

بررسی تأثیر لیگاتور بندی عصب نخاعی بر بیان ژن نورو تروفین-4 عضلانی در موش های صحرایی ویستان نر

محمد پورنجبی^۱، سمانه مهری^۲، مسعود رحمتی^۳، عبدالرضا کاظمی*

- (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، شهر 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 دیگته می کنند. آسیب به نورون های حرکتی موجب تغییر الگوی بیان ژن در عضلات می گردد. با توجه به این که نورو تروفین-4 (NT-4) جهت حیات و علمکرد 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 موس صحرایی نر نژاد ویستان 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 RT-PCR اندازه گیری شد.

یافته های پژوهش: آزمون های رفتاری نشان دادند که SNL موجب آلودگی 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 بالاتر 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 پیامدهای 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

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 نوروباتی 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 فیزیو لوزیکی 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 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 ۲۵.۰ ± ۲.۰ گرم انجام گرفت. جهت آشنایی با محیط حیوان خانه، حیوانات پس از خریداری از انسستیتو پاستور در شرایط دمایی ۲۲ ± ۴ درجه سانتی گراد و تحت چرخه $۱۲:۱۲$ ساعت تاریکی- روشنایی در آزمایشگاه حیوانات

صدمات به نورون های حرکتی واقع در طناب نخاعی، تغییرات انقباضی و مورفو لوزیک 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 درپی دارند (۱). این تغییرات پاتو فیزیو لوزیک مشاهده شده در عضلات کاملاً مشابه وضعیتی است کم حرکتی، بی تحرکی، بی باری در اثر فضا نورده، 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 Brain Derived رشد عصبی مشتق شده از مغز (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 نوترووفینی دخیل هستند (۶). جدای از عملکرد فیزیولوزیک آن ها در بافت های عصبی، نورو تورفین 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 آن به mRNA 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

صورت که حیوانات پس از انتقال به آزمایشگاه رفتار درد، بدون اجرای واقعی آزمایش، به مدت ۲۰-۳۰ دقیقه در محیط اصلی آزمایش قرار می‌گرفتند. سرانجام به منظور ثبت اولیه میزان رفتارهای درد، پس از اجرای اولیه آزمون‌ها، عملیات لیگاتور بندی انجام شد. هر هفته پس از لیگاتور بندی، با اجرای مجدد آزمون‌های 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 آزمون‌های رفتاری به منظور تأیید وجود درد نورو پاتیک در آزمودنی‌ها 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 20×20 و ارتفاع ۳۰ سانتی متر قرار می‌گرفت. جهت عادت کردن حیوانات به محیط جدید، ۳۰ دقیقه قبل از آزمایش، درون محفظه شفاف و بر روی صفحه شبک قرار گرفتند. به منظور سنجش آلودینیای مکانیکی، از تارهای مختلف Von Ferry در محدوده ۲ تا ۶۰ گرم ($60, 26, 15, 8, 4$) ساخت شرکت Stolting, 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 تارهای با وزن بالاتر استفاده گردید. چنان‌چه ۲ بار متوالی، پاسخ (بلند کردن پا توسط حیوان) مشاهده می‌گردید، همان وزنه به عنوان آستانه پس کشیدن پنجه (PWT) ثبت می‌شد و آزمون خاتمه می‌یافت. چنان‌چه حیوان به هیچ یک از تارهای از جمله تار شماره ۶۰ نیز پاسخ نمی‌داد، عدد ۶۰ به عنوان آستانه پاسخ در نظر گرفته می‌شد. هم‌چنین، هر آزمایش ۳ بار و به تناوب حداقل ۳ دقیقه تکرار می‌شد و میانگین آن‌ها به عنوان آستانه پس کشیدن پنجه منظور می‌گردید. پر دردی 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 Bassil, Italy) حیوانات در سه اتاق از جنس پلکسی گلاس (طول و عرض ۲۲ و ارتفاع ۳۰ سانتی متر) و بر روی

دانشگاه تربیت مدرس نگهداری و با غذای مخصوص و آب تغذیه شدند. قبل از شروع پروتکل، رت‌ها بر اساس همسان‌سازی 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 می‌شد. در سراسر دوره پژوهش موش‌ها توسط دو نفر نیز جابه‌جا 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 سازوکارهای درد نورو پاتیک و تأثیر داروهای رفتارهای مرتبط با درد مورد استفاده قرار می‌گیرد. جهت ایجاد مدل SNL، ابتدا رت‌ها با سدیم پتو باریتول (۶۰ میلی گرم در هر کیلو گرم به صورت درون صفاقی) بیهوده شده و سپس عصب پنجم کمری نخاعی آن‌ها بر اساس روش کیم و چانگ به طور محکم گره زده شد (۱۶). به طور خلاصه دراین روش، پس از اطمینان از بیهودی حیوان عضلات بین مهره‌ای در سطح مهره چهارم کمری و دوم خاجی جدا شده و زائد عرضی مهره ششم کمری برداشته شد. عصب پنجم کمری سمت چپ نخاع مشخص و با ظرافت از اعصاب مجاور جدا می‌گردید. عصب پنجم کمری به طور محکم با استفاده از نخ مخصوص Thread silk، دقیقاً در انتهای دیستال جهت اطمینان از ایجاد اختلال در تمام فیبر‌ها گره زده شد. هم‌چنین، جهت اجتناب از آسیب به عصب چهارم کمری، دقت بالایی مبذول شد. تنها حیواناتی در ادامه آزمایش لحاظ شدند که درد نوروپاتی را در آزمون‌های 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 $4/0$ سیلک بخیه زده شد و سپس آزمون‌های رفتاری انجام شد.

آزمون‌های رفتاری: به منظور سازگاری جهت آزمایش‌های 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

به ۵/۰ با کلروفرم مخلوط و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. محصول در ۴ درجه سانتی گراد، ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ و بخش معدنی و آبی از هم جدا شدند. بخش محتوى RNA برداشته و با نسبت ۱ به ۵/۰ 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 سانتریفیوژ شد. Pellet حاوی RNA در اتانول شستشو و در ۲۰ میکر 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 تعريف گردید. ستز cDNA با ۱ میکرو گرم از RNA و با استفاده از Random Mmulv Reverse hexamer primer transcriptase انجام گرفت. اندازه گیری سطوح بیان mRNA از روش کمی Real time-PCR با Primix syber green II استفاده از (USA Applied Biosystems) 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 (Macrogen Inc., NBCI و توسط شرکت ماکروژن 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 جایه جایی منبع متحرک تابش نور حرارتی، بخش میانی کف پای حیوان از میان سطح پلکسی گلاس در معرض تششعش 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 حداقل اثر ممکن (Maximum Possible Effect) با استفاده از فرمول زیر محاسبه می گردید: ((تأخر پایه - زمان Cut Off) / (تأخر پایه - تأخیر پس از لیگاتور بندی عصب نخاعی) × ۱۰۰). هم چنین میانگین سه اندازه گیری اولیه به عنوان تأخیر پایه در نظر گرفته شد.

استخراج نمونه: پس از پایان دوره ۶ هفتة، موش های صحرابی توسط تزریق درون صفاقی کتابمین (90 mg/kg) و زیالازین (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 QIAzol Lysis total RNA به نسبت ۱ به ۱۰ در Reagent هموژن گردید. به منظور برداشتن اجزای پروتئینی، محصول حاصل در ۴ درجه سانتی گراد، ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. سپس به نسبت ۱

جدول ۱- توالی پرایمر های مورد استفاده

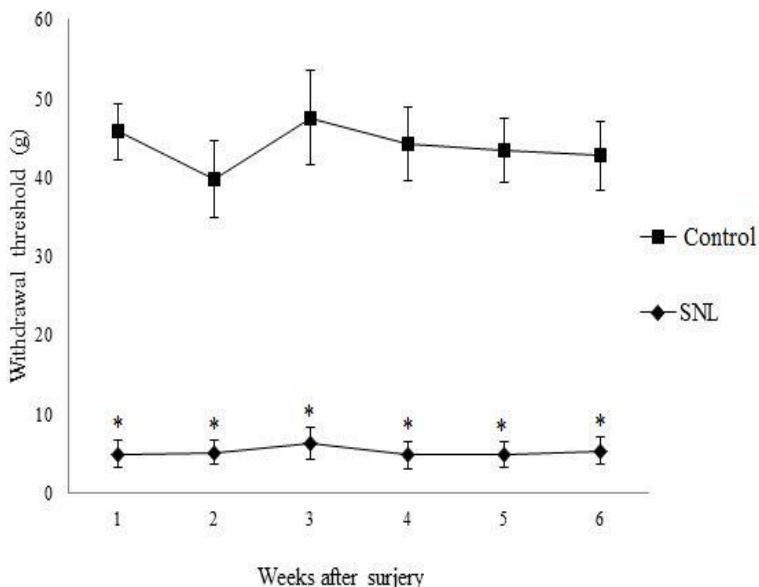
منحنی ذوب دما (C)	کد ژنتیکی	توالی پرایمر	ژن
۸۷/۵	NM_057200	' CTCGCCCTGAAGACCCCTGCT -3'For: 5 ' CCTGGCTCTCTTCTTGTTCCCC -3'Rev: 5	NT-4
۸۲/۵۹	NM_017008	'- GACATGCCGCCTGGAGAAC -3'For: 5 '- AGCCCAGGATGCCCTTAGT -3'Rev: 5	GAPDH

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 صحرایی گروه تجربی در مقایسه با گروه شاهد (C) می شود. هم چنین میزان بیان ژن NT-4 نیز در موش های صحرایی گروه SNL در مقایسه با گروه C بالاتر بود. در نمودار ۱ نشان داده شده است که در طول ۶ هفته پرتوکل آزمایشی، SNL موجب کاهش آستانه درد در آزمون آلوداینیای مکانیکی در گروه تجربی در مقایسه با گروه شاهد شده است ($p \leq 0.05$).

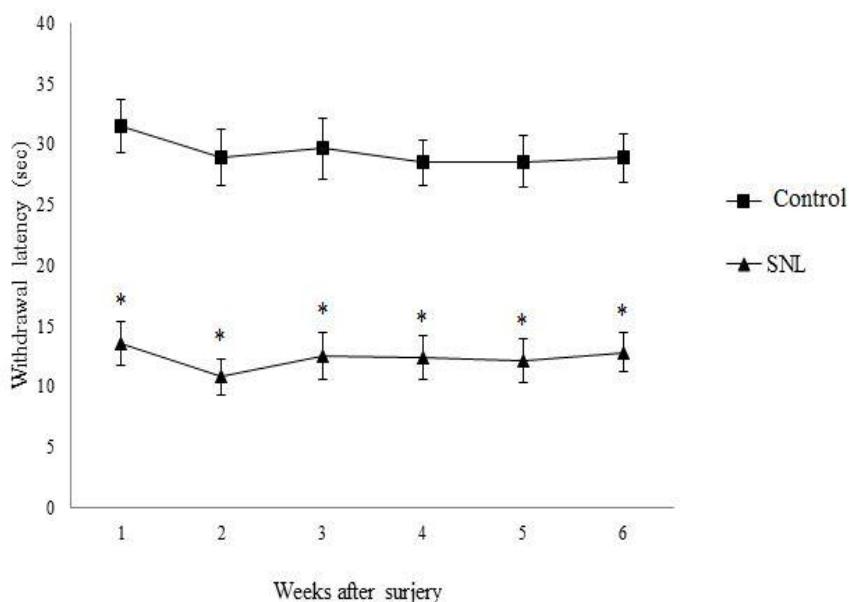
تجزیه و تحلیل آماری

مفهومه های استفاده از آمار پارامتریک شامل طبیعی بودن توزیع داده ها و تجانس واریانس ها به ترتیب با استفاده از آزمون های کولمو گروف اسپیرنوف (KS) و لوین مورد آزمون قرار گرفت. پس از احراز این مفهومه 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 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.



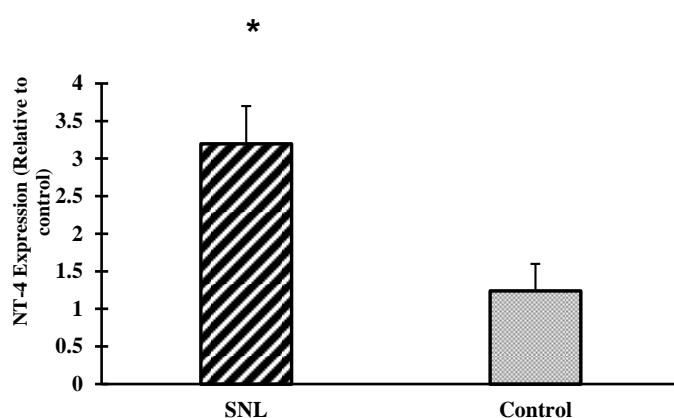
نمودار ۱- میزان درد نورو پاتیک به شکل آلوداینیای مکانیکی در دو گروه شاهد (C) و لیگاتور بندی عصب نخاعی (SNL) نشان داده شده است. آستانه درد مکانیکی در گروه SNL که به درد نورو پاتیک مبتلا هستند کم تر از گروه شاهد است. * اختلاف معنادار گروه SNL نسبت به گروه شاهد را نشان می دهد ($p \leq 0.05$).

نمودار ۲ نیز نشان می دهد که در طول ۶ هفته پرتوکل 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 لیگاتور بندی (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 لیگاتور بندی 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 ($p \leq 0.05$).

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 اسکلروزیس جانبی آمیو تروفیک (بیماری تخریب عصبی پیش رونده) افزایش داشته است (۱۸). هم چنین

بحث و نتیجه گیری

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 پاتیک به شکل آلداینیا 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 تارهای نوع کند و تبدیل به نوع سریع تر باشد زیرا شواهد نشان می دهند که کاهش فعالیت به شکل قطع عصب با تبدیل تارهای عضلانی نوع آهسته به سریع همراه بوده که تزریق *NT-4* از کاهش تارهای نوع کند جلوگیری کرده است (۲۱). بهبود و تسريع هایپرتروفی 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 تسريع جوانهزنی 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 تمرينات 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 *NT-4* بیان نیز ایجاد نکرد (۲۲). واکر و همکاران نیز میزان بیان *NT-4 mRNA* عضلانی مردان فعل و غیر فعل را بررسی و گزارش کردند که هیچ گونه تفاوتی میان آنها وجود ندارد (۲۳). هم چنین اگبورن و همکاران گزارش کردند که تمرينات 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 روش ساختن ارتباط میان

فوکانوشی 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 فیزیو لوژیک 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، فوکانوشی 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 تشريح 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, O'Callaghan R, Kelly A. Neurotrophins and their receptors: roles in plasticity, neurodegeneration and neuroprotection. *Biochemical Society* 2007; 35: 424.
6. Griesbeck O, Parsadanian 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 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.

تغییرات در سطوح فعالیت و مقادیر NT-4 در عضلات اسکلتی بتواند موجب رفع این تنافص 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

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, Timmus 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 motoneurones 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, Khorramabad, 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