانجام به منظور ثبت اولیه میزان رفتار های درد، پس از اجرای اولیه آزمون ها، عملیات لیگاتور بندی انجام شد. هر هفته پس از لیگاتور بندی، با اجرای مجدد آزمون های رفتاری درد و پس از اطمینان یافتن از وقوع درد نورو پاتیک، حیواناتی که پاسخ درد نورو پاتیک را در گروه لیگاسیون نشان دادند به عنوان آزمودنی در پژوهش در نظر گرفته شدند. تا پایان پژوهش آزمون های رفتاری به منظور تأیید وجود درد نورو پاتیک در آزمودنی ها هر هفته اجرا گردید.

به منظور اندازه گیری آلودینیای مکانیکی، هر حیوان بر روی یک شبکه سیمی و در داخل یک محفظه پلکسی گلاس به ابعاد ۲۰×۲۰ و ارتفاع ۳۰ سانتی متر قرار می گرفت. جهت عادت کردن حیوانات به محیط جدید، ۳۰ دقیقه قبل از آزمایش، درون محفظه شفاف و بر روی صفحه مشبک قرار گرفتند. به منظور سنجش آلودینیای مکانیکی، از تار های مختلف Von Ferry در محدوده ۲ تا ۶۰ گرم (۶۰، ۲۶، ۱۵، ۸، ۴، ۲) ساخت شرکت Stolling, USA جهت سنجش حساسیت پوست به تحریکات تماسی استفاده شد. هر آزمایش با تار دارای کم ترین وزن شروع شد و در صورت عدم ایجاد پاسخ، به ترتیب از تار های با وزن بالاتر استفاده گردید. چنان چه ۲ بار متوالی، پاسخ (بلند کردن پا توسط حیوان) مشاهده می گردید، همان وزنه به عنوان آستانه پس کشیدن پنجه (PWT) ثبت می شد و آزمون خاتمه می یافت. چنان چه حیوان به هیچ یک از تار ها، از جمله تار شماره ۶۰ نیز پاسخ نمی داد، عدد ۶۰ به عنوان آستانه پاسخ در نظر گرفته می شد. هم چنین، هر آزمایش ۳ بار و به تناوب حداقل ۳ دقیقه تکرار می شد و میانگین آن ها به عنوان آستانه پس کشیدن پنجه منظور می گردید. پر دودی حرارتی با استفاده از روش هارگریوز و همکاران با کمی تغییر، مورد سنجش قرار گرفت (۱۷). به طور خلاصه، با استفاده از دستگاه Radiant Heat Plantar Test (Ugo Basil, Italy) حیوانات در سه اتاقک از جنس پلکسی گلاس (طول و عرض ۲۲ و ارتفاع ۳۰ سانتی متر) و بر روی

به ۰/۵ با کلروفورم مخلوط و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. محصول در ۴ درجه سانتی گراد، ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانتریفوژ و بخش معدنی و آبی از هم جدا شدند. بخش محتوی RNA برداشته و با نسبت ۱ به ۰/۵ با ایزو پروپانول مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق رها و سپس در ۴ درجه سانتی گراد، ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. Pellet حاوی RNA در اتانول شستشو و در ۲۰ میکرو لیتر آب RNAs-Free حل گردید. غلظت RNA مورد سنجش قرار گرفت (Eppendorff, Germany) و نسبت جذبی ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ به عنوان تخلیص مطلوب تعریف گردید. سنتز cDNA با ۱ میکرو گرم از RNA و با استفاده از Random hexamer primer و آنزیم Mmulv Reverse transcriptase انجام گرفت. اندازه گیری سطوح بیان NT-4 mRNA از روش کمی Real time-PCR با استفاده از Primix syber green II انجام شد (USA Applied Biosystems). مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۰ میکرو لیتر و هر واکنش به صورت دو تایی صورت پذیرفت. طراحی پرایمر ها بر اساس اطلاعات ژن های NT-4 و GAPDH در بانک ژنی (NBCI و توسط شرکت ماکروژن Macrogen Inc., Seoul, Korea) انجام شد. توالی پرایمر های مورد استفاده در جدول ۱ گزارش شده است، از GAPDH به عنوان ژن کنترل استفاده گردید. برنامه دمایی مورد استفاده در Real time-PCR شامل ۹۵ به مدت ۱۰ دقیقه، ۹۵ به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ به مدت ۱ دقیقه (تکرار ۴۰ سیکل) بود. در هر Run یک نمونه به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. کنترل داخلی (GAPDH) کنترل مثبت (گروه کنترل) و NT-4 هم زمان (در یک Run) ارزیابی شد. میزان بیان ژن های مورد نظر نیز با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد. ابتدا اعداد به دست آمده در نرم افزار EXCEL وارد شد و به کمک $2^{-\Delta\Delta CT}$ اعداد با ژن کنترل مقایسه شد و سپس اعداد حاصل در نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یک صفحه پلکسی گلاس تمیز قرار گرفتند. پس از ۳۰ دقیقه سازگاری حیوان با محیط جدید، با جابه جایی منبع متحرک تابش نور حرارتی، بخش میانی کف پای حیوان از میان سطح پلکسی گلاس در معرض تشعشع ثابت حرارتی قرار می گرفت. پس از تابش نور حرارتی توسط دستگاه به کف پای حیوان، زمان سنج فعال می شد و با کشیدن پا، تابش نور قطع و تایمر متوقف می گردید و با ثبت زمان تأخیر در پس کشیدن پنجه (PWL) میزان تحمل حیوان نسبت به محرک آسیب رسان حرارتی مورد سنجش قرار می گرفت. هر پا به طور متناوب و با فواصل ۵ تا ۱۰ دقیقه، برای سه بار آزمایش و میانگین آن ها به عنوان آستانه درد حرارتی ثبت می شد. هم چنین، جهت جلوگیری از آسیب بافت، نقطه نهایی آزمایش ۲۲ ثانیه در نظر گرفته شد. هم چنین، میانگین سه اندازه گیری اولیه به عنوان تأخیر پایه در نظر گرفته شد. هم چنین، جهت جلوگیری از آسیب بافت، Cut Off آزمایش ۲۲ ثانیه در نظر گرفته شد. در نهایت، پر دردی حرارتی به عنوان درصد حداکثر اثر ممکن (Maximum Possible Effect) با استفاده از فرمول زیر محاسبه می گردید: ((تأخیر پایه - زمان Cut Off) / (تأخیر پایه - تأخیر پس از لیگاتور بندی عصب نخاعی) $\times 100 = MPE\%$. هم چنین میانگین سه اندازه گیری اولیه به عنوان تأخیر پایه در نظر گرفته شد.

استخراج نمونه: پس از پایان دوره ۶ هفته، موش های صحرایی توسط تزریق درون صفاقی کتامین (۹۰ mg/kg و زایلازین (10 mg/kg) بیهوش و عضله نعلی سمت راست حیوانات بلا فاصله استخراج گردید. تمامی نمونه ها در نیتروژن مایع منجمد و برای تجزیه و تحلیل بعدی نگه داری شدند.

اندازه گیری سطوح NT-4 mRNA: سنجش حدود ۵۰ میلی گرم بافت عضلانی جهت استخراج total RNA به نسبت ۱ به ۱۰ در QIAzol Lysis Reagent هموزن گردید. به منظور برداشتن اجزای پروتئینی، محصول حاصل در ۴ درجه سانتی گراد، ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. سپس به نسبت ۱

جدول ۱- توالی پرایمر های مورد استفاده

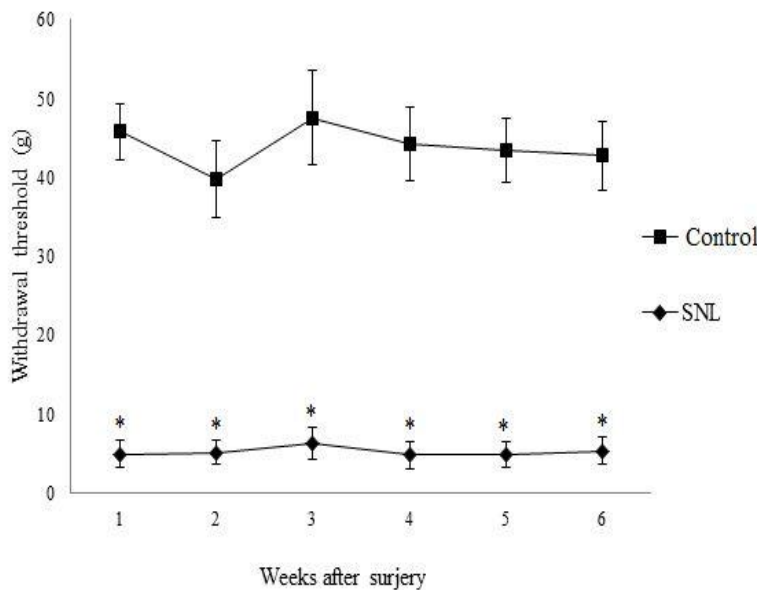
ژن	توالی پرایمر	کد ژنتیکی	منحنی ذوب دما (°C)
NT-4	5'-CTCGCCTGAAGACCCCTGCT-3'For: 5	NM_057200	۸۷/۵
	5'-CCTGGCTCTCTTCTGTTTCCC-3'Rev: 5		
GAPDH	5'-GACATGCCGCCTGGAGAAAC-3'For: 5	NM_017008	۸۲/۵۹
	5'-AGCCAGGATGCCCTTTAGT-3'Rev: 5		

تجزیه و تحلیل آماری

مفروضه های استفاده از آمار پارامتریک شامل طبیعی بودن توزیع داده ها و تجانس واریانس ها به ترتیب با استفاده از آزمون های کولموگروف اسمیرنوف (KS) و لوین مورد آزمون قرار گرفت. پس از احراز این مفروضه ها، جهت تعیین معنا داری تفاوت بین متغیر ها و تعامل آن ها از آزمون T، تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تحلیل واریانس با اندازه های تکراری و آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار های SPSS نسخه ۲۰ انجام و سطح معنی داری پنج صدم ($p < 0.05$) در نظر گرفته شد.

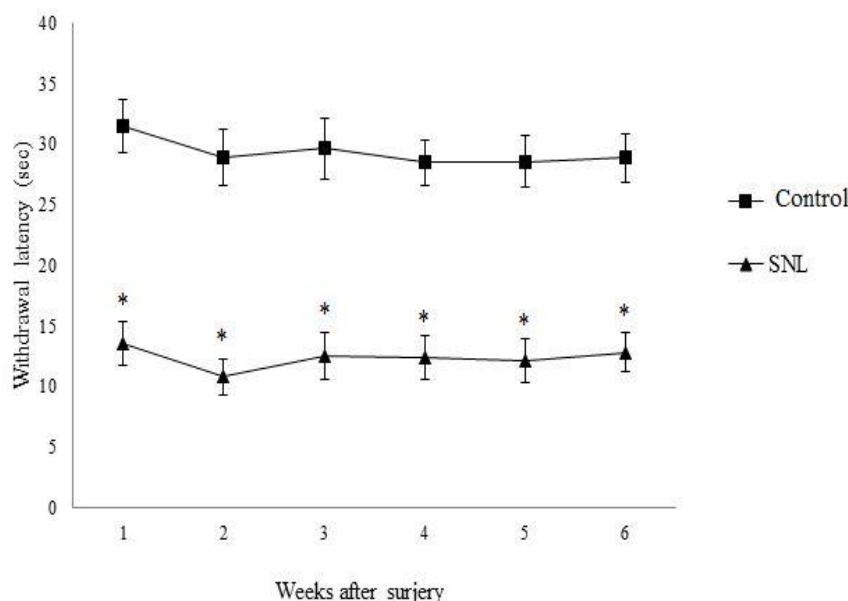
یافته های پژوهش

این مطالعه نشان داد که ۶ هفته لیگاتور بندی عصب نخاعی (SNL) موجب آلوداینیای مکانیکی (نمودار ۱) و پر دردی حرارتی (نمودار ۲) در موش های صحرائی گروه تجربی در مقایسه با گروه شاهد (C) می شود. هم چنین میزان بیان ژن NT-4 نیز در موش های صحرائی گروه SNL در مقایسه با گروه C بالاتر بود. در نمودار ۱ نشان داده شده است که در طول ۶ هفته پروتکل آزمایشی، SNL موجب کاهش آستانه درد در آزمون آلوداینیای مکانیکی در گروه تجربی در مقایسه با گروه شاهد شده است ($p \leq 0.05$).



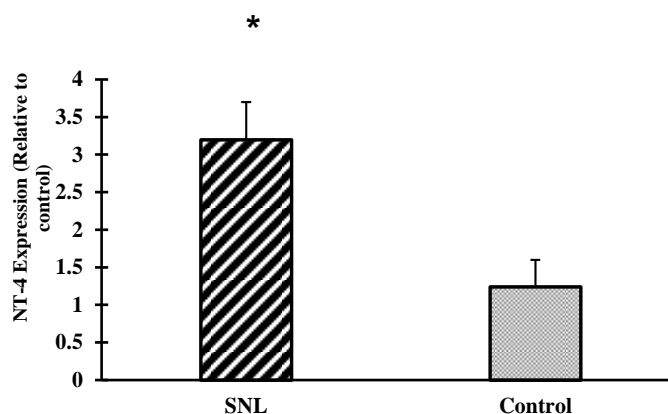
نمودار ۱- میزان درد نورو پاتیک به شکل آلوداینیای مکانیکی در دو گروه شاهد (C) و لیگاتور بندی عصب نخاعی (SNL) نشان داده شده است. آستانه درد مکانیکی در گروه SNL که به درد نورو پاتیک مبتلا هستند کم تر از گروه شاهد است. * اختلاف معنا دار گروه SNL نسبت به گروه شاهد را نشان می دهد ($p \leq 0.05$).

نمودار ۲ نیز نشان می دهد که در طول ۶ هفته پروتکل آزمایشی، SNL در آزمون پر دردی حرارتی موجب کاهش آستانه درد در گروه تجربی در مقایسه با گروه C شده است ($p \leq 0.05$).



نمودار ۲- میزان درد نورو پاتیک به شکل پر دردی حرارتی در دو گروه شاهد (C) و لیگاتور بندی عصب نخاعی (SNL) نشان داده شده است. آستانه درد حرارتی در گروه SNL که به درد نورو پاتیک مبتلا هستند کم تر از گروه شاهد است. * اختلاف معنادار نسبت به گروه شاهد را نشان می دهد ($p \leq 0.05$).

در پایان ۶ هفته، بیان ژن *NT-4* در گروه لیگاتوربندی (SNL) نسبت به گروه شاهد به طور معناداری افزایش یافته بود (نمودار ۳) ($p \leq 0.05$).



نمودار ۳- تغییرات بیان *NT-4* در دو گروه شاهد (C) و لیگاتوربندی عصب نخاعی (SNL) نمایش داده شده است. بیان ژن *NT-4* عضله نعلی در گروه SNL افزایش یافته است. * اختلاف معنادار نسبت به گروه شاهد را نشان می دهد ($p \leq 0.05$).

بحث و نتیجه گیری

دردی حرارتی در گروه تجربی می گردد. همسو با نتیجه تحقیق حاضر نشان داده شده است که سطوح پروتئینی *NT-4* در عضله دو سر بازویی بیماران مبتلا به اسکروزیس جانبی آمیو تروفیک (بیماری تخریب عصبی پیش رونده) افزایش داشته است (۱۸). هم چنین

در تحقیق حاضر کاهش فعالیت به شکل SNL موجب پر دردی حرارتی و مکانیکی شده که این با افزایش جبرانی بیان ژن *NT-4* همراه بود. هم چنین SNL موجب درد نورو پاتی به شکل آلوداینیا مکانیکی و پر

است افزایش بیان *NT-4 mRNA* سازوکار جبرانی جهت ترمیم عصب حرکتی آسیب دیده و هم چنین پیوند گاه عصبی عضلانی و حتی خود عضله اسکلتی باشد (۱۹). در تأیید این فرضیه، ساکوما و همکاران گزارش کردند که در طول بازیابی از آسیب عضلانی، سطوح *NT-4* عضلانی کاهش می یابد که احتمالاً به خاطر کاربرد آن در بازسازی و ارتقای ساختار عصبی عضلانی می باشد (۱۰). ممکن است افزایش بیان *NT-4* به دلیل حفظ و جلوگیری از کاهش تار های نوع کند و تبدیل به نوع سریع تر باشد زیرا شواهد نشان می دهند که کاهش فعالیت به شکل قطع عصب با تبدیل تار های عضلانی نوع آهسته به سریع همراه بوده که تزریق *NT-4* از کاهش تار های نوع کند جلوگیری کرده است (۲۱). بهبود و تسریع هایپر تروفی از دیگر اعمال احتمالی *NT-4* در عضله اسکلتی می باشد. سیمون و همکاران نشان دادند که درمان عصب سیاتیک آسیب دیده با *NT-4* موجب بازیابی سریع ساختار و عملکرد عضله نعلی می شود (۲۱). هم چنین تزریق درون سلولی *NT-4* موجب تسریع جوانه زنی در نورون های حرکتی و در نتیجه جلوگیری از آتروفی عضله اسکلتی می گردد (۱۹). از سوی دیگر، نتایج تأثیر فعالیت افزایش یافته به شکل تحریک الکتریکی، فعالیت بدنی و تمرینات ورزشی، بر سطوح *NT-4 mRNA* عضلانی تا حدی متناقض است. به عنوان مثال، فوناکوشی و همکاران نشان دادند که افزایش فعالیت به شکل تحریک الکتریکی موجب افزایش بیان *NT-4* در یک حالت وابسته به مقدار می گردد (۱۹). در مقابل محققان دیگری چنین ارتباطی را مشاهده نکردند. به طور مثال در مطالعه دشنز و همکاران کاهش فعالیت به شکل بی باری، تغییری در میزان بیان *NT-4* ایجاد نکرد (۲۲). واکر و همکاران نیز میزان بیان *NT-4* عضلانی مردان فعال و غیر فعال را بررسی و گزارش کردند که هیچ گونه تفاوتی میان آن ها وجود ندارد (۲۳). هم چنین اُگورن و همکاران گزارش کردند که تمرینات ورزشی تأثیری بر بیان *NT-4* در عضله نعلی ندارد (۲۴). به نظر می رسد استفاده از روش های دقیق تر اندازه گیری هم چون اندازه گیری سطوح پروتئین جهت روشن ساختن ارتباط میان

فوناکوشی و همکاران گزارش کردند که شش ساعت پس از قطع عصب سیاتیک بیان *NT-4* در عضله دو قلو افزایش ۲ برابری نسبت به حال کنترل دارد و سپس بعد از گذشت ۱۲ ساعت به میزان پایه خود تقلیل می یابد (۱۹). در مقابل، در مطالعه گریسبک و همکاران نشان داده شد که قطع عصب به مدت یک روز و ۲ هفته به ترتیب موجب کاهش ۴/۵ و ۱۱ برابری سطح بیان *NT-4* عضلانی شد. آن ها نتیجه گرفتند که بیان *NT-4* در عضله پس از آسیب عصب حرکتی مربوطه تنظیم کاهشی را نشان می دهد که این احتمالاً ناشی از فقدان فعالیت الکتریکی عصب حرکتی مربوطه است (۶). با این حال، یافته مطالعه حاضر در مقابل نتایج تحقیقات گریسبک و همکاران است که دلیل احتمالی آن ممکن است نوع آسیب عصبی متفاوت در دو مطالعه باشد به طوری که گریسبک و همکاران عصب حرکتی عضله مربوطه را کاملاً قطع (*Transected*) کرده بودند ولی عصب حرکتی در *SNL* تا حدی عملکرد فیزیولوژیک خود را بر عضلات مربوطه حفظ می کند. با این حال، الگوی بیان *NT-4 mRNA* پس از شرایطی همچون قطع عصب، مهار انتقال عصبی عضلانی و هم چنین تحریک الکتریکی نشان می دهد که سطح بیان *NT-4* در عضله اسکلتی به وسیله فعالیت عضله و عصب حرکتی آن کنترل می شود (۱۹). همسو با این توجیه، فوناکوشی و همکاران گزارش کردند که پس از فشار مکانیکی، کشش غیرفعال (*Passive stretching*) و تحریک الکتریکی افزایش معنی داری در سطوح *NT-4 mRNA* عضلانی مشاهده می گردد (۱۹). این درحالی است که در تحقیق حاضر کاهش فعالیت به شکل *SNL* سبب افزایش بیان سطوح *NT-4 mRNA* عضلات نعلی می گردد که این تضاد با نتایج مطالعات قبلی احتمالاً ناشی از روش آسیب عصبی متفاوت و در نتیجه میزان اختلال در نورون حرکتی بوده است زیرا در این تحقیق صرفاً عصب پنجم کمری بسته شد. درحالی که ۳۰ درصد عصب گیری عضله نعلی از عصب چهارم کمری دریافت می شود (۲۰) و این عضله هنوز حداقل ۷۰ درصد از فعالیت الکتریکی خود را از نورون حرکتی پنجم کمری دریافت می کند. از سوی دیگر ممکن

جلوگیری و مهار پیامد های منفی آن همانند آتروفی عضلات اسکلتی ضروری به نظر می رسد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از همکاری صمیمانه آزمایشگاه گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تقدیر و تشکر می شود.

References

1. Biering Sorensen B, Kristensen IB, Kjaer M, Biering F. Muscle after spinal cord injury. *Muscle Nerve* 2009; 40: 499-519.
2. Bogdanis, GC. Effects of physical activity and inactivity on muscle fatigue. *Front Physiol* 2012;3:142-56.
3. Bostock EL, Morse CI, Winwood K, Mcewan I, Onambele GL. Hypo activity induced skeletal muscle atrophy and potential nutritional interventions a review. *World J Transl Med* 2013 2:36-48.
4. Gomez A, Escobar ML. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Curr Top Behav Neurosci* 2013;117-36.
5. Hennigan A, Ocallaghan R, Kelly A. Neurotrophins and their receptors: roles in plasticity, neurodegeneration and neuroprotection. *Biochemical Society* 2007; 35: 424.
6. Griesbeck O, Parsadarian AS, Sendtner M, Thoenen H. Expression of neurotrophins in skeletal muscle: quantitative comparison and significance for motoneuron survival and maintenance of function. *J Neurosci Res* 1995; 42: 21-33.
7. Funakoshi H, Belluardo N, Arenas E, Yamamoto Y, Casabona A, Persson H. Muscle-derived neurotrophin-4 as an activity-dependent trophic signal for adult motor neurons. *Science* 1995;268:1495-9.
8. Ibanez, CF. Neurotrophin-4: the odd one out in the neurotrophin family. *Neurochem Res* 1996;21:787-93.
9. Belluardo N, Westerblad H, Mudo G, Casabona A, Bruton J, Caniglia G, et al. Neuromuscular junction disassembly and muscle fatigue in mice lacking

تغییرات در سطوح فعالیت و مقادیر NT-4 در عضلات اسکلتی بتواند موجب رفع این تناقض در تحقیقات گردد. مطالعه حاضر نشان داد که کاهش فعالیت به شکل SNL موجب افزایش جبرانی بیان NT-4 در عضله نعلی می گردد. با این حال سازوکار های دقیق این تأثیر و پیامد های فیزیولوژیک احتمالی آن به خوبی شناسایی نشده است. درک این ارتباط جهت

- neurotrophin-4. *Mol Cell Neurosci* 2001;18:56-67.
10. Sakuma K, Yamaguchi A. The recent understanding of the neurotrophins role in skeletal muscle adaptation. *J Biomed Biotechnol* 2011; 201696: 1-12.
11. Vanhecke O, Austin SK, Khan RA, Smith B, Torrance N. Neuropathic pain in the general population a systematic review of epidemiological studies. *pain* 2014; 155:654-62.
12. Perruchoud C, Buchser E, Johanek LM, Aminian K, Paraschiv A, Taylor RS. Assessment of physical activity of patients with chronic pain. *Neuromodulation* 2014; 17:42-7.
13. Vanberg RJ, Schasfoort FC, Vos LA, Bussmann JB, Stam HJ. Impact of chronic pain on everyday physical activity. *Eur J Pain* 2007; 11:587-93.
14. Warburton DE, Nicol CW, Bredin SS. Health benefits of physical activity: the evidence. *CMAJ*2006; 174: 801.
15. Baldwin KM, Haddad F. Skeletal muscle plasticity: cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. *Am J Phys Med Rehabil* 2002; 81:40-51.
16. Kim SH, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 1992; 50:355-63.
17. Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris JA. new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 1998;32:77-88.

18. Kust B, Copray J, Brouwer N, Troost D, Boddeke H. Elevated levels of neurotrophins in human biceps brachii tissue of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 2002;177: 419-27.
19. Funakoshi H, Frisen J, Barbany G, Timmusk T, Zachrisson O, Verge V. Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. *J Cell Biol* 1993;123: 455-65.
20. Greensmith L, Hind A, Vrbova G. Neonatal paralysis of the rat soleus muscle selectively affects motoneurons from more caudal segments of the spinal cord. *Brain Res Dev* 1997;98:281-6.
21. Simon M, Porter R, Brown R, Coulton GR, Terenghi G. Effect of NT-4 and BDNF delivery to damaged sciatic nerves on phenotypic recovery of fast and slow muscles fibres. *Eur J Neurosci* 2003; 18: 2460-6.
22. Deschenes MR, Wilson MH. Age related differences in synaptic plasticity following muscle unloading. *J Neurobiol* 2003; 57:246-56.
23. Walker UA, Schon EA. Neurotrophin-4 is up regulated in ragged red fibers associated with pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Ann Neurol* 1998; 43: 536-40.
24. Ogborn DI, Gardiner PF. Effects of exercise and muscle type on BDNF, NT-4/5 and TrKB expression in skeletal muscle. *Muscle Nerve* 2010; 41: 385-91.

Investigation of Spinal nerve Ligation Effect on Muscular Neurotrophin-4 Gene Expression in Male Wistar Rats

Pourranjbar M¹, Mehri S², Masoud R³, Kazemi A⁴

(Received: February 9, 2016

Accepted: August 17, 2016)

Abstract

Introduction: Motor neurons in spinal cord dictate the structural and contractile properties of muscles. Damage to motor neurons change muscles gene expression pattern. Given that Neurotrophin-4 (*NT-4*) is required for survival and normal function of muscle fibers, the aim of present study is investigation effect of Decreased activity model as Spinal Nerve Ligation on muscular *NT-4* gene expression.

Materials & methods: Ten adult male wistar rats in the weight range of 250±20 gr randomly were divided into two groups including healthy control (C), Spinal nerve ligation (SNL). Over the six weeks after SNL, neuropathic pain behavior tests were conducted continually in groups. In the end of Sixth weeks, change of *NT-4* gene expression in soleus muscle was measured with Real time technique.

Findings: Behavioral tests demonstrated that spinal nerve ligation induce thermal Hyperalgesia and mechanical Allodynia in the SNL group which decreased pain threshold seen in allover period of study ($P \leq 0.05$). Also, compared to the C group, *NT-4* gene expression in soleus muscle was higher in SNL group significantly ($P \leq 0.05$).

Discussion & conclusions: The present study demonstrated that decreased activity in the form of SNL is associated with increased *NT-4* gene expression in soleus muscle. However, the mechanisms and pathophysiologic issues of this increase are remaining elusive.

Keywords: Decreased activity, *NT-4* gene expression, Neuropathic pain, Soleus muscle

1. Dept of Physical Education, Neuroscience Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

2. Dept of Exercise physiology, Faculty of Literature and Humanities, Islamic Azad University, Kerman Branch, Kerman, Iran

3. Dept of Physical Education, Faculty of Literature and Humanities, Lorestan University, Khoramabad, Iran

4. Dept of Physical Education, Faculty of Literature and Humanities, Vali-E-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran

*Corresponding author Email: a.kazemi@vru.ac.ir