**مقاله پژوهشی**
**مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان**
**دوره ۱۸، آذر ۱۳۹۸، ۸۸۸-۸۷۵**

# اثر همزمان تمرینات ورزشی تناوبی شدید و داربست بدون سلول غشاء مایع آمنیوتیک بر بیان ژنی عوامل تکثیر سلول‌های ماهواره‌ای در آسیب از بین رفتن حجیم عضلانی عضله ساقی قدامی‌در موش صحرایی: یک مطالعه تجربی

**محمدرضا ایزدی[۱]، عبدالحمید حبیبی[۲]، زهرا خدابنده[۳]، مسعود نیکبخت[۴]**

**دریافت مقاله: ۹۸/۱/۲۶ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۸/۲/۲۱ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۸/۴/۴ پذیرش مقاله: ۹۸/۴/۱۱**

**زمینه و هدف:** هدف از پژوهش حاضر تعیین اثر همزمان تمرین تناوبی شدید و استفاده از داربست دسلولار شده غشاء آمنیوتیک بر روی تغییرات بیان ژنی شاخص‌های تکثیر و فعالیت سلول‌های ماهواره‌ای در آسیب از دست رفتن حجیم عضلانی بر روی عضله تیبیالیس قدامی‌موش صحرایی بود.

**مواد و روش‌ها:** در مطالعه تجربی حاضر، پس از تهیه و آماده سازی غشاء آمنیوتیک انسانی و دسلولاریزه کردن آن، آسیب VML (Volumetric muscle loss) بر روی عضله تیبیالیس قدامی ۲۴ سر موش صحرایی انجام شد. موش‌های صحرایی بر اساس دریافت و عدم دریافت داربست غشاء آمنیوتیک به دو گروه ۱۲ تایی تقسیم شدند. سپس هر کدام از گروه‌ها به گروه تمرین تناوبی شدید و بدون تمرین تقسیم شدند. برای بررسی بیان سه ژن *PAX7*، *MyoD1* و *Myogenin* از تکنیک Real-time PCR استفاده شد.

**یافته‌ها:** در بیان ژن *PAX7* در گروه تمرین تناوبی شدید با داربست به ترتیب در مقایسه با گروه تمرین بدون داربست (P=۰/۰۰۴) و دو گروه دیگر (P<۰/۰۰۱) تفاوت معنی داری وجود داشت. در بیان ژن*MyoD1*، گروه تمرین تناوبی شدید به ترتیب با گروه بدون تمرین همراه با داربست (P=۰/۰۵۰) و دو گروه بدون داربست (P<۰/۰۰۱) تفاوت معنی دار داشت. در بیان ژن *Myogenin* گروه تمرین تناوبی شدید به ترتیب با گروه بدون تمرین همراه با داربست (P=۰/۰۳۱) و دو گروه بدون داربست (P<۰/۰۰۱) تفاوت معنی دار داشت.

**نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد ترکیب تمرین تناوبی شدید و قراردادن داربست دسلولار شده غشاء آمنیوتیک، بیان ژن‌های *PAX7*، *MyoD1* و *Myogenin* را بیش‌تر می‌کند و احتمالاً در بازسازی آسیب و زخم‌های حجیم عضلانی بتواند مؤثر باشد.

**واژه‌های کلیدی:** تمرین تناوبی شدید، سلول‌های ماهواره ای، مهندسی بافت، موش صحرایی

۱- (نویسنده مسئول) دکتری فیزیولوژی ورزش، گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
تلفن: ۳۳۳۳۰۰۱-۰۶۱، دورنگار: ۳۳۳۳۰۰۱-۰۶۱، پست الکترونیکی: m-izadi@phdstu.scu.ac.ir
۲- استادگروه آموزشی فیزیولوژی ورزش، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۳- استادیار مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و فن آوری ترانس ژنیک دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
۴- دانشیار گروه آموزشی فیزیولوژی ورزش، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

## مقدمه

آسیب از بین رفتن حجیم عضلانی (Volumetric muscle loss; VML)به از دست دادن حجم بزرگی از عضله اسکلتی اطلاق می‌شود که در شرایط تروما، جراحی، نقص‌های مادرزادی و در جنگ‌های گرم ایجاد می‌شود [۱]. علی‌رغم قدرت بازسازی خود به خودی بافت عضلانی، در آسیب VML به علت حجم زیاد میوفیبریل‌های از بین رفته، بازسازی به مقدار اندک و ناکافی انجام خواهد شد. از روش-های رایج درمان این آسیب، می‌توان به استفاده از فلپ‌های فاشیای پوست و عضله، پیوند عضلانی اشاره کرد [۲]. اما استفاده از این روش‌ها معایبی از جمله پاسخ‌های خود ایمنی بدن و عفونت‌ها را در پی دارد. بنابراین استفاده از روش نوین مهندسی بافت با استفاده از داربست‌های بیولوژیک (Biologic scaffold) می‌تواند جایگزین بسیار مناسبی باشد که محدودیت‌ها و معایب روش‌های رایج را نداشته باشد [۳].

سلول‌های ماهواره‌ای (Satellite cells) سلول‌های بنیادی ساکن عضله اسکلتی هستند که قابلیت خود ترمیمی و تمایز را دارند [۴]. این سلول‌ها که در سطح میوفایبرها در زیر غشاء پایه قرار دارند، در رشد عضلات بعد از تولد دخالت دارند و مسئولیت ترمیم عضلات را بعد از آسیب‌های عضلانی برعهده دارند. این سلول‌ها برای تولید میوبلاست‌ها فعال می‌شود و با تکثیر و تمایز، هسته‌های عضلانی جدید را به - وجود می‌آورد [۵].

پس از فعال سازی سلول‌های ماهواره‌ای، عواملی از حلقه رونویسی مانند *myf-5*، *PAX7* و *MyoD1* منجر به شرکت این عوامل در مراحل تکامل سلول عضله می‌شوند. ابتدا *PAX7* و *MyoD1* در سلول‌های پیش ساز عضله فعال می‌شوند که بیان همزمان این دو عامل به عنوان شاخص فعال شدن سلول‌های ماهواره‌ای شناخته می‌شود. سپس *Myogenin* در سلول‌های تمایز یافته تولید می‌شود [۶-۷].

غشاء آمنیوتیک داخلی‌ترین لایه جفت است که با قوام و استحکام قابل ملاحظه‌ای از پروتئین‌های ساختاری متنوعی ساخته شده است و از آن به عنوان پوشش بیولوژیک برای انواع زخم‌های سطحی سوختگی و سایر موارد استفاده می‌شود دارای حداقل آنتی ژنیسیته است که موجب کاهش احتمال عفونت و افزایش سرعت ترمیم زخم می‌شود [۸-۹]. هم‌چنین بیان شده است غشاء آمنیوتیک بستری است که سلول‌ها به خوبی بر روی آن قرار می‌گیرند و این بستر می‌تواند محیطی را فراهم کند که میزان آنژیوژنز و تراکم مویرگی بافت داربست شده را افزایش دهد که به نوبه خود سبب خون رسانی به بافت جدید، پیش‌گیری از فیبروزیس و بهبود ترمیم بافت می‌گردد [۱۰-۱۲].

بیش‌تر مطالعاتی که تأثیر تمرینات ورزشی را بر سلول‌های ماهواره‌ای بررسی کرده‌اند که افزایش تعداد سلول‌های ماهواره‌ای را در عضلات آسیب دیده بعد از انواع تمرینات ورزشی گزارش کرده‌اند. محققان تمرینات استقامتی و مقاومتی را به عنوان یک راه کار مناسب در بهبود آسیب‌های عضلانی و عملکرد آن‌ها معرفی کرده‌اند [۱۳]. تمرین تناوبی شدید (High-intensity interval training; HIIT) مدل تمرینی خاصی است که شامل تناوب‌های فعالیت ورزشی با شدت زیاد و تناوب‌های استراحتی فعال با شدت کم باشد. گزارش شده است دوره‌های طولانی مدت

HIIT سنتز پروتئین‌های عضلانی را افزایش می‌دهد و نیز با تحریک عوامل رشد، رشد عضلات را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۱۴].

پژوهش‌های کم‌تری به بررسی تمرینات تناوبی شدید پرداخته اند و از اثرات این نوع تمرین به نسبت سایر تمرینات ورزشی بر بهبود شمار و فعال شدن سلول‌های ماهواره‌ای در آسیب‌های عضلانی پرداخته‌اند [۱۵]، اما هنوز سازوکار اثر این نوع تمرین در بهبود تولید پروتئین و هایپرتروفی مشخص نشده است [۱۴]. بررسی‌ها معمولاً در آسیب‌هایی با درجه تخریب کم‌تر بافت عضله بوده است و کم‌تر پژوهشی به بررسی روند تکثیر و تمایز سلول‌های ماهواره‌ای در آسیب VML پرداخته است [۱۶].

اما آیا غشاء امنیوتیک می‌تواند به تنهایی یا با ترکیب مداخله ورزشی تمرین HIIT بر روند تکثیر و تمایز سلول‌های ماهواره ای تأثیر داشته باشد؟. مفروض است تمرینات HIIT با داربست دسلولار شده غشاء آمنیوتیک (Decellularized amniotic membrane) بر روی زخم عمیق آسیب VMLمیزان بیان ژنی فاکتورهای پیش ساز سلول‌های ماهواره ای را در آسیب افزایش می‌دهد. لذا مطالعه حاضر با هدف تعیین اثر هم‌زمان تمرینات HIIT و استفاده از داربست دسلولار شده غشاء آمنیوتیک بر روی تغییرات بیان ژنی شاخص‌های تکثیر و فعالیت سلول‌های ماهواره‌ای در آسیب VML بر روی عضله Tibialis anterior (TA) موش صحرایی انجام شد.

**مواد و روش‌ها**

مطالعه حاضر از نوع تجربی است که در سال ۱۳۹۷ در دانشگاه شهید چمران اهواز انجام پذیرفت. جهت انجام این پژوهش تعداد ۲۴ سر موش صحرایی نر با وزن ۲۲۵ تا ۲۵۰ گرم از مرکز تکثیر حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دام‌پزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز تهیه شد و نگه‌داری آن‌ها در دمای ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتی گراد، رطوبت ۵۰ تا ۶۰ درصد و سیکل روشنایی - تاریکی۱۲:۱۲ در قفس‌های مخصوص با دسترسی آزادانه به آب و غذای استاندارد در همان آزمایشگاه انجام شد. در پژوهش حاضر کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی طبق مصوبه اخلاق در پژوهش دانشگاه شهید چمران اهواز رعایت و اجرا شد. هم‌چنین این مطالعه دارای کد اخلاق از دانشگاه شهید چمران اهواز به شماره ثبتی EE/97.24.370024/scu.ac.ir می‌باشد.

آسیب VML از طریق جراحی در عضله Tibialis anterior (TA) همه ۲۴ موش صحرایی ایجاد شد. موش‌های صحرایی بر اساس دریافت داربست غشاء آمنیوتیک به دو گروه بدون داربست (گروه کنترل منفی) (n=۱۲) و با داربست (n=۱۲) تقسیم شدند. در گروه کنترل منفی، بعد از ایجاد VML فاشیا و پوست اطراف زخم بدون انجام هیچ مورد خاصی بخیه زده شد و زخم بسته شد. اما در گروه داربست دسلولار شده غشاء آمنیوتیک انسانی (Decellularized human amniotic membrane; dHAM) بعد از قرار گرفتن دولایه غشاء دسلولار شده بر روی زخم، فاشیا و پوست اطراف زخم بخیه و بسته می‌شود. بعد از گذشت دو هفته از جراحی و ریکاوری، موش‌های صحرایی هر گروه به دو گروه بدون تمرین و گروه HIIT تقسیم شدند

(در مجموع چهار گروه شش تایی). سپس گروه تمرین به مدت هشت هفته به تمرین بر روی تردمیل پرداخت. در نهایت موش‌های صحرایی برای بافت برداری و بقیه مراحل ابتدا با بی‌هوشی عمومی و سپس با استفاده از محفظه ایزوله $CO_2$ کشته شدند [۱۷].

غشاء آمنیوتیک انسانی که پس از عمل جراحی سزارین از مادران سالم گرفته و به بیمارستان سوانح و سوختگی حضرت امیرالمومنین (ع) شیراز منتقل شده بود، تهیه شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد غشاء به آزمایشگاه منقل شد. جهت زدودن خون و سایر مواد چسبیده به غشا، بافت سه بار با محلول PBS (Buffered phosphate saline) شستشو داده شد. سپس غشاء سلول دار در محلول ۷۵ درصد الکل و آب قرار گرفت و با PBS حاوی penicillin-streptomycin به مدت ۲۴ ساعت (با تعویض هر ۱۲ ساعت یک بار) جهت استریله شدن قرار داده شد. غشاء سلول دار جهت فرآیند سلول زدایی در محلول ۱ درصد Triton X-100 به مدت ۱۴ ساعت، در محلول lipase PBS به مدت ۱۰ ساعت و در DNAase PBS به مدت ۳ ساعت نگه‌داری شد. در نهایت غشاء سلول زدایی شده به قطعات ۲ ×۲ سانتی متر برش داده شد و در ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد [۱۸].

جهت تشخیص بدون سلول شدن داربست غشاء آمنیوتیک از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) استفاده شد. به این صورت که پس از سلول زدایی، هسته-های سلول در رنگ‌آمیزی دیده نشد. نمونه‌های برداشت شده توسط فرمالین ۱۰ درصد به مدت ۲۴ ساعت تثبیت و بلوک‌های پارافینی تهیه شد. پس از برش توسط میکروتوم، نمونه‌ها توسط هماتوکسیلین برای رنگ‌آمیزی هسته‌ها و بعد از شستشو با ائوزین رنگ‌آمیزی شدند و در انتها به‌وسیله میکروسکوپ نوری Nikon E-200 microscope (Nikon, Tokyo, Japan) بررسی شدند.

جهت سنجش ژن‌های مورد پژوهش و استخراج RNA از بافت و سنتز cDNA ۲۴ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرین، موش‌ها به وسیله تزریق درون صفاقی کتامین (۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) بی‌هوش شدند. سپس بافت عضله TA با غشاء آمنیوتیک برش عرضی زده شد و بلافاصله در نیتروژن ۲۰- منجمد و برای سنجش بیان ژنی در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. جهت سنجش بیان ژن از روش Real-time PCR استفاده شد.

ابتدا cDNA (Qiagen, Hilden, Germany) سنتز شده برای ژن‌های مورد پژوهش با ۴۰ میکرو لیتر RNase & DNase -free water رقیق شد. ۱/۵ میکرولیتر از هر یک از رقت‌ها به همراه ۷/۵ میکرولیتر Tli RNaseH Master Mix (Plus, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) و یک میکرولیتر از پرایمرها Forward و یک میکرولیتر از پرایمر Backward در چهار میکرولیتر آب فاقد نوکلئاز (Nuclease –free Water) برای رسیدن به حجم نهایی ۱۵میکرولیتر به خوبی حل و مخلوط شد. تمام واکنش‌ها به شکل دوتایی (دابلیکیت) انجام شد. درنهایت میکروتیوپ‌ها در محل مخصوص خود در دستگاه قرار داده شد و واکنش‌های تکثیر در طی ۴۰ سیکل بر اساس دستورالعمل سازنده کیت انجام شد. واکنش تکثیر هر یک از ژن‌های مورد نظر در مطالعه نیز، همان‌طورکه در

بالا ذکر گردید انجام شد با این اختلاف که واکنش تکثیر فقط برای یک رقت از نمونه (رقت بهینه) الگو انجام شد. جهت بررسی تغییرات بیان ژن، ژن‌های مورد نظر نیز واکنش qRT-PCR به همان ترتیب که گفته شد انجام شد. برای کنترل داخلی از ژن *GAPDH* استفاده شد و جهت کنترل کیفی محصول واکنش *GAPDH* مربوط به نمونه بر روی ژل دو درصد انتقال داده شد و از نظر وجود و یا عدم وجود محصول بررسی شد. توالی پرایمرها در جدول ۱ نشان داده شده است [۱۹].

***جدول ۱- توالی پرایمری ژن‌های مورد مطالعه حاضر***

| ژن | | توالی پرایمر ('5 → '3) | اندازه (bp) |
|---|---|---|---|
| *Pax7* | Forward | GGTGTGAGGGTTAGTAGAAAGA | **291** |
| | Reserve | AAAAAATTCAAACAAACAAACACT | |
| *MyoD1* | Forward | TAGGAATTGGGATATGGAGTTTT | **309** |
| | Reserve | TTACAAACCCACAACAAACAAC | |
| *Myogenin* | Forward | CTACCTTCCTGTCCACCTTC | **164** |
| | Reserve | CTCCAGTGCATTGCCCCACT | |
| *GAPDH* | Forward | GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA | **109** |
| | Reserve | TTGAGGTCAATGAAGGGGTC | |

پس از آشناسازی موش‌های صحرایی به مدت ۱ هفته با تردمیل (Iran Danesh Salar Iranian model, Tehran) با سرعت ۵ متر در دقیقه، به مدت ۵ دقیقه در ۵ جلسه، آزمون ظرفیت ورزشی در موش‌های صحرایی، دو روز قبل از شروع برنامه تمرینی و انتهای هر هفته انجام شد. موش‌های صحرایی ابتدا به مدت ۱۰ دقیقه با شدت ۱۰ متر در دقیقه مرحله گرم کردن را انجام دادند. سپس آزمون فزآینده ورزشی آغاز شد و هر دو دقیقه سرعت تردمیل ۰/۰۳ متر در ثانیه به طور خودکار افزایش یافت تا زمانی که موش‌های صحرایی قادر به ادامه فعالیت ورزشی نبودند. با توجه به نمودار سرعت دویدن و اکسیژن مصرفی در مطالعه Høydal و همکاران، حداکثر اکسیژن مصرفی هر موش محاسبه شد. فاصله دویده شده توسط هر موش صحرایی نیز به عنوان شاخص ظرفیت ورزشی در نظر گرفته شد و نهایتاً شدت تمرین در هر هفته، ۰/۰۲ متر در ثانیه افزایش یافت [۲۰]. پروتکل تمرینی شامل هشت هفته تمرین تناوبی شدید بود. برنامه تمرینی روی تردمیل طراحی شده ویژه حیوانات پنج روز در هفته بود که جزئیات آن در جدول ۲ ارائه شده است [۲۱].

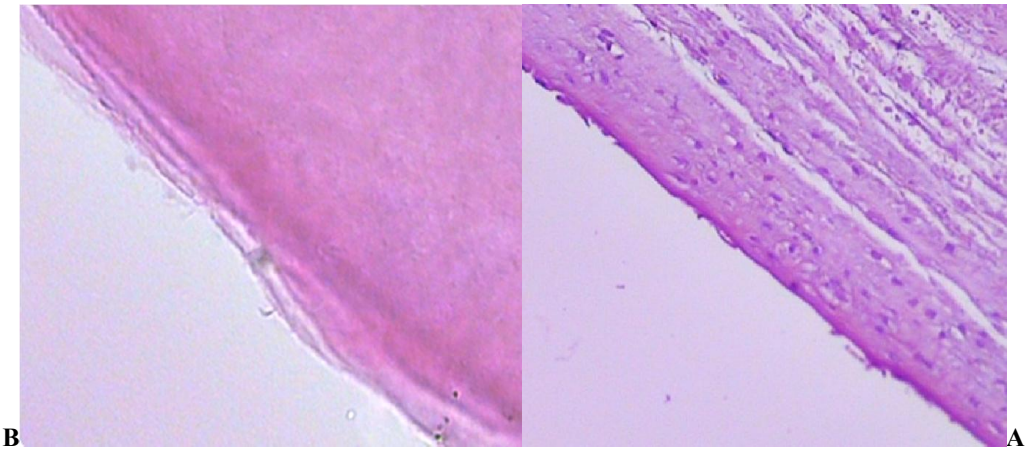
*جدول ۲- برنامه هشت هفته‌ای تمرین تناوبی شدید در موش‌های صحرایی*

| | گرم کردن | تناوب شدید | تناوب کم شدت | سرد کردن |
|---|---|---|---|---|
| زمان تمرین (دقیقه) | ۵ دقیقه | ۴ دقیقه | ۲ دقیقه | ۵ دقیقه |
| شدت تمرین (درصد VO2max) | ۵۰ تا ۶۰ درصد | ۸۵ تا ۹۰ درصد | ۵۰ تا ۶۰ درصد | ۴۰ تا ۵۰ درصد |

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۴ محاسبه و تحلیل شد. برای تشخیص طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون Kolmogorov-Smirnov و برای تعیین تجانس واریانس‌ها از آزمون levene استفاده شد. کمی‌سازی بیان ژن‌های مورد نظر توسط فرمول $^{-\Delta\Delta ct}$ ۲ و مقادیر تغییرات چند برابری محاسبه شد. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی Tukey تجزیه و تحلیل شدند. داده‌ها به صورت انحراف استاندارد ± میانگین گزارش شدند. سطح معنی‌داری در آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. همه نمودارها با استفاده از نرم افزار Graph pad prism نسخه ۸ رسم شد.

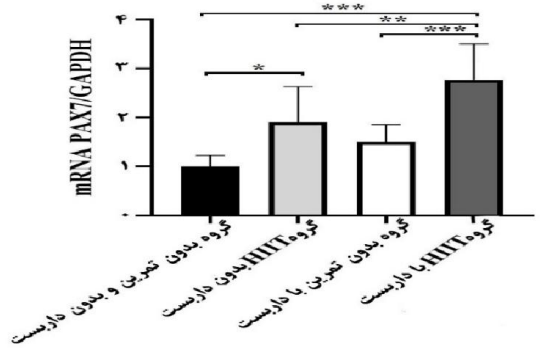
## نتایج

رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین از غشاء آمنیوتیک با سلول و دسلولار شده که در شکل قابل ملاحظه است، نشان می‌دهد فرآیند سلول‌زدایی با موفقیت انجام شده است.




*شکل ۱- رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین از غشاء آمنیوتیک با سلول (A) و دسلولار شده (B).*

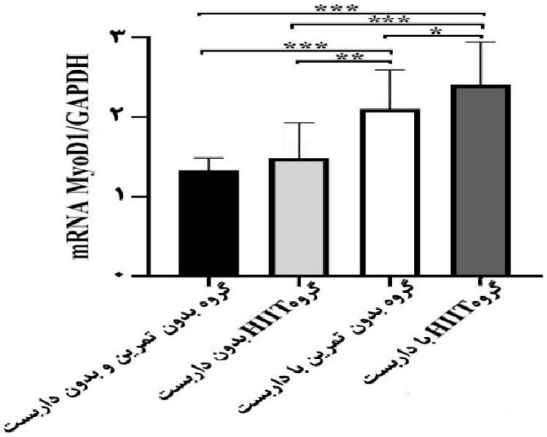
در بیان ژن *PAX7* در گروه تمرین تناوبی شدید با داربست به ترتیب در مقایسه با گروه تمرین بدون داربست (P=۰/۰۰۴) و دو گروه دیگر (P<۰/۰۰۱) تفاوت معنی‌دار مشاهده شد. در مقایسه گروه‌های بدون داربست نیز شاهد تفاوت معنی‌دار در گروه تمرین تناوبی شدید با گروه بدون تمرین مشاهده شد (P=۰/۰۲۲).




***شکل ۲- میزان تغییرات mRNA ژن PAX7 در گروه‌های بدون داربست و با داربست با مداخله پروتکل تمرین تناوبی شدید و بدون برنامه تمرینی. روش آماری: آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی Tukey. نمودار به صورت انحراف معیار ± میانگین رسم شده است.***

***P < ۰/۰۵, **P<۰/۰۱, ***P <۰/۰۰۱**

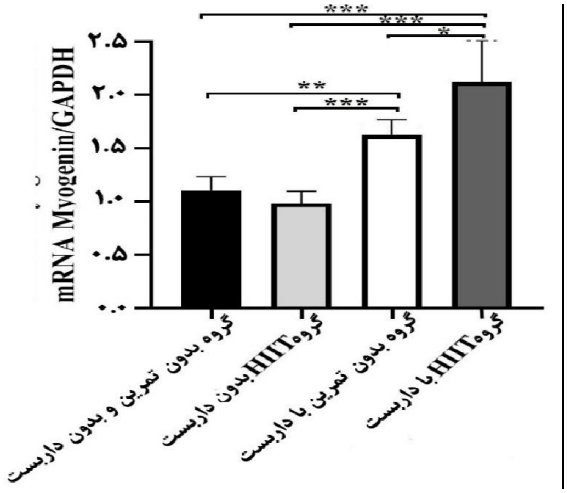
در بیان ژن *MyoD1* گروه تمرین تناوبی شدید به ترتیب با گروه بدون تمرین همراه با داربست (P=۰/۰۵۰) و دو گروه بدون داربست (P<۰/۰۰۱) تفاوت معنی‌دار داشت. همچنین گروه بی تمرین با داربست به ترتیب با گروه تمرین بدون داربست (P=۰/۰۰۴) و گروه بی تمرین بدون داربست (P<۰/۰۰۱) تفاوت معنی‌دار داشت.




***شکل ۳- میزان تغییرات mRNA ژن MyoD1 در گروه‌های بدون داربست و با داربست با مداخله پروتکل تمرین تناوبی شدید و بدون برنامه تمرینی. روش آماری: آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی Tukey. نمودار به صورت انحراف معیار ± میانگین رسم شده است.***

***P < ۰/۰۵, **P<۰/۰۱, ***P <۰/۰۰۱**

در بیان ژن *Myogenin* گروه تمرین تناوبی شدید به ترتیب با گروه بدون تمرین همراه با داربست (P=۰/۰۳۱) و دو گروه بدون داربست (P<۰/۰۰۱) تفاوت معنی‌دار داشت. همچنین گروه بی تمرین با داربست به ترتیب با گروه تمرین بدون داربست (P<۰/۰۰۱) و گروه بی تمرین بدون داربست (P=۰/۰۰۲) تفاوت معنی‌دار داشت.




***شکل ۴- میزان تغییرات mRNA ژن Myogenin درگروه‌های بدون داربست و با داربست با مداخله پروتکل تمرین تناوبی شدید و بدون برنامه تمرینی. روش آماری: آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی Tukey. نمودار به صورت انحراف معیار ± میانگین رسم شده است.***

***P < ۰/۰۵, **P<۰/۰۱, ***P <۰/۰۰۱**

## بحث

مطالعه حاضر به مطالعه اثر هم‌زمان تمرینات ورزشی تناوبی شدید و داربست دسلولار شده غشاء آمنیوتیک بر میزان فعالیت و تکثیر سلول‌های ماهواره‌ای در آسیب VML عضله ساقی قدامی‌موش‌های صحرایی پرداخت. یافته‌های پژوهش نشان داد بیان ژنی مارکرهای بیان کننده تکثیر و فعالیت سلول‌های ماهواره‌ای هم متأثر از فعالیت ورزشی تناوبی شدید و هم متأثر از داربست غشاء آمنیوتیک

می‌باشد. ضمن این‌که ترکیب تمرین HIIT و داربست بهترین عملکرد را در بیان ژنی هر سه شاخص نشان داد. در *MyoD1* و *Myogenin* به عنوان شاخص بلوغ و فعالیت سلول‌های ماهواره‌ای شاهد بیان ژنی معنی‌دار در گروه‌های بدون تمرین با داربست غشاء آمنیوتیک با سایر گروه‌های بدون داربست بودیم که به نوبه خود به تأثیر داربست بیولوژیک غشاء آمنیوتیک در زایش و تکثیر سلول‌های ماهواره‌ای اشاره دارد. در *PAX7* به عنوان ابتدایی‌ترین شاخص حضور و زایش سلول‌های ماهواره‌ای در بافت‌های آسیب دیده، شاهد اثر بخشی جداگانه تمرین تناوبی شدید نسبت به گروه بی‌تمرین بودیم که هم‌راستا با مطالعات پیشینی است که این نوع برنامه تمرینی را در بهبود رشد و زایش سلول‌های ماهواره‌ای مؤثر دانسته‌اند.

غشاء آمنیوتیک با ساختار کلاژنی، اینتگرینی و لامیلاری خود در زمانی که دسلولار یا آسلولار می‌شود شرایط مناسبی برای جای‌گذاری یا Seeding سلول‌ها ایجاد می‌کند و سلول-ها زمانی که رو یا درون این ساختار لانه گزینی می‌کنند، بهتر می‌توانند تغذیه شوند و رشد کنند [۲۳-۲۲]. از طرف دیگر گزارش شده است در زیر یا درون غشاء آمنیوتیک دسلولار شده شبکه‌های مویرگی متراکم بیش‌تری شکل می‌گیرند که به نوبه خود خون رسانی را به موضع آسیب دیده بیش‌تر می‌کنند و موجب افزایش رشد و فعالیت بیش‌تر سلول‌های بنیادی و در نتیجه ترمیم بافت آسیب دیده می‌شود [۲۵-۲۴].

علاوه بر عوامل رشدی و ایمنی که هنگام آسیب از عضلات آسیب دیده آزاد می‌شود و موجب فعال‌سازی سلول‌های ماهواره‌ای می‌گردد، گزارش شده است تمرینات HIIT با سازوکاری ویژه موجب افزایش سطوح نیتریک اکساید [۲۶] و در پی آن سبب فعال شدن فاکتور رشد کبدی (Hepatogenic growth factor; HGF) می‌شود که یکی از عوامل اصلی شروع کننده مسیر سیگنالی فعال شدن سلول‌های ماهواره ای است [۲۸-۲۷].

همان گونه که قبلاً بیان شد تمرینات HIIT با برخورداری از خاصیت تولید پروتئین و افزایش نسبت DNA به حجم سیتوپلاسم موجب افزایش تعداد سلول‌های ماهواره‌ای می‌شوند [۱۵] که این شاخصه در مطالعه حاضر با *PAX7* نشان داده شده است. هم‌چنین سلول‌های ماهواره‌ای به وسیله عوامل خارجی مانند انواع فاکتورهای رشدی و ایمنی تنظیم می‌شوند که در این میان Pugh و همکاران افزایش سطوح mRNA فاکتور رشدی PGC1-α را در ترکیب تمرینات HIIT و مقاومتی گزارش کردند [۲۹]. Biglari و همکاران نیز کاهش بیان ژنی میوستاتین (به عنوان یک شاخص ایمنی مؤثر در فعال شدن سلول‌های ماهواره‌ای) موش‌های صحرایی با هشت هفته تمرین HIIT را گزارش کردند [۱۴]. از دیگر مکانیسم اثرهای تمرینات HIIT، تحریک آنژیوژنز در بافت‌های آسیب دیده عضلانی می‌باشد. که این امر سبب رشد بیش‌تر سلول‌های ماهواره‌ای و ترمیم بیش‌تر بافت آسیب دیده می‌شود [۳۱-۳۰].

علی رغم مطالعات اندک در زمینه اثرات هم‌زمان تمرینات ورزشی و داربست‌ها بر روند ترمیم عضلانی و تکثیر سلول های بنیادی، Quarta و همکاران با تداخل یک برنامه ۴ هفته ای تمرینات اختیاری چرخ دوار در آسیب VML در موش، در بخشی از روش مطالعه‌اشان مقادیر پروتئین‌های *PAX7* و *MyoD* را در سلول‌های بنیادی عضله اسکلتی انسان که برای تولید داربست کشت داده بودند در فلوسایتومتری مورد بررسی قرار دادند. این دو پروتئین در ایمونوسایتوشیمی‌نیز ملاحظه شد و نشان داد داربست به سمت تولید عضله پیش رفته است. بنابراین سنتز این دو پروتئین با افزایش بیان ژنی در نتایج مطالعه حاضر همسو است. البته تفاوت عمده این مطالعه با مطالعه حاضر در نوع داربست و نحوه تمرین بود [۳]. گزارش‌های دیگری نیز از فعال شدن عوامل فعال کننده سلول‌های ماهواره‌ای در غیاب داربست و با انجام تمرینات HIIT در گروه‌های حیوانی وجود دارد که نشان دهنده نقش تمرینات HIIT و سازو کارهای آن در فعال کردن سلول‌های ماهواره‌ای و عوامل پیش ساز این سلول‌ها می‌باشد [۳۱-۳۰].

از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به عدم دسترسی به نمونه‌های انسانی نام برد. از دیگر محدودیت‌های پژوهش حاضر عدم استفاده از روش وسترن بلات برای اطمینان از سنتز پروتئین ژن‌های مورد مطالعه بود که علت عدم بررسی، کمبود بودجه پژوهش بوده است. عدم بررسی روش‌های رنگ‌آمیزی سطح مقطع عرض بافت (Cross sectional area; CSA) و بررسی آنژیوژنز نیز از دیگر محدودیت‌های مطالعه حاضر بوده است. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده از نمونه های انسانی با جراحی‌های ارتوپدی و یا با آسیب‌های عمقی در محیط بالینی داربست غشاء آمنیوتیک با استفاده از سلول های بنیادی تمایز یافته به عضله کشت داده شود و روند ترمیم با ابزارها و روش‌های نوین بررسی شود.

## نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، ترکیب تمرین HIIT و قراردادن یک لایه داربست دسلولار شده غشاء آمنیوتیک، بیان ژنی شاخص‌های تکثیر و فعالیت سلول‌های ماهواره‌ای را بیش‌تر می‌کند و احتمالاً در بازسازی بیش‌تر آسیب و زخم‌های عمیق عضلانی بتواند مؤثر باشد. خود غشاء آمنیوتیک نیز به تنهایی با ویژگی‌های منحصر به فرد خود شرایط مناسب‌تری را برای رشد و تغذیه سلول‌های ماهواره ای ایجاد می‌کند. هر چند لازم است مطالعات بیش‌تری در شرایط بالینی و با ترکیب سلول‌های بنیادی تمایز یافته با ابزارهای دقیق‌تری انجام پذیرد.

### تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر برگرفته از رساله دکتری نویسنده مسئول می‌باشد. از اعضای محترم هیئت علمی‌دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، آقایان دکتر نداف و دکتر تابنده که در جراحی و نگه داری بافت حیوانات ما را یاری نمودند کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

# References


[1] Wu X, Corona BT, Chen X, Walters TJ. A standardized rat model of volumetric muscle loss injury for the development of tissue engineering therapies. *Bioresearch Open Access* 2012; 1(6): 280-90.

[2] Kesireddy V. Evaluation of adipose-derived stem cells for tissue-engineered muscle repair construct-mediated repair of a murine model of volumetric muscle loss injury. *International Journal of Nanomedicine* 2016; 8(11): 1461.

[3] Quarta M, Cromie M, Chacon R, Blonigan J, Garcia V, Akimenko I et al. Bioengineered constructs combined with exercise enhance stem cell-mediated treatment of volumetric muscle loss. *Nature Communications* 2017; 20(8): 15613.

[4] Morgan JE, Zammit PS. Direct effects of the pathogenic mutation on satellite cell function in muscular dystrophy. *Experimental Cell Research* 2010; 316(18): 3100-8.

[5] Neal A, Boldrin L, Morgan JE. The satellite cell in male and female, developing and adult mouse muscle: distinct stem cells for growth and regeneration. *PloS One* 2012; 7(5): e37950.

[6] Wen Y, Bi P, Liu W, Asakura A, Keller C, Kuang S. Constitutive Notch activation upregulates Pax7 and promotes the self-renewal of skeletal muscle satellite cells. *Molecular And Cellular Biology* 2012; 32(12): 2300-11.

[7] Bentzinger CF, Wang YX, Rudnicki MA. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives In Biology* 2012; 4(2): a008342.

[8] Fatemi MJ, Khajerahimi AA, Nikoumaram B, Sakhaei M, Mostafavi S, Atashi A et al. Amniotic membrane seeded with mesenchymal adipose-derived stem cell for coverage of wound in third degree burn: An experimental study. *Tehran University Medical Journal TUMS Publications* 2014; 72(6): 367-78.

[9] Delo DM, De Coppi P, Bartsch Jr G, Atala A. Amniotic fluid and placental stem cells. *Methods in Enzymology Elsevier* 2006. p. 426-38.

[10] Fouad H, Sabry D, Elsetohy K, Fathy N. Therapeutic efficacy of amniotic membrane stem cells and adipose tissue stem cells in rats with chemically induced ovarian failure. *Journal of Advanced Research* 2016; 7(2): 233-41.

[11] Gholipourmalekabadi M, Sameni M, Radenkovic D, Mozafari M, Mossahebi□Mohammadi M, Seifalian A. Decellularized human amniotic membrane: how viable is it as a delivery system for human adipose tissue□derived stromal cells? *Cell Proliferation* 2016; 49(1): 115-21.

[12] Song M, Wang W, Ye Q, Bu S, Shen Z, Zhu Y. The repairing of full-thickness skin deficiency and its biological mechanism using decellularized human amniotic membrane as the wound dressing. *Materials Science and Engineering: C* 2017; 77: 739-47.

[13] Bazgir B, Fathi R, Valojerdi MR, Mozdziak P, Asgari A. Satellite cells contribution to exercise mediated muscle hypertrophy and repair. *Cell Journal (Yakhteh)* 2017; 18(4): 473.

[14] Biglari S, Gaeini AA, Kordi MR, GhardashiAfousi A. The Effect of 8 Weeks High-intensity Interval Training on Myostatin and Follistatin Gene Expression in Gastrocnemius Muscle of the Rats. *Journal of Arak University of Medical Sciences* 2018; 21(1): 1-10.

[15] Behzad B, Asgari A. The Interactive Role Of Exercise And Satellite Cells In Skeletal Muscle Regeneration And Hypertrophy 2015. 27(2): 1-10.

[16] Sicari BM, Rubin JP, Dearth CL, Wolf MT, Ambrosio F, Boninger M et al. An acellular biologic scaffold promotes skeletal muscle formation in mice and humans with volumetric muscle loss. Science translational medicine. 2014; 6(234): 234ra58-ra58.

[17] Boivin GP, Hickman DL, Creamer-Hente MA, Pritchett-Corning KR, Bratcher NA. Review of CO2 as a euthanasia agent for laboratory rats and mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 2017; 56(5): 491-9.

[18] Shi P, Gao M, Shen Q, Hou L, Zhu Y, Wang J. Biocompatible surgical meshes based on

decellularized human amniotic membrane. *Materials Science and Engineering: C* 2015; 54: 112-9.

[19] Sugden D, de Winter P. Quantification of mRNA using real time RT-PCR. *Molecular Biomethods Handbook. Springer* 2008. p. 149-68.

[20] Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen Ø. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation* 2007; 14(6): 753-60.

[21] Kraljevic J, Marinovic J, Pravdic D, Zubin P, Dujic Z, Wisloff U et al. Aerobic interval training attenuates remodelling and mitochondrial dysfunction in the post-infarction failing rat heart. *Cardiovascular Research* 2013; 99(1): 55-64.

[22] Kehe K, Abend M, Ridi R, Peter RU, van Beuningen D. Tissue engineering with HaCaT cells and a fibroblast cell line. *Archives of Dermatological Research* 1999; 291(11): 600-5.

[23] Lineen E, Namias N. Biologic dressing in burns. *Journal of Craniofacial Surgery* 2008; 19(4): 923-8.

[24] Machingal MA, Corona BT, Walters TJ, Kesireddy V, Koval CN, Dannahower A et al. A tissue-engineered muscle repair construct for functional restoration of an irrecoverable muscle injury in a murine model. *Tissue Engineering Part A* 2011; 17(17-18): 2291-303.

[25] Turner NJ, Badylak SF. Regeneration of skeletal muscle. *Cell and Tissue Research* 2012; 347(3): 759-74.

[26] Fallahi A, Gaeini A, Shekarfroush S, Khoshbaten A. Cardioprotective effect of high intensity interval training and nitric oxide metabolites (NO2−, NO3−). *Iranian Journal of Public Health* 2015; 44(9): 1270.

[27] Wozniak AC, Pilipowicz O, Yablonka-Reuveni Z, Greenway S, Craven S, Scott E et al. C-Met expression and mechanical activation of satellite cells on cultured muscle fibers. *Journal of*

[30] Cocks M, Wagenmakers AJ. The effect of different training modes on skeletal muscle microvascular density and endothelial enzymes controlling NO availability. *The Journal of Physiology* 2016; 594(8): 2245-57.

[31] Hoier B, Passos M, Bangsbo J, Hellsten Y. Intense intermittent exercise provides weak stimulus for vascular endothelial growth factor secretion and capillary growth in skeletal muscle. *Experimental Physiology* 2013; 98(2): 585-97.

*Histochemistry & Cytochemistry* 2003; 51(11): 1437-45.

[28] Tatsumi R, Hattori A, Ikeuchi Y, Anderson JE, Allen RE. Release of hepatocyte growth factor from mechanically stretched skeletal muscle satellite cells and role of pH and nitric oxide. *Molecular Biology of The Cell* 2002; 13(8): 2909-18.

[29] Pugh JK, Faulkner SH, Turner MC, Nimmo MA. Satellite cell response to concurrent resistance exercise and high-intensity interval training in sedentary, overweight/obese, middle-aged individuals. *European Journal of Applied Physiology* 2018; 118(2): 225-38.

# Simultaneous Effect of High Intensity Interval Training and Decellularized Amniotic Membrane Fluid Scaffold on Gene Expression of Cell Proliferation Factors of Satellite Cells in the Volumetric Muscle Loss Injury in the Tibialis Anterior of Rats: An Experimental Study

**M. R. Izadi[1], A. Habibi[2], Z. Khodabandeh[3], M. Nikbakht[4]**

**Received: 15/04/2019 Sent for Revision: 11/05/2019 Received Revised Manuscript: 25/06/2019 Accepted: 02/07/2019**

**Background and Objectives:** The purpose of the present study was to determine the simultaneous effect of high intensity interval training and decellularized amniotic membrane scaffold on gene expression of cell proliferation factors of satellite cells in the volumetric muscle loss injury in the tibialis anterior of rats.

**Materials and Methods:** In this experimental study, after preparation of human amniotic membrane and its decellularization process, volumetric muscle loss (VML) on the tibialis anterior muscle was performed on 24 rats. The rats were divided into two groups of 12 according to receiving and not receiving amniotic membrane scaffold. Each group was then divided into High-Intensity Interval Training (HIIT) and untreated groups. Real-time PCR technique was used to examine the gene expression of the three *PAX7, MyoD1* and *Myogenin* genes.

**Results:** There was a significant difference in the gene expression of *PAX7* in the HIIT group with scaffolds compared to the non-scaffold training group ($p=0.004$) and the other two groups ($p<0.001$). In the gene expression of *MyoD1*, the HIIT group was significantly different from the sedentary group with scaffold ($p=0.050$) and the two groups without scaffold ($p<0.001$), respectively. In the gene expression of *Myogenin*, the HIIT group was significantly different from the sedentary group with scaffold ($p=0.031$) and the two groups without scaffold ($p<0.001$), respectively.

**Conclusion:** The results showed that the combination of HIIT and insert of decellularized amniotic membrane scaffold increases the gene expression of *PAX7, MyoD1* and *Myogenin* and may be effective in the regeneration of volumetric muscle loss injury.

**Key words:** High-intensity interval training, Satellite cells, Tissue engineering, Rats

**Funding:** This study did not have any funding.

**Conflict of interest:** None declared.

**Ethical approval:** The Ethics Committee of Shahid Chamran University of Ahvaz approved the study (EE/97.24.370024/scu.ac.ir).

**How to cite this article:** Izadi M R, Habibi A, Khodabandeh Z, Nikbakht M. Simultaneous Effect of High Intensity Interval Training and Decellularized Amniotic Membrane Fluid Scaffold on Gene Expression of Cell Proliferation Factors of Satellite Cells in the Volumetric Muscle Loss Injury in the Tibialis Anterior of Rats: An Experimental Study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2019; 18 (9): 875-88. [Farsi]

*1- PhD in Exercise Physiology, Dept. of Sport Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, ORCID: 0000-0001-8356-8563*

*(Corresponding Author) Tel: (061) 33330010, Fax: (061) 33330010, E-mail: m-izadi@phdstu.scu.ac.ir,*

*2- Prof., Dept. of Sport Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, ORCID: 0000-0002-9593-920x*

*3- Assistant Prof., Stem Cell and Transgenic Technology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran, ORCID:0000-0003-2276-2674*

*4- Associate Prof., Dept. of Sport Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, ORCID: 0000-0002-9375-0550*