Jundishapur
Journal of Medical Sciences

March and April 2022. Volume 21. Number 1

Research Paper

Effect of Detraining Type on Telomere Length and TRF1& TRF2 Gene Expression of Skeletal Muscle in C57BL/6 Male Mice

Mostafa Khodadoost[1], *Saeed Shakeryan[1], Sareh Arjmand[2], Masood Nikbakht[1]

1. Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
2. Protein Research Center, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Khodadoost M, Shakeryan S, Arjmand S, Nikbakht M. [Effect of Detraining Type on Telomere Length and TRF1& TRF2 Gene Expression of Skeletal Muscle in C57BL/6 Male Mice (Persian)]. Jundishapur Journal of Medical Sciences. 2022; 21(1):92-107. https://doi.org/10.32598/JSMJ.21.1.2719

https://doi.org/10.32598/JSMJ.21.1.2719

CC BY NC

Received: 16 Nov 2021
Accepted: 22 Jan 2022
Available Online: 01 Mar 2022

Keywords:
Detraining, Skeletal muscle, Telomere Length, TRF2 , TRF2

ABSTRACT

Background and Objectives This study aims to investigate the effect of detraining on the telomere length in skeletal muscles of male mice.

Subjects and Methods The samples were 24 C57BL/6 male mice that were randomly divided into four groups: Base control (n=6), control (n=6), low-intensity training (n=6), and high-intensity training (n=6). The training program was performed for 8 weeks, 5 days per week following 4 weeks of detraining. The factors were measured after DNA and RNA extraction using real time polymerase chain reaction method. The data were analyzed using two-way ANOVA.

Results The main effects of muscle type (slow-twitch and fast-twitch) (P=0.825) and detraining type (P=0.062) and their interaction effect (P=0.408) on the expression of TRF1 gene was not significant. The main effects of muscle type (P=0.073) and detraining type (P=0.309) and their interaction effect (P=0.093) on the expression of TRF2 gene was not significant, either. The main effects of muscle type (P=0.763) and detraining type (P=0.053) and their interaction effect (P=0.651) on the telomere length was not significant, either.

Conclusion Detraining after high-intensity or low-intensity training affects the telomere length of slow-twitch and fast-twitch muscles equally. It seems that detraining in people with a history of exercise with different intensities has no different effect on skeletal muscles.

**** Corresponding Author:***
Saeed Shakeryan
Address: Department of Sport Physiology, Faculty of Sport Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
Tel: +98 (916) 3143363
E-Mail: sashakeryan@gmail.com

Jundishapur
Journal of Medical Sciences

Extended Abstract

Introduction

Skeletal muscle is a post-mitotic tissue that is composed of multinucleated myofibers (cells), the elements that arise from the fusion of mononuclear myoblasts during development [3]. There is a special structure inside the nucleus at the end of the chromosomes that is called telomere [4]. During cell proliferation, telomeres are shortened and cause irreversible cell cycle arrest [5]. Previous studies have reported the relationship between telomere length and environmental factors, psychological pressures in life, lifestyle changes (such as exercise, diet, body mass), socio-economic status, and smoking. Inactivity or reduced load causes loss of muscle mass [9]. The decrease in muscle mass and subsequent decrease in muscle strength and performance can lead to a decrease in quality of life and life expectancy [11]. The benefits of regular exercise can be lost by its discontinuation, which is called detraining. Detraining is the partial or complete loss of adaptations caused by training in response to insufficient training stimuli [12].

Previous studies have had contradictory results. Considering that the role of atrophy and the reduced number of fibers in the total muscle atrophy is still a controversial issue, no clear answer has been given to the questions: what is the effect of detraining on the telomere system? Is the behavior of the telomere system different after different exercises? Is there a difference between fast-twitch and slow-twitch muscle tissues in terms of the effect of detraining on the telomere system?

Methods

The is an experimental study. The samples were 24 C57BL/6 mice that were purchased from the Laboratory Animal Breeding Center of Ahvaz Jundishapour University of Medical Sciences in Ahvaz, Iran and kept in the laboratory animal center of Abadan University of Medical Sciences in an environment with a temperature of 22 ±2°C, a relative humidity of 30-70% and a 12-hour light-dark cycle. The mice were equally divided into four different groups. Mice from the base control group were dissected at the beginning of the study (n=6). Therefore, the remaining 18 mice were divided into three sedentary groups of high-intensity interval training (n=6), low-intensity interval training (n=6), and main control (n=6). The training intervention was done for eight weeks, 5 days per week. Four weeks after intervention and at the end of the detraining period, all procedures of dissection, tissue removing and tissue analysis were performed on the remaining mice from each group to evaluate the effect of detraining. After preparing the tissue and removing the extensor digitorum longus (EDL) muscle as a fast-twitch muscle and the soleus (SOL) muscle as a slow-twitch muscle, RNA extraction, complementary DNA synthesis, and gene expression measurement were carried out using the real-time polymerase chain reaction (PCR) method. The data were analyzed using the analysis of variance (ANOVA).

Results

There was no significant difference in the expression level of TRF1 gene between slow-twitch (SOL) and fast-twitch (EDL) muscles at the beginning of the study in the base control group and after 12 weeks in the main control group. The data obtained from real-time PCR showed that the interaction effect of detraining type and muscle type on the TRF1 gene expression level was not significant (F=0.931, P=0.408), indicating that, after 8 weeks of training and following 4 weeks of detraining, TRF1 gene expression level did not change significantly in any muscles. No significant difference was observed in the expression level of TRF2 gene between SOL and EDL muscles neither in the base control group at the beginning of the study nor in the main control group after 12 weeks. Also, the data obtained from real-time PCR showed that the interaction effect of detraining type and muscle type on TRF2 gene expression (F=0.093, P=0.912) and telomere length (F=0.438, P=0.651) was not significant, either. Therefore, detraining had no effect on the increase in telomere length in any muscles. However, it seems that it prevented from the reduction of telomere length or erosion in muscle tissue.

Discussion

The results of the present study showed that, regardless of the possible effects of training on the telomere in skeletal muscle tissue, no significant changes was observed in the telomere length after training and detraining. The comparison of two types of slow-twitch and fast-twitch muscle tissues also confirmed this result. Therefore, even though different types and intensities of training may improve the telomere system, a long period of detraining may cause the loss of possible adaptations. Overall, it seems that training can at least maintain the telomere length and prevent its erosion after a period of detraining.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

Permission related to ethical issues regarding working with laboratory animals was received from the ethics committee of Jundishapur University of Ahvaz under the code of ethical identifier EE/98.24.3.26525/scu.ac.ir.

Funding

This article is taken from Mustafa Khodadoost's PhD thesis in the Department of Sports Physiology, Faculty of Sports Sciences, Shahid Chamran University, Ahvaz. Shahid Chamran University of Ahvaz has provided all financial resources for the implementation of the research.

Authors' contributions

All authors contributed equally in preparing all parts of the research.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest

Acknowledgements

We would like to express our gratitude and appreciation to the respected staff of the Faculty of Sports Sciences of Shahid Chamran University of Ahvaz and also to the respected staff of Abadan University of Medical Sciences.

مجله علمی پزشکی
جندی شاپور
فروردین و اردیبهشت ۱۴۰۱. دوره ۲۱. شماره ۱

مقاله پژوهشی

اثر انواع بی‌تحرکی بر طول تلومر و بیان ژن‌های TRF1 و TRF2 عضلات اسکلتی موش‌های نر نژاد C57BL/6

مصطفی خدادوست[۱]، *سعید شاکریان[۱] ، ساره ارجمند[۲]، مسعود نیکبخت[۱]

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
۲. مرکز تحقیقات پروتئین، دانشگاه شهید بهشتی تهران، تهران، ایران.

Use your device to scan and read the article online

Citation Khodadoost M, Shakeryan S, Arjmand S, Nikbakht M. [Effect of Detraining Type on Telomere Length and TRF1& TRF2 Gene Expression of Skeletal Muscle in C57BL/6 Male Mice (Persian)]. Jundishapur Journal of Medical Sciences. 2022; 21(1):92-107. https://doi.org/10.32598/JSMJ.21.1.2719

https://doi.org/10.32598/JSMJ.21.1.2719

تاریخ دریافت: ۲۵ آبان ۱۴۰۰
تاریخ پذیرش: ۰۲ بهمن ۱۴۰۰
تاریخ انتشار: ۰۱ فروردین ۱۴۰۱

چکیده

زمینه و هدف هدف از انجام این تحقیق، بررسی اثر انواع بی‌تحرکی بر سیستم تلومری عضلات اسکلتی موش بود.

روش بررسی ۲۴ سر موش نر نژاد C57BL/6 به‌صورت تصادفی به ۴ گروه کنترل پایه (n=۶)، کنترل (n=۶)، HIIT (n=۶) و LIIT (n=۶) تقسیم شدند. گروه‌های تمرینی پروتکل‌ها را ۵ جلسه در هفته به مدت ۸ هفته اجرا کردند و سپس به مدت ۴ هفته در شرایط بی‌تحرکی نگهداری شدند. اندازه‌گیری با استفاده از روش Real time-PCR صورت گرفت و داده‌های با استفاده از روش تحلیل واریانس دوراهه ارزیابی شدند.

یافته‌ها بین میزان بیان ژنTRF1 عضلات کندانقباض و تندانقباض (P=۰/۸۲۵)، نوع بی‌تحرکی (P=۰/۰۶۲) و نیز اثر متقابل نوع عضله و نوع بی‌تحرکی (P=۰/۴۰۸) تفاوت معناداری مشاهده نشد. بین میزان بیان ژن TRF2 عضلات کندانقباض و تندانقباض (P=۰/۰۷۳)، نوع بی‌تحرکی (P=۰/۳۰۹) و نیز اثر متقابل نوع عضله و نوع بی‌تحرکی (P=۰/۰۹۳) تفاوت معناداری مشاهده نشد. براین‌اساس درمجموع، بین میزان طول تلومر عضلات کندانقباض و تندانقباض (P=۰/۷۶۳)، نوع بی‌تحرکی (P=۰/۰۵۳) و نیز اثر متقابل نوع عضله و نوع بی‌تحرکی (P=۰/۶۵۱) تفاوت معناداری مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری اِعمال انواع بی‌تحرکی اعم از بی‌تحرکی متعاقب تمرینات پرشدت و کم‌شدت به‌طور یکسان بر سیستم تلومری در عضلات اسکلتی در هر دو نوع عضله اثرگذار است. به نظر می‌رسد اثر بی‌تحرکی در افراد برخوردار از پیشینه تمرینات ورزشی با شدت‌های مختلف، بر نوع بافت عضله اسکلتی اثر متفاوتی ایجاد نمی‌کند.

کلیدواژه‌ها:
بی‌تحرکی، عضلات اسکلتی، طول تلومر، TRF1، TRF2

* **نویسنده مسئول:**
سعید شاکریان
نشانی: اهواز، دانشگاه شهید چمران، دانشکده علوم ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی.
تلفن: ۳۱۴۳۳۶۳ (۹۱۶) ۹۸+
رایانامه: sashakeryan@gmail.com

مقدمه

عضله اسکلتی برای حرکت، تعادل، مصرف اکسیژن و نیز حفظ متابولیسم ضروری است و ۴۰ الی ۵۰ درصد از توده بدن ما را تشکیل می‌دهد [۱]. تباه شدن بافت عضلانی می‌تواند به ضعف و سستی، کاهش کیفیت زندگی و افزایش شیوع بیماری و مرگ‌ومیر منجر شود [۲]. عضله اسکلتی، بافتی پس میتوزی است که از تارهای عضلانی (سلول‌ها) چندهسته‌ای یعنی عناصری که در خلال تکامل خود، از همجوشی میوبلاست‌های تک‌هسته‌ای به وجود می‌آیند، تشکیل شده است [۳]. درون هسته و در انتهای کروموزوم‌ها ساختار ویژه‌ای به نام تلومر قرار دارد. تلومر در انسان از ۲ الی ۲۰ هزار بار تکرارهای دو رشته‌ای TTAGGG تشکیل شده است که در یک برآمدگی تک‌رشته‌ای از ۵۰ تا ۵۰۰ نوکلئوتیدی نمایان می‌شود [۴]. تلومرها عناصر کروموزومی ضروری هستند که رونویسی کافی و حفاظت از انتهای کروموزوم را تضمین و نقشی اساسی در ثبات ژنوم ایفا می‌کنند [۵]. هنگام تکثیر سلولی، تلومرها کوتاه‌تر شده و به توقف برگشت‌ناپذیر رشد منجر می‌شود. فرایندی که به آن پیری تکثیرشونده[1] گفته می‌شود [۵]. دسترسی به تلومرها با چندین عامل تنظیم می‌شود که شامل تانکیراز ۱[2] و نیز مجموعه شلترین[3] است که کلاهک تلومری DNA را به وجود می‌آورد. ازجمله عوامل مربوط به این مجموعه می‌توان به عامل تکرار اتصال تلومری ۱ و ۲[4] اشاره کرد. اولین پروتئین کشف‌شده در این مجموعه TRF1 بود. این پروتئین با رونویسی تلومر، حفاظت از تلومر، حفظ طول تلومر به‌وسیله توقف فعالیت آنزیم تلومراز و تجزیه تلومرهای خواهر مرتبط است. درحالی‌که TRF2 مربوط به حفظ تلومر است [۶].

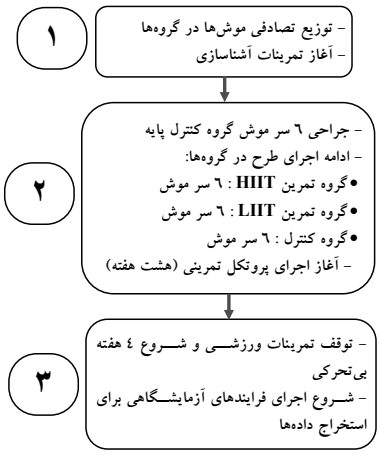
کوتاه شدن طول تلومر با افزایش بروز برخی از بیماری‌های مزمن و کاهش طول عمر همراه است و با عوامل متعددی ازجمله مصرف سیگار، چاقی، رژیم غذایی ناسالم، شرایط افزایش‌دهنده استرس اکسایشی و التهاب مرتبط است. باور کلی بر این است که طول تلومر را می‌توان به‌عنوان نشانگر سن زیستی سلول درنظر گرفت که قادر به پیش‌بینی شیوع بیماری و مرگ‌ومیر است [۷]. در سال‌های ابتدایی زندگی اثر توارث بر طول تلومر، اثری قوی است و احتمالاً با افزایش طول عمر، این اثر کاهش پیدا می‌کند [۸].

مطالعات قبلی ارتباط بین عوامل مؤثر محیطی و عوامل مربوط به سبک زندگی ازجمله فشارهای روانی، تغییرات کلی سبک زندگی مانند ورزش و فشارهای روانی، رژیم، توده بدنی، وضعیت اقتصادی‌اجتماعی و مصرف سیگار با طول تلومر را تشریح کردند [۹]. علاوه‌براین، موضوع تلومر در تحقیقات مختلف در بافت‌های متفاوتی سنجش و ارزیابی شده است که ازجمله آن‌ها می‌توان به لکوسیت‌ها، عضله اسکلتی، عضله قلبی، سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی[5] و غیره اشاره کرد.

مطالعات انسانی و حیوانی موجود تاکنون نشان دادند فرسایش تلومر در عضله اسکلتی در خلال زندگی پس از بلوغ ممکن است به‌وسیله دو عامل اصلی احتمالاً مرتبط به‌هم و غیرژنتیکی تعدیل شود: تغییر تعادل اکسیداسیون و احیا و سبک زندگی فعال/غیرفعال [۱۰]. بی‌تحرکی یا کاهش بار، سبب از دست رفتن توده عضلانی خواهد شد. کاهش توده عضلانی و متعاقب آن کاهش قدرت و عملکرد عضله به کاهش کیفیت زندگی و امید به زندگی خواهد منجر شد [۱۱]. بهره‌مندی از فوائد حاصل از تمرینات ورزشی منظم با قطع آن از بین خواهد رفتکه به آن بی‌تمرینی گفته می‌شود. درواقع بی‌تمرینی از بین رفتن تمام یا بخشی از سازگاری‌های مربوط به تمرینات ورزشی در پاسخ به محرک‌های ناکافی تمرینی است [۱۲]. هرچند در خصوص نقش آن بر سیستم تلومر بررسی‌های چندانی یافت نمی‌شود، اندک تحقیقات انجام‌شده نشان داده است که فرایند بی‌تمرینی اثری بر فعالیت آنزیم تلومراز و میزان پروتئین P۵۳ نداشته است [۱۳].

بررسی مطالعات پیشین تناقضات آشکاری را در نتایج تحقیقات مختلف نشان می‌دهد. باتوجه‌به اینکه سهم آتروفی و کاهش تعداد تار در کل آتروفی عضلانی به‌عنوان موضوعی بحث برانگیز باقی مانده است، به‌علت تفاوت‌های روش‌شناختی و فیزیولوژیکی پاسخ روشنی به این ابهامات داده نشده است. اغلب مطالعات موجود نشان می‌دهد که در مقایسه با سبک زندگی غیرفعال، افزایش فعالیت جسمانی دارای رابطه مثبت با افزایش طول تلومر در لکوسیت‌ها و عضله اسکلتی است. باوجوداین، نتایج متناقضی گزارش شده است و این اختلافات به‌طور بالقوه‌ای ناشی از اجرای پروتکل‌های ورزشی مختلف (مانند مدت و شدت فعالیت‌های جسمانی) است [۱۰]. برخی محققین در بررسی‌های خود نشان دادند سطوح بالای فعالیت جسمانی و ورزش با کاهش کوتاه شدن طول تلومر در افراد مختلف به‌ویژه افراد سالمند ارتباط دارد [۱۶-۱۴]. درحالی‌که برخی دیگر نشان دادند در ابتدا تمرینات ورزشی حاد ممکن است به از دست رفتن طول تلومر عضله اسکلتی منجر شود [۱۷]. از طرفی مشخص شده است انجام تمرینات طولانی‌مدت ارتباطی با کوتاه شدن طول تلومر سلول‌های عضله اسکلتی ندارد [۱۸]، درحالی‌که برخی گزارش دادند کوتاه شدن طول تلومر این سلول‌ها با انجام تمرینات ورزشی طولانی‌مدت مرتبط است [۱۷]. به‌علاوه، آشکار شده است که در عضله اسکلتی سن تقویمی هم تأثیری بر پیری سلولی ندارد [۱۹].

1. Reproductive aging
2. Tankyrase1
3. Shelterin
4. Telomere Repeat binding Factor 1 & 2 (TRF1 / TRF2)
5. Peripheral Bood Mononuclear Cell (PBMC)



تصویر ۱. فرایند کلی اجرای تحقیق

مجله علمی پزشکی
جندی شاپور

درمجموع، با عنایت به موارد مذکور، تاکنون پاسخ روشنی به این سؤالات داده نشده است که اثر بی‌تحرکی بر سیستم تلومری چگونه است؟ آیا متعاقب تمرینات ورزشی مختلف، رفتار سیستم تلومری متفاوت است یا خیر؟ آیا بین سلول‌های عضلات تندانقباض و کندانقباض ازنظر تأثیرپذیری سیستم تلومری از بی‌تحرکی تفاوتی وجود دارد؟

روش بررسی

شرکت‌کنندگان

تحقیق حاضر ازنظر هدف در انواع تحقیقات کاربردی و توسعه‌ای و باتوجه‌به ماهیت و روش اجرای آن در زمره تحقیقات آزمایشگاهی و تجربی است. نمونه‌های این پژوهش را ۲۴ سر موش‌های نژاد C57BL/6 که از مرکز تکثیر حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه جندی شاپور اهواز خریداری شدند تشکیل دادند. موش‌ها در گروه‌های مختلف به شکل مساوی تقسیم شدند و فرایند تحقیقاتی بر روی آن‌ها آغاز شد (تصویر شماره ۱).

نمونه‌های این پژوهش در مرکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم‌پزشکی آبادان نگهداری شدند. نمونه‌ها در ۴ قفس مجزا نگهداری شدند. موش‌های مربوط به گروه کنترل پایه در آغاز فرایند تحقیق تشریح شدند (n=۶). بنابراین، ۱۸ سر موش باقی‌مانده در ۳ گروه بی‌تحرک متعاقب تمرینات تناوبی با شدت بالا[6] (n=۶)، گروه بی‌تحرک متعاقب تمرینی تناوبی کم شدت[7] (n=۶)، و گروه کنترل (n=۶) جهت مطالعه حاضر بررسی شدند. در فرایند اجرای تحقیق، ۱ سر موش به‌علت عدم توانایی در اجرای پروتکل تمرینی در هفته‌های پایانی از گروه‌ها حذف شد و ۲ سر موش تا انتهای پروتکل تمرینی زنده نماندند. بنابراین فرایند بررسی متغیرهای پژوهش بر روی موش‌های باقی‌مانده انجام شد (n=۱۵).

طرح تحقیق

موش‌ها پس از انتقال به مرکز نگهداری حیوانات برای سازگاری با محیط مرکز به مدت ۳ روز در محیطی با دمای ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۳۰ تا ۷۰ درصد و چرخه تاریکی به روشنایی ۱۲:۱۲ ساعت نگهداری شدند. پس از وزن‌کشی (جدول شماره ۱)، همه گروه‌ها تمرینات آشناسازی را بر روی تردمیل مخصوص جوندگان با سرعت ۶ متر در دقیقه به مدت ۸ دقیقه، اجرا کردند و هر جلسه ۱ دقیقه به زمان تمرین آنان اضافه شد [۲۰]. در انتهای هفته، آشناسازی آزمون حداکثر سرعت دویدن موش‌ها باتوجه‌به پروتکل تمرینات ورزشی برحسب متر در دقیقه تعیین شد. بدین صورت که برای سنجش حداکثر سرعت موش‌ها بر روی نوارگردان، ۴ سر موش به‌عنوان گروه پایلوت انتخاب و آزمون تمرین ورزشی فزاینده بر روی نوارگردان با شیب صفر درجه جهت سنجش حداکثر سرعت دویدن اجرا شد. بدین‌منظور موش‌ها با سرعت ۶ متر در دقیقه شروع به دویدن کردند، سپس سرعت نوارگردان هر ۲ دقیقه به میزان ۳ متر در دقیقه افزایش یافت تا زمانی‌که عدم توانایی آن‌ها برای ادامه دویدن به‌صورت برخورد به دیواره تعبیه‌شده در انتهای نوارگردان به‌مدت ۳۰ ثانیه (یا ۱۰ بار برخورد) مشاهده شد. میزان سرعت در آخرین مرحله تکمیل‌شده به‌عنوان حداکثر سرعت دویدن بر روی نوارگردان ثبت شد [۲۱]. بدین ترتیب پروتکل‌های مربوط به گروه‌های تمرینی طراحی شد.

برنامه تمرینی

در این پژوهش تمرینات ورزشی به مدت ۸ هفته و هر هفته ۵ روز انجام شد. شیب نوارگردان در طول اجرای پروتکل صفر درنظر گرفته

6. High-intensity interval training (HIIT)
7. Low-intensity interval training (LIIT)

جدول ۱. وزن آزمودنی‌ها (موش‌های نر نژاد C57BL/6) طی فرایند تحقیق به نفکیک گروه‌ها

گروه‌ها	شروع تمرینات		پس از دوره تمرینی		پس از دوره بی‌تمرینی	
	تعداد	میانگین ± انحراف معیار	تعداد	میانگین ± انحراف معیار	تعداد	میانگین ± انحراف معیار
کنترل پایه	۶	۲۵/۱۶±۲/۹۲	–	–	–	–
کنترل	۶	۲۶/۴۸±۴/۱۷	۴	۲۹/۲۹±۲/۹۷	۴	۲۷/۹۵±۲/۴۶
تمرینات تناوبی کم‌شدت	۶	۲۶/۲۶±۳/۸۸	۶	۲۷/۱۸±۲/۹۱	۶	۳۰/۲۶±۰/۸۵
تمرینات تناوبی شدید	۶	۲۷/۳۰±۴/۹۵	۵	۳۰/۵۴±۳/۴۹	۵	۳۱/۸۲±۳/۵۳
مجموع	۲۴	۲۶/۵۱±۴/۱۶	۱۵	۲۸/۸۵±۳/۳۱	۱۵	۳۰/۱۷±۲/۵۸

مجله علمی پزشکی
جندی شاپور

شد. برای گروه تمرینات تناوبی کم‌شدت تمرین تناوبی با استفاده از تکرارهای با شدت ۵۵ الی ۶۰ درصد حداکثر سرعت دویدن به مدت ۲ دقیقه و با تناوب استراحت با شدت ۴۵ الی ۵۰ درصد حداکثر سرعت دویدن یعنی ۶ متر در دقیقه به مدت ۲ دقیقه اجرا شد. برای گروه تمرینات تناوبی شدید تمرین تناوبی با استفاده از تکرارهای با شدت ۸۵ الی ۹۵ درصد حداکثر سرعت دویدن به مدت ۲ دقیقه و با تناوب استراحت با شدت ۵۵ الی ۶۰ درصد حداکثر سرعت دویدن، یعنی ۶ متر در دقیقه به‌مدت ۲ دقیقه اجرا شد. در ابتدا و انتهای تمرین ۳ دقیقه برای گرم کردن و ۳ دقیقه هم برای سرد کردن لحاظ شد [۲۲]. اضافه بار موردنظر بدین صورت اِعمال شد که در پایان هر ۲ هفته، آزمون فزاینده حداکثر سرعت مجدداً اجرا و شدت جدید تعیین می‌شد و علاوه بر سرعت بالاتر ۱ تکرار بیشتر هم به‌عنوان اضافه بار درنظر گرفته می‌شد.

فرایند بی‌تحرک‌سازی

به‌طورکلی، سطوح بالای آمادگی جسمانی پس از ۲ الی ۶ هفته تمرین ناکافی از بین می‌رود [۱۲]. بنابراین ۴ هفته پس از قطع تمرین و در پایان دوره بی‌تحرکی بر روی تعداد موش‌های باقی‌مانده از هر گروه، تمامی فرایندهای مربوط به جراحی، نمونه‌برداری و تحلیل بافتی جهت ارزیابی اثر بی‌تحرکی انجام شد. در طول دوره بی‌تحرکی، همه شرایط محیطی اعم از وضعیت دما، رطوبت و دسترسی به آب و غذا و نیز چرخه تاریکی‌روشنایی مانند دوره تمرین ادامه یافت. بنابراین شرایط برای موش‌های مربوط به گروه‌های تمرینات ورزشی تناوبی کم‌شدت و شدید همانند گروه کنترل بود و هیچ‌گونه تمرینی انجام ندادند.

فرایندهای آزمایشگاهی

آماده‌سازی بافت

قبل از اجرای پروتکل تمرینی، موش‌های گروه کنترل پایه[8] (۶ سر)، پس از انجام فرایند آشناسازی و قبل از انجام پروتکل اصلی تمرینی جراحی شدند. پس از اجرای پروتکل‌های تمرینی، نمونه‌های سایر گروه‌ها در آزمایشگاه دانشگاه علوم‌پزشکی آبادان تشریح شدند. بدین‌منظور، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، موش‌ها با استفاده از اتر بیهوش و پس از آسان‌کشی، عضله بازکننده طویل انگشتان پا[9] به‌عنوان عضله تندانقباض و عضله نعلی[10] به‌عنوان عضله کندانقباض تحت شرایط استریل برداشته شد و با نرمال سالین شست‌وشو شدند و خون و مواد زاید آن جدا شد. بافت‌های موردنظر بلافاصله درمیکروتیوب‌هایی با حجم ۱/۵ میلی‌لیتر با برچسب متناسب با نوع بافت، گروه و ساعت تشریح جاسازی و وارد تانک نیتروژن شدند و سپس به فریزر با دمای منهای ۸۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از جمع‌آوری نمونه‌های بافتی مربوط به تمامی موش‌ها و ۲۴ ساعت پس از نمونه‌برداری، بافت‌های عضلانی به وسیله ترازوی sartori-us ساخت کشور آلمان، مارک CPA224S با دقت یک‌هزارم گرم، وزن شدند و پس از جدا کردن تاندون‌های عضلات، از محدوده بطن هر عضله به میزان حدود ۱۰ میلی‌گرم نیزجهت استخراج RNA (جهت سنجش بیان ژن‌های TRF1 و TRF2) برداشته شد. بافت‌ها پس از اضافه کردن بافر PBS حاوی آنتی‌پروتئاز سیگما به وسیله اسکالپل[11] خرد شدند و بافت برای انجام سایر فرایندها آماده شد.

فرایند استخراج RNA

برای استخراج RNA از بافت‌ها، از کیت استخراج cDNA سیناکلون شرکت سیناژن ساخت ایران استفاده شد. نخست مطابق دستورالعمل کیت، برای استخراج RNA از بافت‌های خردشده، به ۱۰ میلی‌گرم از بافت داخل میکروتیوب، میزان ۰/۵ میلی‌لیتر ترایزول اضافه شد و پس از مخلوط کردن کامل (پیپتاژ کردن) به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری (انکوبه) و سپس

8. Base

9. Extensor Digitorum Longus (EDL)
10. Soleus Muscle
11. Scalpel

۰/۲ میلی‌لیتر به آن کلروفرم سرد اضافه شد و پس از پیپتاژ (۱۵ ثانیه) حدود ۲ تا ۳ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. در ادامه، میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس، مایع رویی به دقت برداشته و به میکروتیوب RNAase free انتقال داده شد (از این مرحله به بعد با سرسمپلر فیلتردار (شرکت eppen-dorff آلمان) کار شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر ایزوپروپانول[12] سرد اضافه شد و بعد از هم زدن ملایم در دمای منهای ۲۰ درجه باقی ماند. روز بعد، میکروتیوب‌ها ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه مجدداً سانتریفیوژ شدند . در این مرحله رسوب سفیدرنگی در ته اکثر میکروتیوب‌ها مشهود بود. با سمپلر مایع رویی با دقت خارج و ۱ میلی‌لیتر اتانول سرد به آن اضافه شد. بعد از تکان دادن مختصر به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه با ۷۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. در ادامه، مایع رویی به‌دقت تخلیه و ۱۰ دقیقه فرصت داده شد تا باقی‌مانده اتانول تبخیر و داخل میکروتیوب خشک شود. بعد از این مرحله ۵۰ لاندا آب تزریقی به هر نمونه اضافه شد و چند بار به‌آرامی پیپتاژ صورت گرفت. درپایان، غلظت و نسبت جذبی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری نانودراپ (Thrmosientific ساخت کشور آمریکا) در طول موج ۲۶۰ نانومتر ارزیابی شد. برای آشکارسازی خلوص RNA، نسبت جذب چگالی نوری ۲۶۰/[13]۲۸۰ نانومتر تعیین شد و نمونه‌ای با نسبت ۱/۸< برای سنتز cDNA استفاده شد. غیر از مراحلی که نیاز بود میکروتیوب‌های حاوی مواد سانتریفیوز یا ورتکس شوند، تمام مراحل کار زیر هودی انجام می‌شد که از قبل آماده شده بود (استریل‌شده با الکل ۷۵ درصد و نور UV).

12. Isopropanol
13. Optical Density (OD)

سنتز cDNA

برای رونویسی RNA به cDNA از کیت استخراج cDNA سیناکلون شرکت سیناژن ساخت ایران استفاده شد. نخست مطابق دستورالعمل کیت، مقداری مشخصی از RNA هر نمونه، Reaction buffer، dNTP mix، Random hexamer، مسترمیکس (Amplicon ساخت کشور دانمارک) و آب‌مقطر در داخل میکروتیوب برای هر نمونه ترکیب می‌شد. سپس برای رونویسی به cDNA طبق دستورالعمل کیت، دستگاه ترموسایکلر به‌صورت زیر برنامه‌ریزی می‌شد:

انکوبه شدن در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه و درنهایت با افزایش دما به ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

تمام مراحل مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. سایر فرایندهای تخصصی آزمایشگاهی جهت اندازه‌گیری میزان بیان ژن‌های TRF1 و TRF2 و سنجش طول تلومر با استفاده از روش Real time-PCR انجام شد.

اندازه‌گیری بیان ژن

برای سنجش بیان ژنی از روش Real time-PCR استفاده شد. در این مطالعه، تکثیر ژن‌های TRF2، TRF1 و نیز ژن رفرنس (GAPDH) برای اندازه‌گیری بیان ژن، توسط Real time PCR براساس روش استاندارد صورت گرفت. برای اندازه‌گیری کاهش یا افزایش بیان ژن‌های TRF1 و TRF2، بیان آن با بیان ژن‌های کنترل داخلی مقایسه شد. بدین‌منظور ۱۰ میکرولیتر از مسترمیکس برداشته شد و مقدار ۰/۵ میکرولیتر از هرکدام از پرایمرهای F و R و مقدار ۷/۵ میکرولیتر آب به آن اضافه شد. این حجم‌ها در استریپ‌های ۸ تایی ریخته شد. در هر استریپ

جدول ۲. پرایمرهای مورداستفاده در پژوهش

نام ژن	توالی پرایمر
Telomere-F	CGGTTTGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT
Telomere-R	GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT
TRF1-F	5-TCTAAGGATAGGCCAGATGCCAC-3
TRF1-R	5-CTGAAATCTGATGGAGCACGTCTG-3
TRF2-F	5-GTCTGTCGCGCATTGAAGAAGG-3
TRF2-R	5- CTTCTGAGTTGTGGGGTCCTTAG-3
GAPDH-F	5-CGACTTCAACAGCAACTCCCACTC-3
GAPDH-R	5-TGGTCCAGGGTTTCTTACTCCTTG-3

۱۸ میکرولیتر ریخته شد. سپس به هرکدام از استریپ‌ها ۱/۵ میکرولیتر cDNA اضافه شد و حجم نهایی برای واکنش Real time PCR، ۲۰ میکرولیتر بود. پرایمرهای مورداستفاده از شرکت سیناژن (ایران) تهیه شد (جدول شماره ۲).

سپس فرایند Real time PCR با استفاده از دستگاه ABI مدل StepOne ساخت کشور آمریکا اجرا شد و هر واکنش به‌صورت دوگانه انجام شد. پس از انجام واکنش، داده‌های خام به‌صورت آستانه چرخه[14] از دستگاه استخراج شد و محاسبه میزان بیان ژن‌ها با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ انجام شد.

نحوه انجام محاسبات طول تلومر

جهت محاسبه طول تلومر به مقدار کمی نیاز به تهیه منحنی استاندارد بود که در هر مورد با استفاده از رقت‌های سریالی توالی الیگونوکلئوتیدی سنتتیک مربوطه توسط دستگاه Real time-PCR تهیه شد. به همین علت، یک نمونه DNA رفرنس تهیه شد. چون چگالی DNA سلول‌ها در بافت طحال بالاست و کمیت بیشتری از DNA به دست می‌آید، از این بافت در موش‌های گروه کنترل، DNA استخراج شد. در فرایند تعیین طول تلومر (T) از ژن رفرنس Gapdh به‌عنوان ژن کنترل و از ژن B4 36 به‌عنوان ژن تک کپی (S) استفاده شد تا طول نسبی تلومر (T/S) تعیین شود. ابتدا نسبت T به S در نمونه رفرنس محاسبه شد. بدین منظور از DNAهای استخراج‌شده از نمونه رفرنس، به میزان ۲۵ نانوگرم، رقت‌هایی سریالی با نسبت ۱/۶۸ برابر در ۵ رقت تهیه شد. با استفاده از پرایمرهای B4 36، TC یا آستانه چرخه‌ها در رقت‌های حاصل‌شده، به دست آمد و با استفاده از آن‌ها نمودار استاندارد ترسیم شد. سپس با استفاده از پرایمرهای تلومر نیز آستانه چرخه‌ها را در رقت‌های حاصل‌شده، به دست آورده و با استفاده از آن‌ها نمودار استاندارد برای تلومر نیز ترسیم شد. به این ترتیب برای T و S هرکدام یک نمودار استاندارد با ۵ نقطه به دست آمد که کاملاً خطی و نسبتاً دقیق است و دارای درصد همبستگی بالایی است (R=۲۰/۹۵). بنابراین نسبت T/S با استفاده از میانگین آستانه چرخه‌ها به دست آمد. نسبت T/S در نمونه DNA رفرنس معیار مقایسه قرار گرفت. بنابراین همین نسبت T به S در همه نمونه‌ها نیز به دست آمد. هرقدر این نسبت عدد بزرگ‌تری را نشان دهد، به معنای طول تلومر بیشتر است.

آنالیز آماری

به منظور تجزیه‌وتحلیل داده‌ها از آزمون‌های توصیفی جهت برآورد میانگین، انحراف استاندارد، و نیز جداول، نمودارها و غیره استفاده شد. برای بررسی فرضیه‌های تحقیق از آزمون‌های

14. Cycle Threshold (CT)

جدول ۳. میزان طول تلومر، بیان ژن TRF1 و TRF2 گروه‌های تحقیق به تفکیک نوع عضله

گروه‌ها	نوع عضله	تعداد	میانگین±انحراف معیار		طول تلومر	
			TRF1	TRF2	نسبت (T/S)	SD
گروه کنترل پایه	عضله نعلی	۶	۱±۰/۳۳	۱/۰۰±۰/۸۷	۱/۴۰	۰/۱۸
	عضله بازکننده طویل انگشتان پا	۶	۱±۰/۵۰	۰/۹۱±۰/۸۵	۱/۴۸	۰/۱۷
	مجموع	۱۲	۱±۰/۴۱	۰/۹۶±۰/۸۲	۱/۴۵	۰/۱۷
گروه کنترل	عضله نعلی	۴	۰/۹۶±۰/۰۹	۰/۶۰±۰/۰۲	۱/۴۵	۰/۰۳
	عضله بازکننده طویل انگشتان پا	۴	۱/۰۱±۰/۰۶	۰/۲۳±۰/۰۷	۱/۴۷	۰/۲۹
	مجموع	۸	۰/۹۹±۰/۰۸	۰/۴۲±۰/۲۱	۱/۴۶	۰/۱۹
گروه تمرینات تناوبی کم‌شدت	عضله نعلی	۶	۱/۸۹±۰/۹۴	۰/۷۴±۰/۴۹	۱/۵۵	۰/۰۹
	عضله بازکننده طویل انگشتان پا	۶	۱/۳۴±۰/۷۱	۰/۴۹±۰/۲۱	۱/۵۷	۰/۱۲
	مجموع	۱۲	۱/۶۱±۰/۸۴	۰/۶۱±۰/۳۸	۱/۵۶	۰/۱۰
گروه تمرینات تناوبی شدید	عضله نعلی	۵	۱/۷۰±۰/۸۳	۰/۸۱±۰/۷۲	۱/۴۵	۰/۰۳
	عضله بازکننده طویل انگشتان پا	۵	۲/۰۱±۰/۹۶	۰/۶۰±۰/۲۶	۱/۳۷	۰/۰۵
	مجموع	۱۰	۱/۸۶±۰/۸۶	۰/۷۱±۰/۵۲	۱/۴۱	۰/۰۶

جدول ۴. نتایج آزمون تحلیل واریانس دوراهه برای تعیین اثر تعاملی نوع بی‌تحرکی و نوع عضله بر میزان بیان ژن‌های TRF1 و TRF2

متغیر	منبع واریانس	مجموع مجذورات	درجه آزادی	میانگین مجذورات	نسبت F	سطح معناداری	اندازه اثر
بیان ژن TRF1	اثراصلی نوع بی‌تحرکی	۳/۵۲۴	۲	۱/۷۶۲	۳/۱۳۲	۰/۰۶۲	۰/۲۰۷
	اثراصلی نوع عضله	۰/۰۲۸	۱	۰/۰۲۸	۰/۰۵۰	۰/۸۲۵	۰/۰۰۲
	اثر تعاملی نوع بی‌تحرکی×نوع عضله	۱/۰۴۷	۲	۰/۵۲۴	۰/۹۳۱	۰/۴۰۸	۰/۰۷۲
بیان ژن TRF2	اثراصلی نوع بی‌تحرکی	۰/۳۸۶	۲	۰/۱۹۳	۱/۲۳۳	۰/۳۰۹	۰/۰۹۳
	اثراصلی نوع عضله	۰/۵۵۱	۱	۰/۵۵۱	۳/۵۲۲	۰/۰۷۳	۰/۱۲۸
	اثر تعاملی نوع بی‌تحرکی×نوع عضله	۰/۰۲۹	۲	۰/۰۱۵	۰/۰۹۳	۰/۹۱۲	۰/۰۰۸

مجله علمی پزشکی
جندی شاپور

جدول ۵. نتایج آزمون تحلیل واریانس دوراهه برای تعیین اثر تعاملی نوع بی‌تحرکی و نوع عضله بر میزان طول تلومر (T/S)

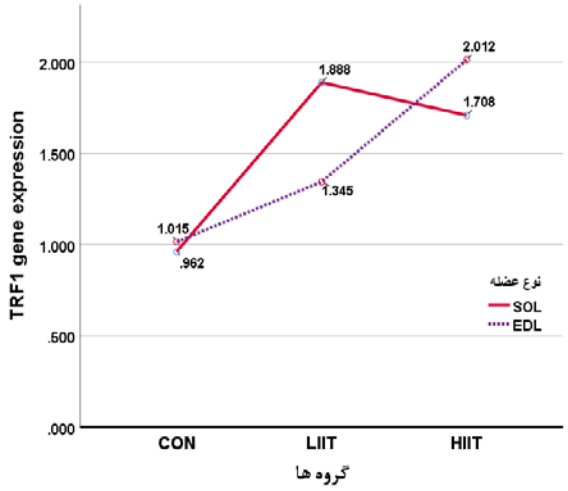
متغیر	منبع واریانس	مجموع مجذورات	درجه آزادی	میانگین مجذورات	نسبت F	سطح معناداری	اندازه اثر
طول تلومر (T/S)	اثراصلی نوع بی‌تحرکی	۰/۱۱۵	۲	۰/۰۵۸	۳/۳۷۱	۰/۰۵۳	۰/۲۳۵
	اثراصلی نوع عضله	۰/۰۰۲	۱	۰/۰۰۲	۰/۰۹۳	۰/۷۶۳	۰/۰۰۴
	اثر تعاملی نوع بی‌تحرکی ×نوع عضله	۰/۰۱۵	۲	۰/۰۰۷	۰/۴۳۸	۰/۶۵۱	۰/۰۳۸

مجله علمی پزشکی
جندی شاپور

استنباطی استفاده شد. براین‌اساس از آزمون شاپیرو ویلک[15] به‌منظور بررسی نرمال بودن داده‌ها استفاده شد. همچنین، جهت بررسی اثر تعاملی متغیرها از آزمون تحلیل واریانس دوراهه[16] و برای بررسی تفاوت بین گروه‌ها بر حسب نوع مقایسه از آزمون‌های تعقیبی شفه[17] استفاده شد و سطح معناداری در همه فرضیه‌ها α=۰/۰۵ درنظر گرفته شد. از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۲ جهت تجزیه‌وتحلیل داده‌ها استفاده شد.

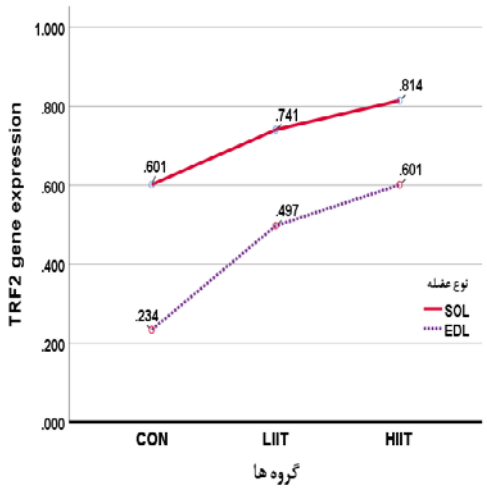
یافته‌ها

15. Shapiro-Wilk Test
16. Two-way ANOVA
17. Scheffe



تصویر ۲. اثر متقابل نوع بی‌تحرکی و نوع عضله بر میزان بیان ژن TRF1 در عضلات کندانقباضو تندانقباض موش‌های نژاد C57BL/6 . SOL: عضله نعلی، EDL: عضله بازکننده دراز انگشتان، CON: گروه کنترل، LIIT: گروه بی‌تحرکی متعاقب تمرینات تناوبی کم‌شدت و HIIT: گروه بی‌تحرکی متعاقب تمرینات تناوبی پرشدت

مجله علمی پزشکی
جندی شاپور



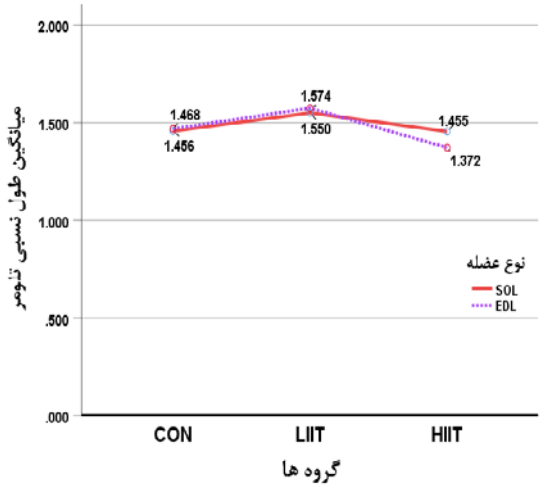
مجله علمی پزشکی
جندی شاپور

تصویر ۳. اثر متقابل نوع بی‌تحرکی و نوع عضله بر میزان بیان ژن TRF2 در عضلات کندانقباض و تندانقباض موش‌های نژاد C57BL/6 . SOL: عضله نعلی، EDL: عضله بازکننده دراز انگشتان، CON: گروه کنترل، LIIT: گروه بی‌تحرکی متعاقب تمرینات تناوبی کم‌شدت و HIIT: گروه بی‌تحرکی متعاقب تمرینات تناوبی پرشدت

با گذشت ۱۲ هفته از اجرای طرح یعنی پس از ۸ هفته اجرای پروتکل‌های تمرینات ورزشی و انجام ۴۰ جلسه تمرین و متعاقب آن ۴ هفته بی‌تحرکی، سنجش میزان بیان ژن‌ها انجام و داده‌های مربوطه استخراج شد. میزان بیان ژن‌های TRF2، TRF1 و طول تلومر در گروه‌های مختلف در جدول شماره ۳ گزارش شده است.

باتوجه‌به اینکه توزیع داده‌های مربوط به گروه‌های مورد آزمایش پس از ۱۲ هفته اجرای طرح تحقیق در فاکتورهای اندازه‌گیری بیان ژن‌های TRF2، TRF1و طول تلومر با استفاده از آزمون شاپیرو ویلک وضعیت نرمال را نشان می‌داد، برای مقایسه گروه کنترل پایه و گروه کنترل اصلی و نیز برای مقایسه گروه کنترل اصلی و گروه‌های تمرین‌کرده از آزمون‌های پارامتریک استفاده شد.

برای اینکه اثر احتمالی طول دوره زمانی ۱۲ هفته‌ای اجرای پروتکل تحقیق بر میزان تغییرات در TRF2، TRF1 و طول تلومر بررسی شود، ابتدا گروه کنترل اصلی تحقیق با گروه کنترل پایه (که در ابتدای فرایند اجرایی تحقیق جراحی شدند) باتوجه‌به نوع



مجله علمی پزشکی
جندی شاپور

تصویر ۴. اثر متقابل چهار هفته انواع بی‌تحرکی مختلف و نوع عضله بر طول نسبی تلومر (T/S) عضلات کندانقباض و تندانقباض موش‌های نژاد C57BL/6 . SOL: عضله نعلی، EDL: عضله بازکننده دراز انگشتان، CON: گروه کنترل، LIIT: گروه بی‌تحرکی متعاقب تمرینات تناوبی کم‌شدت و HIIT: گروه بی‌تحرکی متعاقب تمرینات تناوبی پرشدت

عضله، با استفاده از آزمون تحلیل واریانس دوراهه مقایسه شدند. این مقایسه ضرورت داشت، زیرا باید اطمینان حاصل می‌شد که تغییرات احتمالی در گروه‌های آزمایشی به‌علت ایجاد شرایط بی‌تحرکی متفاوت است. بنابراین، تأثیر ۴ هفته شرایط مختلف بی‌تحرکی بر متغیرهایی که در این دوره زمانی اندازه‌گیری شدند. براساس نتایج آزمون تحلیل واریانس دوراهه، اثر اصلی بین گروه‌ها (P=۰/۹۴۳ و F=۰/۰۰۵) و اثر اصلی بین نوع عضله (P=۰/۸۶۶ و F=۰/۰۲۹) معنادار نشد. بنابراین تفاوت معناداری بین بیان ژن TRF1 در ۲ نوع عضله و نوع بی‌تحرکی مشاهده نشد. همچنین اثر متقابل گروه‌های کنترل و کنترل پایه و نوع عضله بر میزان بیان ژن TRF1 عضلات کندانقباض و تندانقباض نیز معنادار نشد (P=۰/۸۶۷ و F=۰/۰۲۹). بنابراین، بین میزان بیان ژن TRF1 در عضلات کندانقباض و تندانقباض در بدو مطالعه در گروه کنترل پایه و نیز پس ۱۲ هفته در گروه کنترل اصلی تفاوت معناداری مشاهده نشد و پس از گذشت ۱۲ هفته زمان، میزان بیان ژن TRF1 در عضلات کندانقباض و تندانقباض تغییر معناداری پیدا نکرده است.

باتوجه‌به اینکه اثر زمانی گذشت ۱۲ هفته طول دوره اجرای تحقیق موجب تغییر معناداری در میزان بیان ژن TRF1 در گروه کنترل نشد. در آزمون فرضیه اصلی، با استفاده از گروه کنترل، جهت بررسی اثر نوع بی‌تحرکی، نوع عضله و اثر تعاملی بین نوع بی‌تحرکی و نوع عضله بر میزان بیان ژن **TRF1** عضلات، ازآزمون تحلیل واریانس دوراهه استفاده شد. نتایج حاصل از این آزمون در جدول شماره ۴ ارائه شده است.

باتوجه‌به نتایج آزمون تحلیل واریانس دوراهه، نظر به آماره F و سطح معناداری به‌دست‌آمده، اثر اصلی بین نوع بی‌تحرکی معنادار نشد (P<۰/۰۶۲ و F=۳/۱۳۲). به‌عبارتی، بین میزان بیان ژن TRF1 عضلات کندانقباض و تندانقباض در گروه‌های بی‌تحرکی، متعاقب تمرینات تناوبی با شدت بالا و شدت پایین و گروه کنترل تفاوت معناداری مشاهده نشد. اثر اصلی بین نوع عضله نیز معنادار نشد (P=۰/۸۲۵ و F=۰/۰۵۰). بنابراین تفاوت معناداری بین میزان بیان ژن TRF1 بین عضلات کندانقباض و تندانقباض مشاهده نشد. همچنین داده‌های به‌دست‌آمده از RT-PCR حاکی از آن بود که اثر متقابل بین نوع بی‌تحرکی و نوع عضله بر میزان بیان ژن TRF1 معنادار نیست (P<۰/۴۰۸ و F=۰/۹۳۱). همان‌طور که در تصویر شماره ۲ نیز نشان داده شده است، میزان بیان ژن TRF1 در عضلات کندانقباض و تندانقباض در گروه‌های موردمطالعه پس از اجرای ۱۲ هفته پروتکل تحقیقاتی تفاوت معناداری مشاهده نمی‌شود، به‌نحوی‌که با وجود انجام برنامه‌های تمرینی و متعاقب آن ۴ هفته بی‌تحرکی، سطح بیان ژن TRF1 در هیچ‌کدام از عضلات کندانقباض و تندانقباض تغییر معناداری پیدا نکرده است.

برای بررسی میزان تغییرات در متغیر TRF2 نیز ابتدا گروه کنترل اصلی تحقیق با گروه کنترل پایه که در ابتدای فرایند اجرایی تحقیق جراحی شدند، باتوجه‌به نوع عضله با استفاده از آزمون تحلیل واریانس دوراهه مورد مقایسه قرار گرفتند. نتایج این آزمون نشان داد، اثر اصلی بین گروه‌ها (P=۰/۱۰۱ و F=۳/۰۱۹) و اثر اصلی بین نوع عضله معنادار نشد (P=۰/۴۹۷ و F=۰/۵۲۵) و تفاوت معناداری بین میزان بیان ژن TRF2 عضلات در گروه‌های کنترل و کنترل پایه و بین عضلات کندانقباض و تندانقباض مشاهده نشد. همچنین بررسی اثر تعاملی گروه‌ها و نوع عضله بر میزان بیان ژن TRF2 عضلات کندانقباض و تندانقباض معنادار نشد (P=۰/۶۵۴ و F=۰/۲۰۸). بنابراین، بین میزان بیان ژن TRF2 در عضلات کندانقباض و تندانقباض در بدو مطالعه در گروه کنترل پایه و نیز پس ۱۲ هفته اجرای پروتکل تحقیق در گروه کنترل اصلی تفاوت معناداری مشاهده نشد و تقریباً به‌طور مشابه در گروه کنترل اصلی ثابت ماند و تغییری پیدا نکرد.

باتوجه‌به اینکه اثر زمانی گذشت ۱۲ هفته طول دوره زمانی اجرای تحقیق موجب افزایش میزان بیان ژن TRF2 در گروه کنترل نشد، در آزمون فرضیه اصلی، با استفاده از گروه کنترل، جهت بررسی اثر نوع بی‌تحرکی، نوع عضله و اثر تعاملی بین نوع بی‌تحرکی و نوع عضله بر میزان بیان ژن **TRF2** عضلات، ازآزمون تحلیل واریانس دوراهه استفاده شد. نتایج حاصل از این آزمون در جدول شماره ۴ ارائه شده است.

باتوجه‌به نتایج آزمون تحلیل واریانس دوراهه، نظر به آماره F و سطح معناداری به‌دست‌آمده، اثر اصلی بین نوع بی‌تحرکی (P<۰/۳۰۹ و F=۱/۲۳۳) و نیز اثر اصلی بین ۲ نوع عضله معنادار نشد (P=۰/۰۷۳ و F=۳/۵۲۲). به‌عبارتی، بین میزان بیان ژن TRF2 عضلات کندانقباض و تندانقباض و نیز بین گروه‌های بی‌تحرکی متعاقب تمرینات تناوبی با شدت بالا و شدت پایین و گروه کنترل تفاوت معناداری مشاهده نشد. همچنین داده‌های به‌دست‌آمده از RT-PCR حاکی از آن بود که اثر تعاملی بین نوع بی‌تحرکی و نوع عضله بر میزان بیان ژن TRF2 معنادار نشد (P=۰/۹۱۲ و F=۰/۰۹۳). همان‌طور که در تصویر شماره ۳ نیز نشان داده شده است، در میزان بیان ژن TRF2 در عضلات کندانقباض و تندانقباض در گروه‌های موردمطالعه پس از اجرای ۱۲ هفته پروتکل تحقیقاتی تفاوت معناداری مشاهده نمی‌شود. به‌نحوی‌که اجرای انواع بی‌تحرکی، هیچ‌گونه تأثیری در کاهش یا افزایش سطح بیان ژن TRF2 در هیچ‌کدام از عضلات کندانقباض و تندانقباض نداشته است.

درنهایت، برای بررسی متغیر اصلی پژوهش یعنی میزان تغییرات در طول تلومر، نیز ابتدا گروه کنترل اصلی تحقیق با گروه کنترل پایه که در ابتدای فرایند اجرایی تحقیق جراحی شدند، باتوجه‌به نوع عضله با استفاده از آزمون تحلیل واریانس دوراهه مقایسه شدند. نتایج این آزمون نشان داد اثر اصلی بین گروه‌ها

(P=۰/۸۶۰ و F=۰/۰۳۲) و اثر اصلی بین دو نوع عضله معنادار نشد (P=۰/۶۲۹ و F=۰/۲۴۴). بنابراین میزان طول تلومر بین گروه‌ها و بین ۲ نوع عضله مشابه است. همچنین داده‌های RT-PCR برای بررسی اثر متقابل گروه‌ها و نوع عضله بر میزان طول تلومر عضلات کندانقباض و تندانقباض معنادار نبود (P=۰/۷۲۴ و F=۰/۱۲۹).

نظر به اینکه پس از گذشت ۱۲ هفته طول دوره زمانی اجرای تحقیق، افزایش میزان طول تلومر در گروه کنترل مشاهده نشد، برای آزمون فرضیه اصلی با استفاده از گروه کنترل جهت بررسی اثر نوع بی‌تحرکی، نوع عضله و اثر تعاملی بین نوع بی‌تحرکی و نوع عضله بر میزان طول تلومر عضلات، نیز از آزمون تحلیل واریانس دوراهه استفاده شد. نتایج حاصل از این آزمون در جدول شماره ۵ ارائه شده است.

مطابق نتایج آزمون، با توجه به آماره F و سطح معناداری به‌دست‌آمده، اثر اصلی بین نوع بی‌تحرکی معنادار نشد (P<۰/۰۵۳ و F =۳/۳۷۱). به‌عبارتی، بین میزان طول تلومر عضلات کندانقباض و تندانقباض تفاوت معناداری بین گروه‌های بی‌تحرکی متعاقب تمرینات تناوبی با شدت بالا و شدت پایین و گروه کنترل مشاهده نشد. همچنین اثر اصلی بین نوع عضله معنادار نشد (P=۰/۷۶۳ و F=۰/۰۹۳) و تفاوت معناداری بین میزان بیان ژن TRF2 بین عضلات کندانقباض و تندانقباض مشاهده شد. بنابراین داده‌های RT-PCR حاکی از آن بود که اثر متقابل بین نوع بی‌تحرکی و نوع عضله بر میزان طول تلومر معنادار نیست (P=۰/۶۵۱ و F=۰/۴۳۸). همان‌طور که در تصویر شماره ۴ نیز نشان داده شده است، میزان طول تلومر در عضلات کندانقباض و تندانقباض در گروه‌های موردمطالعه پس از اجرای ۱۲ هفته پروتکل تحقیقاتی تفاوت معناداری مشاهده نمی‌شود. به‌نحوی‌که اجرای انواع بی‌تحرکی، هیچ‌گونه تأثیری بر افزایش میزان طول تلومر در هیچ‌کدام از عضلات کندانقباض و تندانقباض نداشته است. اما به نظر می‌رسد از کاهش میزان طول و یا فرسایش تلومر در بافت عضلانی جلوگیری کرده است.

بحث

این پژوهش اولین مطالعه‌ای است که اثر بی‌تحرکی متعاقب شدت‌های تمرینی متفاوت بر سیستم تلومر عضلات اسکلتی را بررسی کرده است و درعین‌حال به اثر متقابل نوع بی‌تحرکی و نوع عضله توجه کرده است. یکی از پروتئین‌های واقع در سیستم تلومری TRF1 است که طویل شدن تلومر را با وابستگی به تلومراز به‌طور منفی تنظیم می‌کند [۲۳]. نتایج تحقیق حاضر آشکار کرد که در میزان بیان ژن TRF1 در عضلات کندانقباض و تندانقباض و نیز بین گروه‌های موردمطالعه پس از اجرای ۴ هفته اجرای بی‌تحرکی متعاقب پروتکل‌های تمرینی تفاوت معناداری مشاهده نشد. به‌نحوی‌که سطح بیان ژن TRF1 در هیچ‌کدام از عضلات کندانقباض و تندانقباض افزایش و یا کاهش معناداری پیدا نکرد. یکی دیگر از پروتئین‌های مهم سیستم تلومر، TRF2 است که به‌عنوان یک محافظ مولکولی برای تلومر عمل می‌کند. حذف TRF2 بلافاصله باعث ایجاد همجوشی انتهایی و پیری سلول شده و یا ازطریق فعال کردن واکنش‌های آسیب‌رسان DNA فلج‌کننده تلومر به مرگ سلولی منجر می‌شود [۲۳]. نتایج تحقیق حاضر نشان داد در عضلات کندانقباض و تندانقباض تقریباً به‌طور مشابه پس ۴ هفته اجرای بی‌تحرکی، متعاقب پروتکل‌های تمرینی و مقایسه گروه‌ها، اثر متقابل بین نوع بی‌تحرکی و نوع عضله بر میزان بیان ژن TRF2 معنادار نشد.

رویکردهای جدید نشان می‌دهد تلومرها در عضلات اسکلتی ساختارهای پویایی هستند که تحت تأثیر محیط خود قرار دارند [۲۴]. باتوجه‌به نتایج تحقیق حاضر، اثر متقابل گروه‌های کنترل و کنترل پایه و نوع عضله بر میزان نسبی طول تلومر (T/S) عضلات کندانقباض و تندانقباض معنادار نشد و بین گروه‌ها و بین ۲ نوع عضله نیز تفاوت معناداری مشاهده نشد. به‌عبارتی، اثر زمانی ۱۲ هفته مربوط به طول دوره تمرین و بی‌تمرینی تغییر معناداری را در طول تلومر عضلات ایجاد نکرده بود. همچنین طول نسبی تلومر در عضلات کندانقباض و تندانقباض در گروه کنترل و نیز در گروه‌های تمرین پس از ۴ هفته بی‌تمرینی متعاقب ۸ هفته تمرینات تناوبی کم‌شدت و پرشدت تقریباً یکسان و در سطحی مشابه است. به‌عبارتی، حتی اگر سازگاری‌هایی احتمالی در اثر اجرای پروتکل‌های تمرینی ایجاد شده باشد، تنها پس از گذشت ۴ هفته بی‌تحرکی آثاری از آن مشاهده نمی‌شود.

این نتایج با یافته‌های لادلو و همکاران که اذعان داشتند پس از یک سال بی‌تحرکی، در عضله پلانتاریس موش نژاد CAST/Ei، افزایش در بیان ژن TRF1 با حفظ طول تلومر همراه بود [۱۷] همخوانی دارد و با نتایج ژو و همکاران که رابطه معکوسی بین تماشای تلویزیون با تنظیم طول تلومر مشاهده کردند و یک روند مشابه بین طول تلومر و تماشای تلویزیون در گروه ۲۰ تا ۴۰ ساله پس از تعدیل همه متغیرهای هم‌زمان مشاهده کردند [۲۵]، نیز همخوانی دارد. اما نتایج تحقیق حاضر با یافته‌های ادوارد و لوپرینزی، دیو و همکاران، لوپرینزی و همکاران و آبراهین و همکاران همخوانی ندارد.

این مطالعه توسعه‌دهنده یافته‌های پیشین است. لذا برای تبیین سازوکارهای احتمالی تأثیرگذار، می‌توان به پاسخ‌های التهابی پس از ترک فعالیت ورزشی و یا سبک زندگی غیرفعال اشاره کرد. پاسخ‌های التهابی بر کارایی ترمیم هر ۲ نوع عضلات تند انقباض و کندانقباض تأثیر می‌گذارد [۲۶] و غیرورزشکاران، التهاب مزمن و استرس اکسیداتیو بیشتری نسبت به ورزشکاران نخبه همسن خود دارند [۲۷]. علاوه‌براین لادلو و همکاران مشاهده کردند که ترکیبی از آنتی‌اکسیدان و استرس اکسایشی به افزایش بیان ژن TRF1 منجر می‌شود. همچنین، پیشنهاد کردند پاسخ TRF2 ممکن

است با پاسخ کوتاه‌شوندگی طول تلومر ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن[18] در عضله اسکلتی موش نژاد C57BL/6 همراه باشد. به‌علاوه، واکنش‌های مربوط به استرس اکسایشی، به تغییر فعالیت آنزیم تلومراز نیز می‌شود و درنهایت عضله اسکلتی در پاسخ به استرس اکسایشی (ناشی از بی‌تحرکی) کوتاه می‌شود [۲۸].

برخی محققان نشان دادند روند کوتاه شدن طول تلومر عضلات، پدیده‌ای است که به‌شدت به محیط استرس‌زای سلولی در شرایط عدم تحرک در افراد مسن مربوط است. بنابراین با بررسی جوانان، افراد سالمند دارای تحرک و بی‌تحرک تشریح کردند که کوتاه شدن تدریجی طول تلومر عضلات اسکلتی پا نسبت به عضلات دست به‌شدت تحت تأثیر افزایش متقابل رادیکال‌های آزاد عضلات پا قرار دارد که احتمالاً مربوط به عدم تحرک جسمانی است [۱۹]. به نظر می‌رسد بافت مورداستفاده در این تحقیق یعنی بافت عضلانی که دارای حداقل ظرفیت تکثیرشوندگی است، خود می‌تواند عامل مهمی در عدم تغییر طول تلومر باشد. بااین‌حال، این سازوکارها تاکنون به‌طور کامل شناخته نشده‌اند و بایستی با احتیاط تفسیر شوند.

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر حاکی از آن است که فارغ از اثرات احتمالی فعالیت بدنی بر سیستم تلومری، این سیستم در بافت عضله اسکلتی دچار تغییر محسوسی در گذر زمان و اجرای فرایندهای بی‌تحرکی نشده است و سیستم تلومری بافت عضلانی در شرایط متفاوت بی‌تحرکی پس از انواع تمرینات ورزشی و بدون تمرین ورزشی پاسخ مشابهی را نشان داده است. حتی مقایسه ۲ نوع بافت عضلانی کندانقباض و تندانقباض نیز مؤید این نتیجه است. بنابراین با وجود اینکه ممکن است انواع و شدت‌های مختلف تمرینات ورزشی موجب بهبود سیستم تلومر عضله اسکلتی شده باشد، ایجاد وقفه طولانی‌مدت در تمرینات ورزشی، موجب از دست رفتن سازگاری‌های احتمالی می‌شود. درمجموع به نظر می‌رسد حداقل اثری که تمرینات ورزشی می‌تواند داشته باشد، حفظ طول تلومر و جلوگیری از فرسایش آن در خلال دوره‌های بی‌تحرکی است.

عدم اندازه‌گیری سطح پروتئین TRF2 وTRF1 برای اطمینان از تبدیل mRNA متغیرهای موردنظر به پروتئین از محدودیت‌های پژوهش حاضر است. علاوه‌براین، به‌علت عدم دسترسی به تکنولوژی موردنیاز برای استخراج تار عضلانی منفرد، نمی‌توان نتایج حاصل از بافت عضلانی مورداستفاده در این پژوهش را با قطعیت به سلول عضلانی کندانقباض و تندانقباض تعمیم داد. باتوجه‌به اینکه همه آزمودنی‌ها جوان و از جنسیت نر انتخاب شده بودند، عدم قطعیت در تعمیم نتایج به جنس مؤنث یا افراد با سنین متفاوت امری اجتناب‌ناپذیر است. در ضمن، عدم بررسی آنزیم تلومراز که نقش مهمی در سیستم تلومری ایفا می‌کند به‌علت کنترل هزینه‌ها نیز از دیگر محدودیت‌های این پژوهش است.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

مجوز مربوط به مسائل اخلاقی در مورد کار با حیوانات آزمایشگاهی از کمیته اخلاق دانشگاه جندی‌شاپور اهواز به کد شناسه اخلاقی EE/98.24.3.26525/scu.ac.ir دریافت شد.

حامی مالی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه مقطع دکتری مصطفی خدادوست در گروه فیزیولوژی ورزشی دانشکده علوم ورزشی دانشگاه شهید چمران اهواز است. دانشگاه شهید چمران اهواز کلیه منابع مالی اجرای پژوهش را تأمین کرده است.

مشارکت نویسندگان

تمام نویسندگان در آماده‌سازی این مقاله مشارکت داشتند.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

از پرسنل محترم دانشکده علوم ورزشی دانشگاه شهید چمران اهواز و نیز از پرسنل محترم دانشگاه علوم پزشکی آبادان تشکر و قدردانی می‌شود.

18. Reactive Oxygen Species (ROS)

References

[1] Cruz-Jentoft AJ, Bahat G, Bauer J, Boirie Y, Bruyère O, Cederholm T, et al. Sarcopenia: Revised European consensus on definition and diagnosis. Age Ageing. 2019; 48(1):16-31. [Doi.org/10.1093/ageing/afy169]

[2] Cohen S, Nathan JA, Goldberg AL. Muscle wasting in disease: Molecular mechanisms and promising therapies. Nat Rev Drug Discov. 2015; 14(1):58-74. [PMID]

[3] Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: Physiology to molecular biology. J Appl Physiol. 2001; 91(2):534-51. [PMID]

[4] Diotti R, Loayza D. Shelterin complex and associated factors at human telomeres. Nucleus. 2011; 2(2):119-35. [PMCID]

[5] Wang Y, Zhou WD, Yang Y, Ma L, Zhao Y, Bai Z, et al. Telomeres are elongated in rats exposed to moderate altitude. J Physiol Anthropol. 2014; 33(1):19. [PMID]

[6] Ponsot E, Echaniz-Laguna A, Delis AM, Kadi F. Telomere length and regulatory proteins in human skeletal muscle with and without ongoing regenerative cycles. Exp Physiol. 2012; 97(6):774-84. [PMID]

[7] Laine MK, Eriksson JG, Kujala UM, Raj R, Kaprio J, Bäckmand HM, et al. Effect of intensive exercise in early adult life on telomere length in later life in men. J Sports Sci Med. 2015; 14(2):239-45. [PMID]

[8] Svenson U, Nordfjäll K, Baird D, Roger L, Osterman P, Hellenius ML, et al. Blood cell telomere length is a dynamic feature. PloS One. 2011; 6(6):e21485. [PMID]

[9] Ludlow AT, Ludlow LW, Roth SM. Do telomeres adapt to physiological stress? Exploring the effect of exercise on telomere length and telomere-related proteins. Biomed Res Int. 2013; 2013:601368. [PMID]

[10] Arsenis NC, You T, Ogawa EF, Tinsley GM, Zuo L. Physical activity and telomere length: Impact of aging and potential mechanisms of action. Oncotarget. 2017; 8(27):45008-19. [PMID]

[11] Lynch GS. Therapies for improving muscle function in neuromuscular disorders. Exerc Sport Sci Rev. 2001; 29(4):141-8. [PMID]

[12] Grivas GV. The effects of detraining on cardiovascular parameters in distance runners. Med Sci Sports. 2019; 4(2):91-5. [Link]

[13] Sadeghi-Tabas S, Saghebjoo M, Sarir H, Hedayati M. Effects of work/rest interval manipulation of high-intensity interval training and detraining on telomerase activity and p53 levels in cardiac muscle. Science Sports. 2020; 35(3):170. e1-. e8. [DOI:10.1016/j.scispo.2019.06.002]

[14] Cherkas LF, Hunkin JL, Kato BS, Richards JB, Gardner JP, Surdulescu GL, et al. The association between physical activity in leisure time and leukocyte telomere length. Arch Intern Med. 2008; 168(2):154-8. [PMID]

[15] Denham J, Nelson CP, O'Brien BJ, Nankervis SA, Denniff M, Harvey JT, et al. Longer leukocyte telomeres are associated with ultra-endurance exercise independent of cardiovascular risk factors. PloS One. 2013; 8(7):e69377. [PMID]

[16] Werner C, Fürster T, Widmann T, Pöss J, Roggia C, Hanhoun M, et al. Physical exercise prevents cellular senescence in circulating leukocytes and in the vessel wall. Circulation. 2009; 120(24):2438-47. [PMID]

[17] Ludlow AT, Witkowski S, Marshall MR, Wang J, Lima LC, Guth LM, et al. Chronic exercise modifies age-related telomere dynamics in a tissue-specific fashion. J Gerontol. 2012; 67(9):911-26. [Link]

[18] Kadi F, Ponsot E, Piehl-Aulin K, Mackey A, Kjaer M, Oskarsson E, et al. The effects of regular strength training on telomere length in human skeletal muscle. Med Sci Sports Exerc. 2008; 40(1):82-7. [PMID]

[19] Venturelli M, Morgan GR, Donato AJ, Reese V, Bottura R, Tarperi C, et al. Cellular aging of skeletal muscle: telomeric and free radical evidence that physical inactivity is responsible and not age. Clin Sci. 2014; 127(6):415-21. [PMID]

[20] Ludlow AT, Gratidao L, Ludlow LW, Spangenburg EE, Roth SM. Acute exercise activates p38 MAPK and increases the expression of telomere-protective genes in cardiac muscle. Exp Physiol. 2017; 102(4):397-410. [PMID]

[21] Ludlow AT, Lima LC, Wang J, Hanson ED, Guth LM, Spangenburg EE, et al. Exercise alters mRNA expression of telomere-repeat binding factor 1 in skeletal muscle via p38 MAPK. J Appl Physiol (1985). 2012; 113(11):1737-46. [PMID]

[22] Bahramian A, Mirzaei B, Karimzadeh F, Ramhmaninia F, Gaeini AA, Naderi N, et al. The effects of exercise training intensity on the expression of C/EBPβ and CITED4 in rats with Myocardial Infarction. Asian J Sports Med. 2018; 9(4):e59300. [Link]

[23] Okamoto K, Iwano T, Tachibana M, Shinkai Y. Distinct roles of TRF1 in the regulation of telomere structure and lengthening. J Biol Chem. 2008; 283(35):23981-8. [Link]

[24] Sellami M, Al-Muraikhy S, Al-Jaber H, Al-Amri H, Al-Mansoori L, Mazloum NA, et al. Age and sport intensity-dependent changes in cytokines and telomere length in elite athletes. Antioxidants. 2021; 10(7):1035. [PMID]

[25] Xue HM, Liu QQ, Tian G, Quan LM, Zhao Y, Cheng G. Television watching and telomere length among adults in Southwest China. Am J Public Health. 2017; 107(9):1425-32. [PMID]

[26] Zimowska M, Kasprzycka P, Bocian K, Delaney K, Jung P, Kuchcinska K, et al. Inflammatory response during slow- and fast-twitch muscle regeneration. Muscle Nerve. 2017; 55(3):400-9. [PMID]

[27] Aguiar SS, Sousa CV, Santos PA, Barbosa LP, Maciel LA, Coelho-Júnior HJ, et al. Master athletes have longer telomeres than age-matched non-athletes. A systematic review, meta-analysis and discussion of possible mechanisms. Exp Gerontol. 2021; 146:111212. [PMID]

[28] Ludlow AT, Spangenburg EE, Chin ER, Cheng WH, Roth SM. Telomeres shorten in response to oxidative stress in mouse skeletal muscle fibers. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2014; 69(7):821-30. [PMID]

This Page Intentionally Left Blank