

Effect of Simulated Microgravity Condition on Cells Proliferation and Myostatin Gene Expression in Differentiated Skeletal Muscle Cells (C2C12)

Narjes Rahmanian¹, Azadeh Hekmat^{2*} and Zahra Hajebrahimi³

1. M.Sc., Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Assistant Professor, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3. Associate Professor, Aerospace Research Institute, Ministry of Science Research and Technology, Tehran, Iran

*Corresponding Author's E-mail: hekmat@ut.ac.ir

Abstract

Muscle atrophy is one of the problems that astronauts face after returning to earth. Myostatin is a known negative regulator of muscle growth. This study aimed to investigate the effects of simulated microgravity condition on mouse myotube cells (C2C12) growth and the myostatin gene expression. The morphological studies and MTT cytotoxicity assay showed no significant alternation in cells after 48h simulation microgravity, however, after 72h ~40% of cell death accrued ($p < 0.05$). The AO/PI staining and DNA fragmentation analysis confirmed this observation too. Analysis of the gene expression revealed that simulated microgravity reduced myostatin gene expression significantly after 48h ($p < 0.0001$), however, after 72h, increased significantly ($P < 0.001$). So, inhibition of myostatin expression in differentiated myocyte cells of astronauts could be an effective procedure to reduce skeletal muscle atrophy under microgravity condition.

Keywords: Muscle atrophy, Mouse myotube cells, Microgravity, Cell's growth assay, Myostatin



COPYRIGHTS

© 2022 by the authors. Published by Aerospace Research Institute. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of [the Creative Commons Attribution 4.0 International \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

How to cite this article:

N. Rahmanian, A. Hekmat, Z. Hajebrahimi, "Effect of Simulated Microgravity Condition on Cells Proliferation and Myostatin Gene Expression in Differentiated Skeletal Muscle Cells (C2C12)," *Journal Space Science and Technology*, Vol. 15, No. 2, pp. 81-92, 2022 (in Persian), <https://doi.org/10.30699/jsst.2021.1346>.

اثرات میکروگراویتی شبیه‌سازی شده بر بقای سلولی و بیان ژن میوستاتین در سلول‌های تمایز یافته عضله اسکلتی C2C12

نرجس رحمانیان^۱، آزاده حکمت^{۲*} و زهرا حاج ابراهیمی^۳

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- پژوهشگاه هوافضا، وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، تهران، ایران

* ایمیل نویسنده مخاطب: hekmat@ut.ac.ir

چکیده

آتروفی عضلانی از جمله مشکلاتی است که فضانوردان پس از بازگشت به زمین با آن مواجه هستند. پروتئین میوستاتین به عنوان یک مهارکننده رشد عضلات شناخته شده است. هدف این مطالعه بررسی تأثیر شرایط میکروگراویتی شبیه‌سازی شده بر بقای سلول‌های میوتوب موش (C2C12) و بیان ژن میوستاتین بود. مطالعات مورفولوژیک و آزمون MTT تأثیر اندک ۴۸ ساعت قرارگیری در شرایط میکروگراویتی بر رشد سلولی و ۴۰ درصد کاهش رشد سلولی ($p < 0.05$) پس از ۷۲ ساعت را نشان داد. نتایج حاصل از رنگ آمیزی و الگوی قطعه‌قطعه شدن DNA افزایش آپاپتوز سلول‌ها را پس از ۷۲ ساعت قرارگیری در شرایط میکروگراویتی نشان داد. بیان ژن میوستاتین پس از ۴۸ ساعت کاهش ($p < 0.0001$) و پس از ۷۲ ساعت افزایش ($P < 0.001$) یافت. بنابراین، مهار بیان میوستاتین در سلول‌های میوتوب می‌تواند یک اقدام مؤثر در کاهش عوارض مخرب آتروفی عضله اسکلتی در شرایط میکروگراویتی در فضانوردان باشد. نتایج حاصل از این مطالعه می‌تواند به فضانوردان جهت کاهش اثرات منفی شرایط میکروگراویتی کمک کند.

واژه‌های کلیدی: آتروفی عضله، سلول‌های میوتوب موش، ریزجاذبه (میکروگراویتی)، سنجش بقای سلولی، میوستاتین

علائم و اختصارات

MSTN	میوستاتین
C2C12	سلول‌های ماهیچه‌ای تمایز یافته
GAPDH	گلیسر آلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز

مقدمه

بشر از دیرباز به دنبال تسخیر فضا بوده است. یکی از مهم‌ترین ویژگی‌هایی که محیط فضا را از محیط زمین متمایز می‌کند، نبود جاذبه

یا شرایط میکروگراویتی است. در شرایط میکروگراویتی نیروی گرانش نسبت به سطح زمین کمتر می‌باشد. فضانوردان در محیط میکروگراویتی فضا، تغییرات فیزیولوژیکی متفاوتی را تجربه می‌کنند [۱]. بنابراین، پروازهای فضایی از طریق تغییر در ساختار سلولی و یا عملکردهای سلولی، اثرات مخرب خود را بر فضانوردان اعمال می‌کند. از دیگر سو، شرایط فضایی به دلیل نبود جاذبه شرایط منحصر به فردی را برای دانشمندان فراهم می‌کند تا به بررسی و مطالعه فرآیندهای زیستی بپردازند. از آنجاکه انجام آزمایشات در محیط بی وزنی مستلزم هزینه‌های بسیاری می‌باشد، محققان از محیط‌های شبیه‌سازی شده

استفاده می‌کنند. برای مطالعه واکنش ارگانوسم‌ها در برابر تغییر بردار جاذبه از دستگاه کلبونوستات یا ماشین موقعیت‌یابی تصادفی استفاده می‌شود. نتایج آزمایشات پیشین نشان داده است که این دستگاه‌ها از کیفیت بالای سطح شبیه‌سازی برخوردار است، به طوری که تقریباً نتایج با محیط واقعی بی‌وزنی برابر است [۲]. نتایج مطالعات سلولی در محیط شبیه‌سازی شده و واقعی میکروگروایی حاکی از آن است که تغییرات در ساختار اسکلت سلولی، مورفولوژی سلول، آپتوز، مسیرهای سیگنالینگ و رشد و تمایز سلولی رخ می‌دهد. همچنین، در سطح مولکولی تغییر در بیان ژن‌ها گزارش شده است [۳، ۴]. عمده این تغییرات که ناشی از سازش فرد با شرایط جدید محیط است، در فضا مشکلی برای فضاانوردان ایجاد نمی‌کند اما پس از بازگشت به زمین فضاانورد را با مشکلات عدیده‌ای مواجه می‌سازد. برخی از این تغییرات پس از بازگشت به زمین به سرعت به حالت اول برگشته اما در مورد برخی دیگر بازگشت به حالت اول به کندی صورت می‌گیرد و یا ممکن است هرگز به حالت اول برنگردد [۵]. از جمله این تغییرات آتروفی عضلات و ماهیچه‌هاست.

حرکت یکی از مهم‌ترین اعمال بدن است که به وسیله استخوان‌ها و عضلات انجام می‌شود. عضله بافت نرمی است که در اکثر حیوانات یافت می‌شود. عضله مخطط را به علت چسبیده‌بودن آن‌ها به استخوان‌ها، عضله اسکلتی و به جهت عملکرد ارادی بودن آن‌ها، عضلات ارادی می‌نامند. سلول‌های عضله مخطط چون از بهم پیوستن تعداد زیادی سلول سازنده عضلانی (میوبلاست) به وجود می‌آیند، بسیار بلند می‌باشند و رشته‌های عضلانی نامیده می‌شوند. عضلات اسکلتی حدود ۴۵ درصد از توده بدنی را شامل می‌شوند و مهم‌ترین اندام برای مصرف گلوکز تحت تأثیر تحریکات انسولین است که با تولید ATP انرژی لازم را برای حرکت بدن انسان فراهم می‌کند [۶]. عضله اسکلتی به عنوان محلی برای ذخیره اسیدهای آمینه عمل می‌کند که در صورت افزایش تقاضا یا کمبود منابع می‌تواند برای تولید انرژی استفاده شود و اگر نیازهای متابولیکی بیشتر از سنتز پروتئین باقی بماند، توده عضلانی از بین می‌رود و موجب ایجاد آتروفی عضلانی شوند.

از علل آتروفی عضلات می‌توان به عدم تحرک، پیری، سوء تغذیه، برخی بیماری‌های سیستمیک (سرطان، نارسایی احتقانی قلب، بیماری انسدادی مزمن ریوی، ایدز و بیماری کبدی)، تخریب پوست و داروها مانند گلوکوکورتیکوئیدها اشاره کرد [۷]. شبکه پیچیده‌ای از مسیرهای سیگنالینگ اندازه میوفیبرها و عملکرد انقباضی عضله را تنظیم می‌کند. در هنگام آتروفی عضله، سیستم‌های پروتئولیتیک فعال شده و پروتئین‌های انقباضی و اندامک‌ها از بین می‌روند که منجر به جمع‌شدگی الیاف عضله می‌شود. مسیرهای یوبی کوئیتین - پروتازوم و مسیرهای اتوفازی - لیزوزوم دو سیستم پروتئولیتیک مهم سلولی کنترل‌کننده تجدید پروتئین در عضلات هستند. یکی از دیگر مهم‌ترین مسیرهای تنظیم‌کننده سنتز پروتئین در عضله اسکلتی، مسیر پیام‌رسانی میوستاتین - Smad است.

میوستاتین (MSTN) که عضوی از خانواده TGFβ است، عمدتاً توسط عضله اسکلتی بیان و ترشح می‌شود و به‌عنوان تنظیم‌کننده منفی رشد عضلات عمل می‌کند [۸]. میوستاتین با نام فاکتور تمایز و رشد ۸ (GDF8) نیز شناخته می‌شود. این ژن یک پروتئین ۳۷۶ اسید آمینه‌ای (PDB = 5NTU) را رمزگذاری می‌کند [۹]. میوستاتین انسانی از دو زیر واحد یکسان تشکیل شده است. توالی پروتئین میوستاتین در جایگاه فعال مولکول در بیشتر گونه‌ها شناخته شده است و درجه بالایی از حفظ توالی اسیدهای آمینه به ویژه در منطقه C-انتهایی را نشان می‌دهد [۱۰]. مقایسه توالی اسیدهای آمینه پروتئین میوستاتین در انسان و موش ۹۰ درصد با یکدیگر مشابه هستند. ژن میوستاتین در انسان بر روی کروموزوم شماره ۲ (GeneID=2660) و در موش خانگی، بر روی کروموزوم شماره ۱ (Gene ID: 17700) قرار گرفته است. در تمامی گونه‌ها این ژن دارای ۳ اگزون و ۲ اینترون می‌باشد. محصول پردازش ژن میوستاتین یک گونه منفرد از mRNA حدود ۳/۱ کیلو بازی است [۱۱]. میوستاتین در عضله اسکلتی ساخته می‌شود و پس از سنتز در عضله وارد خون می‌شود و در سطح سلولی عضلانی به گیرنده‌اش (اکتیوین IIb) در تارهای عضلانی پیوند می‌خورد و منجر به افزایش بیان p21 (مهارکننده سایکلین‌های چرخه سلولی)، کاهش فاکتورهای تنظیمی میوژنیک از جمله میوزین، مهار، تکثیر و تمایز سلول‌های اقماری (سلول‌های تنظیم‌کننده رشد عضله) بعد از تولد شده و با فعال‌سازی مسیر پیام‌رسانی میوستاتین - Smad رشد عضله اسکلتی را مهار کرده و باعث آتروفی عضله می‌شود [۱۲].

آتروفی عضلانی ناشی از میکروگروایی و تأثیر آن بر سلامت و عملکرد فضاانوردان یک مسئله بسیار مهم است. از بین رفتن مداوم ماهیچه‌ها می‌تواند منجر به مرگ فضاانوردان شود. مکانیسم دقیق ایجاد آتروفی در فضاانوردان به صورت کامل مشخص نیست. بنابراین بررسی بیان ژن‌های آتروفی در شرایط میکروگروایی شبیه‌سازی شده می‌تواند به شناخت مکانیسم و توسعه رویکردهای درمانی کمک شایانی کند. هدف از این پژوهش، بررسی تأثیر شرایط میکروگروایی شبیه‌سازی شده بر بقای سلولی و همچنین بیان ژن میوستاتین در سلول‌های ماهیچه‌ای تمایز یافته (C2C12) است.

مواد و روش‌ها

مواد

تریپسین (Trypsin-EDTA، [3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide) MTT، پنی‌سیلین (Penicilin) و استرپتومایسین (Streptomycin) از شرکت سیگما آلد ریج (آمریکا) خریداری شدند. محیط کشت DMEM و سرم جنین گاوی (FBS: Fetal Bovine Serum) از شرکت Gibco

کلینوستات خارج شد. ۲۵ میکرولیتر رنگ MTT به تمام چاهک‌هایی که قبلاً سلول در آن‌ها کشت داده شده بود، اضافه شد و پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. بعد از گذشت زمان انکوباسیون، به هر کدام از چاهک‌ها ۵۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد و پلیت‌ها به مدت ۱ ساعت در شرایط مشابه شرایط کشت سلول قرار داده شد. سپس، جذب نوری با استفاده از اندازه‌گیری شد. مقادیر جذب نوری (OD) برای هر چاهک توسط دستگاه ELISA reader الیزا ریدر Model Expert 96, Asys Hitchch (ساخت استرالیا)، در طول موج ۶۳۰ نانومتر قرائت شد و از هر سه تکرار میانگین گرفته و در نهایت نمودار رسم شد.

رنگ آمیزی AO/PI

روش‌های مختلفی برای سنجش میزان آپاپتوز و نکروز در سلول‌ها وجود دارد که یکی از روش‌های آن بررسی با نشر فلورسانت است. در این روش از رنگ آکریدین نارنجی (AO) و پروپیدوم یدید (PI) استفاده می‌شود. برای این منظور محیط کشت رویی فلاسک حاوی سلول خارج و بعد از جدا کردن سلول‌ها با آنزیم تریپسین، محتویات سلول در فالكون ریخته و سانتریفیوژ شد. سلول‌ها دو بار با PBS شسته شد. سپس، غلظت مناسبی از رنگ مخلوط شده AO/PI (۵ mg/ml) به همراه PBS به سلول‌ها اضافه شد. سلول‌ها در زیر میکروسکوپ فلورسانس Axoscope 2 plus fluorescence microscopy (ساخت آلمان) مشاهده و نسبت سلول‌های مرده به زنده محاسبه شد.

استخراج RNA

برای استخراج RNA از محلول RNX استفاده شد. محیط رویی فلاسک خارج و ۱ ml RNX به سلول‌ها اضافه و محتویات درون فلاسک به میکروتیوب ۲ ml منتقل شد. به مدت ۵ تا ۱۰ ثانیه ورتکس صورت گرفت و بعد از آن سلول‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم به میکروتیوب اضافه شد و به مدت ۱۵ ثانیه به خوبی میکس صورت گرفت. نمونه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد روی یخ انکوبه شد. سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰ rpm، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد انجام شد. فاز رویی جدا و به یک میکروتیوب ۲ ml منتقل و به مقدار مساوی از آن ایزوپروپانول اضافه شد. نمونه را به خوبی میکس کرده و به مدت ۱۵ دقیقه، انکوباسیون روی یخ صورت گرفت. به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد، سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰ rpm انجام شد. مایع رویی دور ریخته و ۱ ml اتانول ۷۵٪ به آن اضافه و بعد از ورتکس به مدت ۸ دقیقه سانتریفیوژ در دور ۷۵۰۰ rpm انجام شد. مایع رویی دور ریخته و رسوب خشک شد. ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به رسوب اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد صورت گرفت تا رسوب کاملاً حل شود. میکروتیوب حاوی RNA در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

Invitrogen (آمریکا) خریداری شدند. رنگ فلورسانس PI از شرکت IQ product (هلند) خریداری شد. رده سلولی تمایز نیافته C2C12 (ATCC® CRL-1772™) از مرکز تحقیقات فناوری بن یاخته (ایران) خریداری شد. کیت سنتز cDNA، SYBR Green Master Mix، 1ml، RNX-Plus، 25ml-RN7713C و مارکر وزن مولکولی از شرکت پارس توس (ایران) تهیه شد.

کشت سلول‌ها و تمایز آنها

سلول‌های تمایز نیافته ماهیچه‌ای C2C12 (تک لایه و چسبنده با 2n=40) در محیط کشت حاوی DMEM، FBS ۱۰ درصد و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین / استرپتومایسین در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵٪ CO₂ در کشت داده شدند. محیط کشت درون فلاسک خارج شد. سپس، ۲ میلی‌لیتر PBS به فلاسک افزوده شده و پس از ۲ بار شستشو خالی و سپس به مدت ۳ تا ۴ دقیقه در معرض آنزیم تریپسین انکوبه شد. پس از آن، ۲ برابر محلول تریپسین، محیط کشت حاوی سرم به فلاسک افزوده شده و محتویات فلاسک به فالكون ۱۵ ml منتقل شد و به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ محیط رویی را دور ریخته و پلت سلولی باقی مانده را با زدن ضربه از کف فالكون جدا کرده و سپس ۱ میلی‌لیتر محیط کشت به آن اضافه شد و به خوبی سمپلینگ صورت گرفت. در مرحله بعد، ۲۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون را روی لام گذاشته و با میکروسکوپ تعداد سلول‌ها شمارش شد. به منظور تمایز سلول‌ها، پس از رسیدن سلول‌ها به تعداد مورد نیاز (۸۰ درصد رشد)، محیط فلاسک‌ها برداشته و دور ریخته شد. محیط کشت تمایز جهت تبدیل سلول‌های میوبلاست به میوتیوب به فلاسک‌ها اضافه شد. هر ۲ روز یکبار محیط کشت قدیمی با محیط کشت جدید جایگزین شد [۱۳]. محیط کشت تمایز شامل DMEM، سرم اسب و آنتی‌بیوتیک بود.

شبیه‌سازی شرایط میکروگراویتی

برای شبیه‌سازی شرایط میکروگراویتی از دستگاه کلینوستات دو بعدی (2D clinostat) موجود در پژوهشگاه هوافضا استفاده شد. سیستم کلینوستات شامل دو قاب است که یکی در داخل دیگری جاسازی شده است و هر کدام توسط موتورهای مستقل هدایت می‌شود. این دستگاه از طریق چرخش از تأثیر گرانش بر سلول‌ها جلوگیری می‌کند. سرعت چرخش دستگاه ۲۰ دور در دقیقه است. نمونه‌های میکروگراویتی ۴۸ و ۷۲ ساعت روی دستگاه کلینوستات در داخل انکوباتور و نمونه‌های کنترل با همان شرایط در داخل انکوباتور قرار گرفت.

آزمون MTT

بعد از گذشت ۴۸ و ۷۲ ساعت از زمان تیمار، نمونه‌ها از دستگاه

سنتز cDNA

پس از استخراج RNA با خلوص و غلظت بالا، مراحل سنتز cDNA مطابق پروتکل شرکت سازنده انجام شد [۱۴]. ابتدا نمونه RNA به میزان ۲ میکرولیتر با ۱۰ میکرولیتر بافر، ۶ میکرولیتر آب و ۲ میکرولیتر آنزیم در داخل میکروتیوب عاری از RNA مخلوط شد. کلیه مراحل روی یخ انجام شد. نمونه‌ها اسپین و به داخل دستگاه ترموسایکلر منتقل شد. نمونه‌ها در ۳ مرحله متوالی انکوبه شدند. مرحله اول به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، مرحله دوم به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۷ درجه سانتی گراد و مرحله سوم به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد انجام شد. پس از اتمام کار cDNA سنتز شده برای مراحل بعدی کار در فریزر -۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

طراحی پرایمر

توالی FASTA یا همان کتابخانه cDNA ژن‌ها از وب سایت NCBI استخراج شد. سپس، توسط نرم‌افزارهای Oligo7 و Primer3 طراحی پرایمر صورت گرفت. پس از اصلاح دستی پرایمر با استفاده از نرم‌افزارهای نامبرده نتیجه در وب سایت NCBI بلاست شد تا اختصاصی بودن و اتصال پرایمر مورد تایید قرار بگیرد. پرایمرهای بدست آمده برای ژن BDNF و GAPDH در جدول (۱) آمده است.

تکنیک Real time PCR

جهت بررسی سطوح بیان ژن از روش کمی Real time PCR استفاده شد. ابتدا برای هر ژن یک master mix تهیه شد. میکروتیوب‌های حاوی master mix اسپین و به مقدار ۹ میکرولیتر از هر لوله به داخل استریپ‌های Real time PCR منتقل شد. سپس، در هر گروه یک میکرولیتر cDNA مورد نظر اضافه شد. نمونه‌ها در داخل دستگاه Real time PCR قرار داده شد. ۳۵ سیکل برای هر چرخه Real time PCR در نظر گرفته و دماهای هر سیکل شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه تنظیم شد. تشکیل منحنی ذوب در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. جهت بررسی محصولات PCR از ژل الکتروفورز آگارز ۱ درصد استفاده شد. سپس، از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ جهت کمی‌سازی میزان بیان ژن و تعیین fold change استفاده شد.

روش بررسی قطعه قطعه شدن DNA

به منظور بررسی قطعه قطعه شدن به الیگونوکلیتوزوم در سلول‌های آپاتوتیک از روش الکتروفورز با ژل آگارز استفاده شد. ابتدا سلول‌ها با PBS شستشو داده شد. ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده به همراه ۵۰ میکرولیتر پروتئیناز K به داخل فلاسک ریخته و سلول‌ها از کف فلاسک جدا شد. محتویات فلاسک داخل میکروتیوب ۱/۵ ml

منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شد. ۵۰۰ میکرولیتر فنل به نمونه‌ها اضافه و مخلوط شد. نمونه‌ها به مدت ۱۳ دقیقه با دور RCF ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول رویی به آرامی خارج و به میکروتیوب جدید منتقل شد. مقدار برابر با مایع رویی، کلروفرم به نمونه اضافه و تکان داده شد. نمونه‌ها به مدت ۱۱ دقیقه با دور RCF ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ و مایع رویی به میکروتیوب دیگری منتقل شد. ۸ برابر مایع رویی ایزوپروپانول و ۰/۱ برابر آن، سدیم استات به نمونه‌ها اضافه شد. سپس، تیوب به آرامی چند بار اینورت کرده تا کلاف DNA مشاهده شود. نمونه به مدت ۱۰ دقیقه، با دور RCF ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد تا کلاف DNA در ته تیوب رسوب کند. محلول رویی دو ریخته و رسوب با الکل ۷۰ درصد شستشو داده شد. نمونه ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد تا کاملاً خشک شود. DNA رسوب داده شده در ۳۰ میکرولیتر بافر TE حل شد. پس از آماده‌سازی نمونه‌ها، پلیت مخصوص نانودراپ باز شده و نمونه‌های DNA بارگذاری شد. چاهک‌های بالا با نمونه Blank که شامل حلال است، پر شد. سپس، به ترتیب در چاهک‌های دیگر نمونه‌های DNA مورد نظر بارگذاری شد. همچنین، پلیت در دستگاه قرار گرفت و نرم افزار Gene5 اجرا شد. در نهایت، با انتخاب گزینه Read دستگاه شروع به تاباندن نور و خواندن جذب نمونه‌ها کرد. سپس، الکتروفورز با ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام شد. برای این منظور نمونه‌های DNA با بافر لودینگ به نسبت ۵ به ۱ مخلوط و درون چاهک‌ها بارگذاری شد. الکتروفورز در بافر TBE 1X و در جریان ۷۰ میلی آمپر به مدت ۱ ساعت انجام شد.

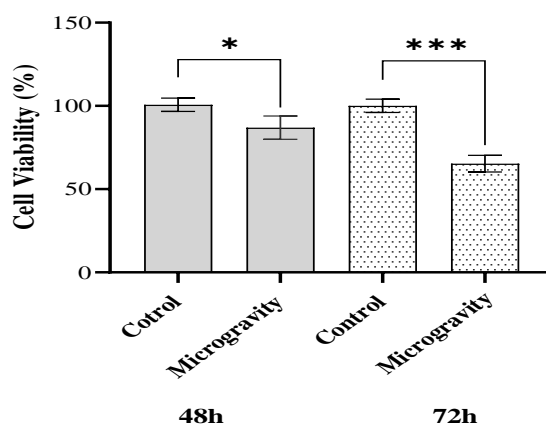
بررسی آماری داده‌ها

نرم‌افزار Step one software v2.3، جهت خوانش نمونه‌های دستگاه Real time PCR و نرم افزار GraphPad Prism ورژن ۹ جهت ترسیم نمودارها به کار گرفته شد. سپس سطح معناداری با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism و آنالیز ANOVA (one-way analysis of variance) محاسبه شد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای طراحی شده

Genes	Primer Sequences	اندازه محصول PCR
GAPDH F	5'-ACCCAGAAGACTGTGGATGG-3'	171bp
GAPDH R	5'-CACATTGGGGGTAGGAACAC-3'	
MSTN F	5'-CTGTAACCTCCCAGGACCA-3'	197bp
MSTN R	5'-TCTTTTGGGTGCGATAATCC-3'	

با فعالیت میتوکندری در ارتباط است. در این روش تشکیل رنگ ارغوانی به عنوان نشانگر سلول‌های زنده مورد استفاده قرار می‌گیرد. زنده‌مانی سلول‌ها پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت قرارگرفتن در شرایط میکروگراویتی شبیه‌سازی شده، ارزیابی شد (شکل ۲). نتایج حاصل نشان داد که شرایط میکروگراویتی شبیه‌سازی شده پس از ۴۸ ساعت تأثیر اندکی بر میزان مرگ سلول‌های میوتوبی دارد. حال آنکه ۷۲ ساعت قرارگیری در شرایط میکروگراویتی موجب ۴۰ درصد کاهش رشد سلول‌ها می‌شود ($P < 0.001$).



شکل ۲- درصد بقای سلول‌های C2C12 پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون در شرایط میکروگراویتی شبیه‌سازی شده در مقایسه با گروه کنترل (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$)

رنگ آمیزی سلول‌ها با آکریدین اورنج/پروپیدیوم یدید برای بررسی آپتوز و نکروز

آکریدین نارنجی (AO) و پروپیدیوم یدید (PI)، رنگ‌های متصل شونده به اسید نوکلئیک هستند که می‌توانند برای اندازه‌گیری میزان زنده ماندن سلول استفاده شوند. از آنجاکه AO قابل نفوذ به سلول است، هسته تمام سلول‌های زنده رنگ فلورسانس سبز تولید می‌کنند. PI تنها سلول‌های با غشاهای از بین رفته را رنگ می‌کند و بنابراین هسته سلول‌های در حال مرگ، مرده یا نکروتیک با رنگ فلورسانس قرمز دیده می‌شوند. به عبارتی سلول‌های به رنگ سبز سالم هستند. سلول‌های به رنگ سبز روشن همراه با کروماتین متراکم و قطعه قطعه در فاز آپتوز اولیه و سلول‌های دارای رنگ قرمز با کروماتین متراکم و قطعه قطعه در فاز آپتوز ثانویه هستند و سلول‌هایی که دارای هسته نرمال، متورم و قرمز رنگ هستند نکروز یافته‌اند [۱۵]. رنگ آمیزی AO/PI در شرایط کنترل و میکروگراویتی انجام شد. تصاویر میکروسکوپ فلورسانس نشان داد که سلول‌های میوتوب C2C12، پس از ۴۸ ساعت انکوبه شدن در شرایط شبیه‌سازی میکروگراویتی در مقایسه با گروه کنترل، میزان آپتوز (اولیه و ثانویه) ناچیز و در حدود ۱۰ درصد دارند. همچنین میزان نکروز در این

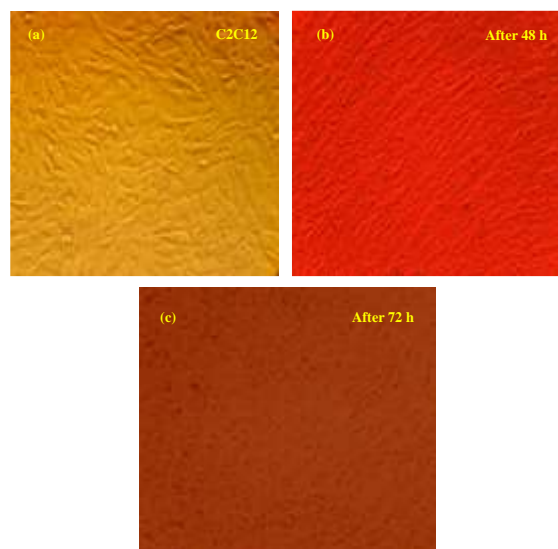
نتایج

تمایز سلول‌های C2C12

سلول‌های C2C12 یک زیرکلاس از سلول‌های میوبلاست موش است که از یک جمعیت خالص از سلول‌های میوژنیک تشکیل شده است. این سلول‌ها یک الگوی قابل اعتماد برای مطالعه مکانیسم‌های عضله اسکلتی هستند. سلول‌های C2C12 به صورت تمایز نیافته هستند که آن‌ها را میوبلاست و شکل تمایز یافته میوبلاست‌ها را میوتوب می‌نامند. با افزودن محیط کشت تمایز، پس از گذشت ۴ روز تقریباً تمام سلول‌ها به میوتوب (طول و کشیده) تمایز یافتند (شکل ۱).

مشاهده سلول‌ها با میکروسکوپ نوری

تغییرات مورفولوژیک سلول‌های میوتوب C2C12 پس از قرار گرفتن در شرایط میکروگراویتی شبیه‌سازی شده به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت، با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌های ماهیچه‌ای C2C12 تحت شرایط میکروگراویتی دچار تغییر شکل شدند و از حالت طول و کشیده به شکل کروی در آمدند. پس از ۷۲ ساعت قرارگیری در شرایط میکروگراویتی، تعداد بیشتری از سلول‌ها کروی شدند (شکل ۱c).



شکل ۱- سلول‌های C2C12 پس از قرارگیری در شرایط میکروگراویتی، (a) سلول‌ها در شرایط جاذبه طبیعی، (b) سلول‌ها پس از ۴۸ ساعت قرارگیری در شرایط میکروگراویتی و (c) سلول‌ها پس از ۴۸ ساعت قرارگیری در شرایط میکروگراویتی (بزرگمایی ۴۰X).

بررسی میزان تکثیر سلولی در شرایط میکروگراویتی شبیه‌سازی شده با تست MTT

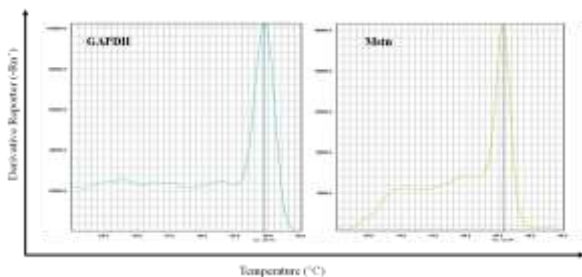
اساس تست MTT مبتنی بر فعالیت میتوکندری در سلول‌های زنده است و بنابراین افزایش یا کاهش تعداد سلول‌های زنده به صورت خطی

منحنی‌های دمای ذوب پرایمرها

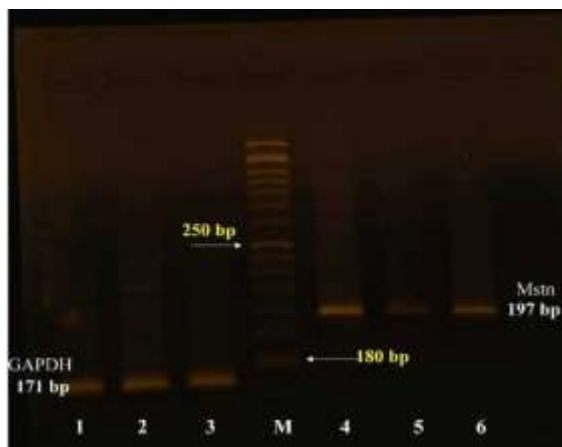
جهت تایید محصولات ایجاد شده از PCR نمودارهای دمای ذوب برای ژن‌های GAPDH و Mstn پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت قرارگیری سلول‌ها در شرایط میکروگروایتی به دست آمد. وجود تک قله ماکزیمم در آن‌ها بیانگر طراحی پرایمرها با بالاترین کیفیت و اختصاصی بودن پرایمرها است (شکل ۵).

الکتروفورز محصول PCR

هدف از الکتروفورز بیومولکول‌ها، جداسازی آن‌ها براساس وزن مولکولی و برخی اوقات بر اساس بار است که بر اثر این جداسازی هر یک از بیومولکول‌های با وزن یکسان به شکل باند در ژل الکتروفورز نمایان می‌شوند. محصولات PCR، با الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد و باندهای تشکیل شده حضور ژن‌های مورد نظر را تأیید کرد (شکل ۶).



شکل ۵- منحنی ذوب real time PCR برای ژن GAPDH و Mstn

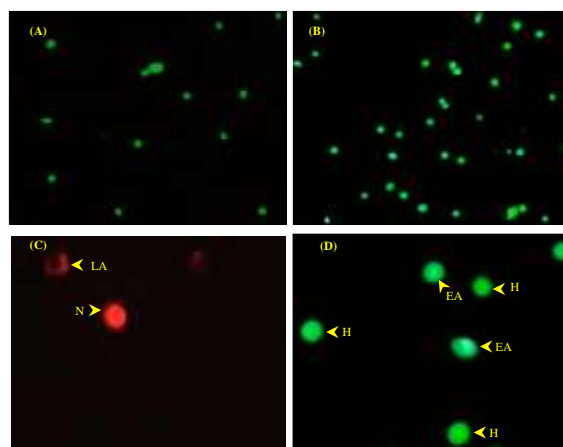


شکل ۶- الکتروفورز محصولات PCR. ژن GAPDH (۱۷۱، ۱۷۳، ۱۷۴)، ژن Mstn (۴، ۵، ۶) و مارکر (M).

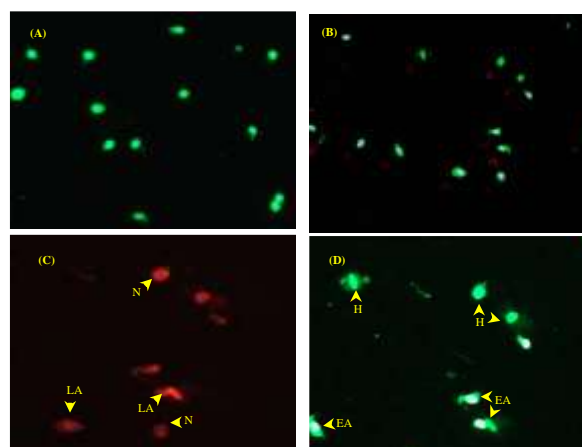
تغییرات بیان ژن میوستاتین

برای بررسی میزان تغییرات در بیان ژن میوستاتین پس از قرارگرفتن سلول‌های میوتوب C2C12 به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت در شرایط میکروگروایتی شبیه‌سازی شده، استخراج RNA و سنتز cDNA انجام شد (شکل ۷). نتایج Real time PCR نشان داد بیان ژن میوستاتین

سلول‌ها به میزان بسیار کم قابل مشاهده بود (شکل ۳). این در حالی است که پس از ۷۲ ساعت قرار گرفتن در شرایط میکروگروایتی، ۳۰ درصد سلول‌ها دچار آپوپتوز اولیه شدند و ۱۰ درصد سلول‌ها در فاز آپاپتوز ثانویه بودند (شکل ۴). این در حالی است که میزان نکروز اندکی در سلول‌ها پس از ۷۲ ساعت قرارگیری در شرایط میکروگروایتی دیده شد. همچنین، میزان سلول‌های نکروز یافته پس از ۷۲ ساعت قرارگیری در شرایط میکروگروایتی نسبت به سلول‌های قرار گرفته در شرایط میکروگروایتی پس از ۴۸ ساعت تفاوت چندانی نداشت.



شکل ۳- تصاویر میکروسکوپ فلورسانس از سلول‌های C2C12 در جاذبه طبیعی پس از ۴۸ ساعت (A)، قرارگرفته در شرایط میکروگروایتی شبیه‌سازی شده پس از ۴۸ ساعت (B)، ارزیابی میزان آپاپتوز و نکروز سلول‌ها پس از ۴۸ ساعت با بزرگنمایی بیشتر (C) و (D): H=سالم، EA=آپاپتوز اولیه، LA=آپاپتوز ثانویه و N=نکروز



شکل ۴- تصاویر میکروسکوپ فلورسانس از سلول‌های C2C12 در جاذبه طبیعی پس از ۷۲ ساعت (A)، قرارگرفته در شرایط میکروگروایتی شبیه‌سازی شده پس از ۷۲ ساعت (B)، ارزیابی میزان آپاپتوز و نکروز سلول‌ها پس از ۷۲ ساعت با بزرگنمایی بیشتر (C) و (D): H=سالم، EA=آپاپتوز اولیه، LA=آپاپتوز ثانویه و N=نکروز

بحث

در سال‌های اخیر، اثرات مستقیم میکروگروایتی در سیستم‌های زیستی بسیار چالش برانگیز بوده است. مشخص شده است که میکروگروایتی می‌تواند عملکردهای زیستی و ساختاری را در انواع مختلف سلول‌ها تغییر دهد [۱۶]. قرار گرفتن در معرض میکروگروایتی می‌تواند باعث علائم بی‌اشتهایی، استفراغ، حالت تهوع و سردرد شود که به آن بیماری حرکت فضایی نیز گفته می‌شود. البته، بدن فضاوردان می‌تواند طی ۴۸ تا ۷۲ ساعت با این شرایط سازگار شوند [۱۷]. مطالعه بر روی فضاوردان در پرواز فضایی کوتاه مدت، بروز آتروفی عضلات و از دست رفتن ظرفیت عملکردی را نشان داده است. بنابراین، مطالعات بسیاری جهت جلوگیری یا محدود کردن آتروفی عضلات در فضاوردان در حال انجام است. برای دستیابی به این هدف، شناخت مکانیسم‌های سلولی و مولکولی دخیل در سلول‌های ماهیچه‌ای بسیار مهم خواهد بود. آتروفی عضله اسکلتی بر اثر تعداد زیادی از بیماری‌های مزمن ایجاد می‌شود و روند پیری میلیون‌ها نفر از بیماران و سالمندان را تسهیل می‌کند. با این حال، تحلیل عضلات ممکن است مستقل از بیماری‌های مزمن و افزایش سن، مانند پرواز فضایی یا استراحت طولانی مدت در رختخواب اتفاق بیافتد. تحلیل ماهیچه در فضا با سرعت بیشتری رخ می‌دهد. تحلیل عضلات می‌تواند تأثیر منفی مستقیم بر عملکرد عضلات داشته باشد. یکی از اهداف اصلی تحقیقات ناسا، مطالعه و دستیابی به درک واضح از تغییرات ناشی از میکروگروایتی در فرآیندهای بیولوژیکی به ویژه سیستم‌های تأثیرگذار در سیستم عصبی عضلانی است [۱۸].

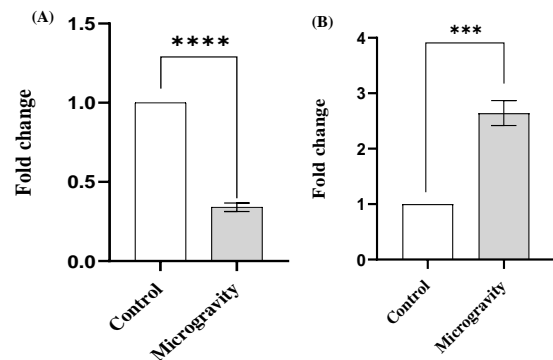
تمام شکل‌های حیاتی تحت نیروی ثابت جاذبه بر روی زمین تکامل یافته‌اند. در فضا، نیروهای برشی، همرفت شناور و فشار هیدرواستاتیک از بین رفته یا به شدت کاهش می‌یابد. در شرایط میکروگروایتی، تعادل بین ساختار سلول و نیروی خارجی بر هم می‌خورد و در نتیجه در سطح سلولی و زیرسلولی به عنوان مثال اسکلت سلولی، انتقال سیگنال و نفوذپذیری غشای تغییراتی ایجاد می‌شود [۱۹].

قرارگرفتن طولانی مدت در معرض میکروگروایتی می‌تواند تعادل هوموستاتیک بسیاری از سیستم‌های بیولوژیکی از جمله سیستم اسکلتی عضلانی را مختل کند. مشاهدات نشان داده است که پروازهای فضایی از شکل‌گیری طبیعی عضله جلوگیری می‌کند، در نتیجه باعث کاهش سرعت سنتز پروتئین، افزایش کاتابولیسم و کاهش قابل توجه توده، اندازه و قدرت عضلانی و در نهایت آتروفی عضلانی می‌شود. بنابراین، به نظر می‌رسد قرار گرفتن عضله اسکلتی در معرض میکروگروایتی بیان ژن‌های متعدد و فعالیت آنزیم‌های متعددی را تعدیل می‌کند و همچنین باعث ایجاد تغییرات ژنتیکی می‌شود. فضاوردان در فضا چندین ساعت در روز تمرینات مقاومتی را برای مقابله با تحلیل رفتن عضلات و از دست دادن استخوان انجام می‌دهند

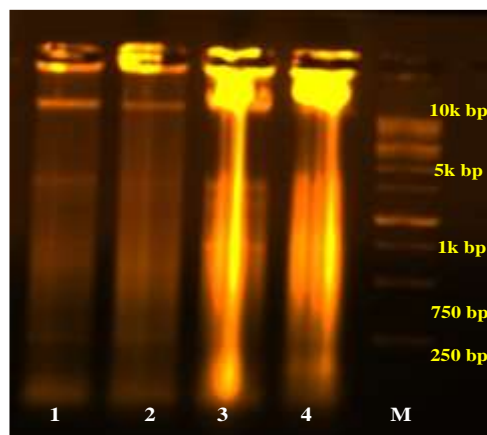
نسبت به گروه کنترل پس از قرار گرفتن سلول‌های تمایز یافته C2C12 در شرایط میکروگروایتی شبیه‌سازی شده به مدت ۴۸ ساعت، کاهش معناداری می‌یابد ($p < 0.0001$). حال آنکه پس از ۷۲ ساعت، افزایش معناداری در بیان ژن میوستاتین نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ($P < 0.001$).

بررسی میزان آپاپتوز و قطعه قطعه شدن DNA

آپاپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، مکانیسم مهم در هوموستاز سلولی است. محرک‌های بیولوژیک و پاتولوژیک سبب ایجاد آپاپتوز می‌شوند. برای بررسی آپاپتوز از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود. قطعه قطعه شدن DNA یک رویداد اولیه آپاپتوز است که منجر به مرگ سلولی می‌شود. برای بررسی آپاپتوز در شرایط میکروگروایتی، از آزمون قطعه‌قطعه شدن DNA استفاده شد. همانطور که در شکل (۶) مشاهده می‌شود، میکروگروایتی شبیه‌سازی شده پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت نسبت به گروه کنترل، قادر به قطعه قطعه کردن DNA و القا آپاپتوز است (شکل ۸).



شکل ۷- میزان بیان نسبی ژن Mstn بعد از ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون تحت شرایط میکروگروایتی شبیه‌سازی شده در مقایسه با گروه کنترل ($****p < 0.0001$ و $***P < 0.001$).



شکل ۸- الکتروفورز DNA استخراج شده از سلول‌های C2C12. نمونه‌های کنترل (۱، ۲) و نمونه‌های انکوبه شده در شرایط میکروگروایتی شبیه‌سازی شده ۴۸ ساعت (۳) و ۷۲ ساعت (۴). مارکر (M).

مضربی از نوکلئوزوم‌ها برش می‌دهد. به این ترتیب در الکتروفورز DNA می‌توان حالت نردبانی را مشاهده نمود. بعد از استخراج DNA و الکتروفورز، الگوی باندهای تشکیل شده روی ژل آگارز در نمونه‌های میکروگراویتی، نشان‌دهنده ایجاد آپاپتوز در سلول‌های تمایز یافته C2C12 بود.

مطالعات پیشین نشان داده است که شرایط محیط فضایی بر میزان القای آپاپتوز در انواع مختلف سلول‌ها تأثیر می‌گذارد. آپاپتوز عملکرد مهمی در ریخت‌زایی، رشد اندام و ترمیم زخم دارد و در بسیاری از بافت‌ها و انواع سلول‌های قرار گرفته در معرض شرایط میکروگراویتی، میزان آپاپتوز افزایش یافت [۲۶]. گریدلی^۷ و همکاران در طحال و تیموس موش‌های قرار گرفته تحت شرایط میکروگراویتی طبیعی، افزایش القای آپاپتوز و قطعه قطعه شدن DNA را مشاهده کردند [۲۷]. لویس^۸ و همکاران در سال ۲۰۰۲، سلول‌های لنفوسیت T انسانی را در شاتل فضایی مورد مطالعه قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که بعد از ۴ ساعت، ۳۰ درصد سلول‌ها در مقایسه با گروه کنترل دچار آپاپتوز شدند. در سلول‌های لنفوسیت انسانی پس از ۴۸ ساعت قرار گرفتن در معرض میکروگراویتی، به میزان ۳ برابر آپاپتوز افزایش یافت و با قطعه قطعه شدن DNA این موضوع بررسی شد [۲۸]. مطالعه دیگری که توسط ماسیلو^۹ و همکاران در سال ۲۰۱۴ انجام شد، نشان داد که در سلول‌های سرطانی تیروئید، پس از ۲۴ ساعت قرار گرفتن در معرض میکروگراویتی شبیه‌سازی شده میزان آپاپتوز افزایش یافت، در حالی که در سلول‌های سرطان سینه MDA-MB-231 و سلول‌های آدنوکارسینومای معده SGC-7901 آپاپتوز فقط پس از ۷۲ ساعت افزایش پیدا کرد [۲۹]. در مطالعه بایک^۹ و همکاران در سال ۲۰۱۹ نشان داده شد که سرعت رشد سلول‌های میوبلاست C2C12 (سلول‌های تمایز نیافته) پس از ۱۲، ۲۴ و ۳۶ ساعت قرار گرفتن در شرایط میکروگراویتی شبیه‌سازی شده در مقایسه با گروه کنترل، کاهش می‌یابد. اما درصد زنده ماندن سلول‌ها در هر دو شرایط، تفاوت چندانی نداشت [۳۰]. با مقایسه نتایج مطالعه حاضر و مطالعه بایک و همکاران می‌توان اینگونه نتیجه گرفت که القای آپاپتوز در شرایط میکروگراویتی نه تنها تابع زمان در معرض قرارگیری بلکه تابع نوع سلول‌ها هم هست به نحوی که در سلول‌های میوبلاست تمایز نیافته آپاپتوز و مرگ سلولی معناداری مشاهده نمی‌شود، اما در سلول‌های میوتوب تمایز یافته مرگ سلولی معنادار مشاهده می‌گردد.

میوستاتین به عنوان اصلی‌ترین نشانگر زیستی آتروفی عضله در نظر گرفته می‌شود، زیرا ارتباط مستقیمی با سیگنالینگ و کاتابولیک مرتبط با تحلیل رفتن عضله دارد. ژن میوستاتین پروتئینی به نام میوستاتین را بیان می‌کند که در عضلات مورد استفاده برای حرکت

که معمولاً ناکارآمد و ناکافی است. از این رو، رمزگشایی از تغییرات مولکولی و روند آتروفی عضلانی که به دنبال شرایط بی‌وزنی رخ می‌دهد، برای درک مکانیسم چگونگی تخلیه مکانیکی آتروفی عضلانی لازم است.

رده سلولی C2C12 (ATCC® CRL-1772) یک زیرکلون نامیرا از میوبلاست‌های عضله اسکلتی موش است که توسط یاف^۴ و همکاران [۲۰] در سال ۱۹۷۷ از سلول‌های ماهواره‌ای عضله ران موش دو ماهه (C3H) ۷۰ ساعت پس از آسیب استخراج شد. زیر کلون C2C12 به دلیل توانایی سریع در تمایز و تولید میوتوب‌های انقباضی و دارا بودن ویژگی‌های پروتئین‌های عضلانی، توسط بلاثو^۵ در سال ۱۹۸۵ جداسازی شد [۲۱]. در آزمایش‌های معمول آزمایشگاهی، رده سلولی C2C12 به عنوان یک مدل خوب برای مطالعه سلول‌های عضله اسکلتی (SC) معرفی شده است [۲۲]. C2C12 متشکل از یک جمعیت خالص از سلول‌های میوژنیک است که تکثیر سریع، تمایز و توانایی تشکیل میوتوب‌های انقباضی را نشان می‌دهد [۲۳، ۲۴]. در مطالعه حاضر، سلول‌های تمایز یافته C2C12 در کلینوستات دو بعدی برای ایجاد شرایط میکروگراویتی شبیه‌سازی شده قرار گرفت. سپس، مطالعات مورفولوژیک و آزمون MTT انجام شد. نتایج نشان داد که شرایط میکروگراویتی پس از ۴۸ ساعت، تأثیر اندکی بر القای مرگ سلولی دارد. حال آنکه ۷۲ ساعت قرارگیری در شرایط میکروگراویتی، موجب ۴۰ درصد کاهش رشد سلول‌ها می‌شود. نتایج حاصل از رنگ آمیزی با آکریدین اورنج/ پروپیدیوم یدید نیز این مشاهدات را تأیید کرد. مطالعه ماسیلو^۹ به توضیح اثر شرایط میکروگراویتی بر فنوتیپ تمایز و مورفولوژی سلولی کمک شایانی کرد [۲۵]. آنها نشان دادند که در شرایط میکروگراویتی فنوتیپ سلول‌ها تغییر می‌یابد. در مطالعه حاضر نیز شکل سلول‌ها از حالت طویل و کشیده به شکل کروی در آمد که حاکی از تأثیر شرایط میکروگراویتی بر ساختار سلولی است.

بعد از ۴۸ ساعت قرارگیری در شرایط میکروگراویتی، تنها در ۱۰ درصد سلول‌ها آپاپتوز (اولیه و ثانویه) رخ داد، در حالی که پس از ۷۲ ساعت، درصد سلول‌های آپاپتوتیک (اولیه و ثانویه) افزایش یافت و به ۴۰٪ رسید. به نظر می‌رسد که با افزایش زمان قرارگیری سلول‌های میوتوب C2C12 در معرض میکروگراویتی، تعداد سلول‌های آپاپتوز یافته افزایش می‌یابد. شایان ذکر است که پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت قرارگیری سلول‌ها در شرایط میکروگراویتی میزان سلول‌های نکروز یافته بسیار اندک بود. همچنین، نتایجی که از آزمون قطعه قطعه شدن DNA حاصل شد، یافته‌های حاصل از دو آزمون قبلی را تایید کرد. در فرآیند آپاپتوز، آدنونوکلاز فعال می‌شود و DNA را به صورت

7. Gridley
8. Lewis
9. Baek

4. Yaffe
5. Blau
6. Masiello

عضلات اسکلتی) چه قبل و چه بعد از تولد فعال است. میوستاتین به طور عمده توسط سلول‌های عضلات اسکلتی ترشح می‌شود و با فعال کردن مسیر سیگنالینگ SMAD2/SMAD3 منجر به آتروفی عضلات می‌شود. مطالعات پیشین نشان داده است که مهار بیان ژن میوستاتین باعث افزایش شدید وزن بدن موش به علت بالا رفتن توده عضلانی (هایپرتروفی) می‌شود [۳۱]. یافته‌ها نشان می‌دهد بیان ژن میوستاتین در طی شرایط فیزیولوژیکی - پاتولوژیک که منجر به تحلیل عضله می‌شود، افزایش می‌یابد. همچنین، مطالعات نشان داده است که مهار بیان میوستاتین از آتروفی عضله اسکلتی در حیوانات مسن محافظت می‌کند و عملکرد عضله را بهبود می‌بخشد و باعث کاهش آپاپتوز در عضله اسکلتی موش‌های مسن می‌شود [۳۲]. علاوه بر این، میوستاتین در کنترل شکل فیبری ماهیچه نقش دارد و با جلوگیری از تکثیر میوبلاست‌ها، عملاً رشد عضلانی را متوقف می‌کند.

در مطالعه حاضر، بیان ژن میوستاتین پس از ۴۸ ساعت قرارگیری در شرایط میکروگروایتی شبیه‌سازی شده کاهش یافت. در حالی که بعد از ۷۲ ساعت، بیان این ژن به طور معناداری افزایش یافت. مطالعات پیشین نشان داده است که بیان ژن‌های اتوفاژی، پس از قرار گرفتن سلول‌های C2C12 تمایز نیافته در شرایط میکروگروایتی شبیه‌سازی شده افزایش می‌یابد و همچنین منجر به کاهش فسفریلاسیون AKT می‌شود [۳۰]. مطالعات در سطح مولکولی نشان داده است که شرایط میکروگروایتی منجر به کاهش RNA در رمزگذاری پروتئین‌های عضله اسکلتی می‌شود و این امر با کاهش توده عضلانی که در عضلات رخ می‌دهد سازگار است. بیان MURF1 در فضا با فعال سازی مسیر یوبی کوئیتین - پروتئازوم برای القای آتروفی عضلات افزایش می‌یابد [۳۳]. مطالعه اسمیت^{۱۰} و همکاران نیز نشان داده است که شرایط بی‌وزنی در عضله گاستروکنمیوس موش‌های فرستاده شده به فضا موجب مهار بیان ژن پروتئین اتصال میوستاتین (Mybph) می‌شود [۳۴]. در مطالعه آلن^{۱۱} و همکاران در سال ۲۰۰۹، سطح mRNA میوستاتین در عضله گاستروکنمیوس (ماهیچه دوقلو) موش‌ها پس از پرواز فضایی، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج آنها نشان داد که پرواز فضایی، موجب افزایش سطح mRNA میوستاتین می‌شود. در حالی که سطح mRNA مهارکننده میوستاتین کاهش می‌یابد. علاوه بر این پرواز فضایی بر بیان مسیرهای سیگنالینگ سلولی اثر می‌گذارد [۳۵]. فوروکاوا^{۱۲} و همکاران در سال ۲۰۱۸ گزارش کردند که شرایط میکروگروایتی شبیه‌سازی شده با تداخل در مکانیسم‌های میتیلاسیون اپی ژنتیک DNA، باعث مهار روند فعال سازی متوالی عوامل تنظیم کننده رونویسی میوژنیک می‌شود [۳۶]. این مطالعات کاملاً با نتایج حاضر منطبق است و نشان می‌دهد

میکروگروایتی بر میزان بیان ژن میوستاتین تأثیر گذاشته و با افزایش بیان آن می‌تواند منجر به بروز آتروفی عضلانی شود.

در مطالعه که اخیراً توسط کالزیا^{۱۳} و همکاران انجام شد، سلول‌های C2C12 تحت شرایط میکروگروایتی قرار گرفتند. نتایج این گروه نشان داد که سلول‌ها پس از ۷۲ ساعت قرارگیری در شرایط میکروگروایتی رشد چشمگیری نسبت به نمونه کنترل می‌یابند. همچنین، ایجاد تمایز سلول‌های مورد مطالعه به مدت چند روز به تاخیر افتاد. آنها نشان دادند که در شرایط میکروگروایتی هموستازی کلسیم برهم می‌خورد و همچنین مسیرهای بیوشیمیایی برای ایجاد میوژنیک مانند ATP سنتتاز، تنفس، تعادل در میزان رادیکال آزاد درون سلولی و مسیرهای سیگنالینگ کلسیم کاملاً برهم می‌خورد [۲۴]. حال آنکه در مطالعه حاضر سلول‌های C2C12 ابتدا تمایز یافتند و سپس در شرایط میکروگروایتی قرار گرفته و رشد آنها بررسی شد. در واقع در مطالعه کالزیا و همکاران سلول‌ها به صورت بنیادی و تمایز نیافته مورد مطالعه قرار گرفت حال آنکه در این مطالعه سلول‌های تمایز یافته مورد بررسی قرار گرفت و به صورت شگفت آوری نتایج مطالعه حاضر با مطالعه کالزیا و همکاران در تضاد بود. به عبارتی شرایط میکروگروایتی تأثیر کاملاً متفاوت و حتی متضادی بر رده‌های سلولی دارد. به صورتی که سلول‌های میوبلاست تحت تأثیر میکروگروایتی مناسب برای مهندسی بافت و درمان و بازسازی عضله می‌باشند اما نوع تمایز یافته آن به سمت مرگ و آتروفی پیش می‌رود. این نتیجه خود بیانگر نقش اعجاب آور و دوگانه میکروگروایتی بر سلول‌هاست. بررسی مکانیزم‌ها و واسطه‌های مولکولی درگیر در فرآیند ایجاد آتروفی، نیاز به بررسی و مطالعات دقیق‌تری است. پرده‌برداری از مکانیسم تغییرات سلولی و مولکولی وابسته به شرایط میکروگروایتی، یک نیاز مهم برای تدوین راهکارهای جدید درمانی برای فضانوردان است.

نتیجه‌گیری

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که شرایط میکروگروایتی شبیه‌سازی شده در مورفولوژی و سرعت تکثیر سلول‌های تمایز یافته عضلانی C2C12 تأثیر می‌گذارد و باعث کاهش رشد سلول‌های C2C12 و القای آپاپتوز می‌شود. همچنین، میکروگروایتی شبیه‌سازی شده پس از ۷۲ ساعت، با افزایش بیان میوستاتین در میوتوب‌ها همراه است. با توجه به مطالعه حاضر مهار میوستاتین در سلول‌های میوسیت بالغ و تمایز یافته ممکن است یک اقدام مقابله‌ای مؤثر در کاهش عوارض مخرب آتروفی عضله اسکلتی در شرایط میکروگروایتی در فضانوردان باشد.

نتایج حاصل از این مطالعه می‌تواند به فضانوردان جهت کاهش اثرات منفی شرایط میکروگرابیته کمک کند.

تعارض منافع

هیچگونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

مراجع

- [13] A. Forterre, A. Jalabert, E. Berger, M. Baudet, K. Chikh, E. Errazuriz, J. De Larichaudy, S. Chanon, M. Weiss-Gayet, and A.-M. Hesse, "Proteomic analysis of C2C12 myoblast and myotube exosome-like vesicles: a new paradigm for myoblast-myotube cross talk?," *PLoS one*, Vol. 9, No. 1, pp. e84153, 2014.
- [14] M. Adamian, A. Hekmat, and Z. Hajebrahimi, "The Impacts of Simulated Microgravity on The Cell Viability and Claudin-1 and Claudin-3 Expression of MCF-7 Breast Cancer Cells," *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran*, Vol. 32, No. 2, pp. 105-114, 2021.
- [15] H. Esmaili Gourvarchin Galeh, N. Delirez, S.M. Abtahi Froushani, and N. Afzale Ahangaran, "The Effect of Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells Pulsed with Vitamin D3 on the Function of Peripheral Blood Neutrophils in Rat," *Qom University of Medical Sciences Journal*, Vol. 8, No. 5, pp. 1-8, 2014.
- [16] M. Bizzarri, M. Monici, & J.J. van Loon, "How microgravity affects the biology of living systems," *BioMed Research International*, Vol. 9, 2015.
- [17] Clément, G., "The Neuro-Sensory System in Space," *Fundamentals of Space Medicine*, Vol. 17, pp. 91-138, 2005.
- [18] R. Fitts, S. Trappe, D. Costill, P.M. Gallagher, A.C. Creer, P. Colloton, J.R. Peters, J. Romatowski, J. Bain, and D.A. Riley, "Prolonged space flight-induced alterations in the structure and function of human skeletal muscle fibres," *The Journal of physiology*, Vol. 588, No. 18, pp. 3567-3592, 2010.
- [19] A. Hekmat, M.S. Manesh, Z. Hajebrahimi, and S. Hatamie, "Microgravity-Induced Alterations in the H3.3B (H3F3B) Gene Expression and the Histone H3 Structure," *Advanced Science, Engineering and Medicine*, Vol. 12, No. 8, pp. 1084-1094, 2020.
- [20] D. Yaffe, and O. Saxel, "Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle," *Nature*, Vol. 270, No. 5639, 1977, pp. 725-727.
- [21] H.M. Blau, G.K. Pavlath, E.C. Hardeman, C.-P. Chiu, L. Silberstein, S.G. Webster, S.C. Miller, and C. Webster, "Plasticity of the differentiated state," *Science*, Vol. 230, No. 4727, pp. 758-766, 1985.
- [22] I. Grabowska, A. Szeliga, J. Moraczewski, I. Czaplicka, and E. Brzóska, "Comparison of satellite cell-derived myoblasts and C2C12 differentiation in two- and three-dimensional cultures: changes in adhesion protein expression," *Cell biology international*, Vol. 35, No. 2, pp. 125-133, 2011.
- [23] T. Patz, A. Doraiswamy, R. Narayan, R. Modi, and D. Chrisey, "Two-dimensional differential adherence and alignment of C2C12 myoblasts," *Materials Science and Engineering: B*, Vol. 123, No. 3, pp. 242-247, 2005.
- [24] D. Calzia, L. Ottaggio, A. Cora, G. Chiappori, P. Cuccarolo, E. Cappelli, A. Izzotti, S. Tavella, and P. Degan, "Characterization of C2C12 cells in simulated microgravity: Possible use for myoblast regeneration," *Journal of cellular physiology*, Vol. 235, No. 4, pp. 3508-3518, 2020.
- [25] M.G. Masiello, R. Verna, A. Cucina, and M. Bizzarri, "Physical constraints in cell fate specification. A case in point: Microgravity and phenotypes differentiation," *Progress in biophysics and molecular biology*, Vol. 134, pp. 55-67, 2018.
- [1] G. Albrecht-Buehler, "Possible mechanisms of indirect gravity sensing by cells," *Gravitational and Space Research*, Vol. 4, No. 2, 2007.
- [2] J.J. van Loon, "Some history and use of the random positioning machine, RPM, in gravity related research," *Advances in Space research*, Vol. 39, No. 7, pp. 1161-1165, 2007.
- [3] J. Vassy, S. Portet, M. Beil, G. Millot, F. Fauvel-Lafeve, A. Karniguian, G. Gasset, T. Irinopoulou, F. Calvo, and J. Rigaut, "Effect of weightlessness on cytoskeleton architecture and proliferation of human breast cancer cell line MCF-7," *The FASEB Journal*, Vol. 15, No. 6, pp. 1104-1106, 2001.
- [4] A. Hekmat, B. Hajati, and Z. Hajebrahimi, "The comparison of the binding parameters of silver nanoparticles to DNA in gravity and microgravity conditions," *Journal of Space Science and Technology*, Vol. 13, No. 1, pp. 61-70, 2020.
- [5] C. Harding, J. Takemoto, and E. Vargis, "In Vitro Modeling of Microgravity-Induced Muscle Atrophy and Spaceflight Radiation," *Utah NASA Space Grant Consortium*, 2016.
- [6] I.Y. Kuo, and B.E. Ehrlich, "Signaling in muscle contraction," *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, Vol. 7, No. 2, pp. a006023, 2015.
- [7] P. Bonaldo, and M. Sandri, "Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy," *Disease models & mechanisms*, Vol. 6, No. 1, pp. 25-39, 2013.
- [8] M. Schuelke, K.R. Wagner, L.E. Stolz, C. Hübner, T. Riebel, W. Kömen, T. Braun, J.F. Tobin, and S.-J. Lee, "Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child," *New England Journal of Medicine*, Vol. 350, No. 26, pp. 2682-2688, 2004.
- [9] L.S. Mota, R.A. Curi, D. A. Palmieri, A. S. Borges, C.R. Lopes, J.D. Barbosa, & M.A. Gimenes, "Sequence characterization of coding regions of the myostatin gene (GDF8) from Brazilian Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*) and comparison with the *Bos taurus* sequence," *Genetics and Molecular Biology*, Vol. 29, No.1, pp. 79-82, 2006.
- [10] A.C. McPherron, and S.-J. Lee, "Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice," *The Journal of clinical investigation*, Vol. 109, No. 5, pp. 595-601, 2002.
- [11] C.V.C. Grade, C.S. Mantovani, and L.E. Alvares, "Myostatin gene promoter: structure, conservation and importance as a target for muscle modulation," *Journal of animal science and biotechnology*, Vol. 10, No. 1, pp. 1-19, 2019.
- [12] J. Rodriguez, B. Vernus, I. Chelha, I. Cassar-Malek, J.-C. Gabillard, A.H. Sassi, I. Seiliez, B. Picard, and A. Bonniou, "Myostatin and the skeletal muscle atrophy and hypertrophy signaling pathways," *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol. 71, No. 22, pp. 4361-4371, 2014.

- [32] D.L. Allen, D.S. Hittel, and A.C. McPherron, "Expression and function of myostatin in obesity, diabetes, and exercise adaptation," *Medicine and science in sports and exercise*, Vol. 43, No. 10, pp. 18-28, 2011.
- [33] S.C. Bodine, & L. M. Baehr, "Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1," *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, Vol. 307, No. 6, pp. E469-E484, 2014.
- [34] Smith, R.C., Cramer, M. S., Mitchell, P. J., Lucchesi, J., Ortega, A. M., Livingston, E. W., ... & Stodieck, L., "Inhibition of myostatin prevents microgravity-induced loss of skeletal muscle mass and strength," *PloS one*, Vol.15, No.1 2020.
- [35] D.L. Allen, E.R. Bandstra, B.C. Harrison, S. Thorng, L.S. Stodieck, P.J. Kostenuik, S. Morony, D.L. Lacey, T.G. Hammond, and L.L. Leinwand, "Effects of spaceflight on murine skeletal muscle gene expression," *Journal of Applied Physiology*, Vol. 106, No. 2, pp. 582-595, 2009.
- [36] T. Furukawa, K. Tanimoto, T. Fukazawa, T. Imura, Y. Kawahara, and L. Yuge, "Simulated microgravity attenuates myogenic differentiation via epigenetic regulations," *npj Microgravity*, Vol. 4, No. 1, pp. 1-8, 2018.
- [26] H. Schatten, M.L. Lewis, and A. Chakrabarti, "Spaceflight and clinorotation cause cytoskeleton and mitochondria changes and increases in apoptosis in cultured cells," *Acta astronautica*, Vol. 49, No. 3-10, pp. 399-418, 2001.
- [27] G. Aleshcheva, J. Sahana, X. Ma, J. Hauslage, R. Hemmersbach, M. Egli, M. Infanger, J. Bauer, and D. Grimm, "Changes in morphology, gene expression and protein content in chondrocytes cultured on a random positioning machine," *PLoS One*, Vol. 8, No. 11, pp. e79057, 2013.
- [28] M.L. Lewis, "The cytoskeleton, apoptosis, and gene expression in T lymphocytes and other mammalian cells exposed to altered gravity," *Advances in space biology and medicine*, Vol. 8, pp. 77-128, 2002.
- [29] M.G. Masiello, A. Cucina, S. Proietti, A. Palombo, P. Coluccia, F. D'Anselmi, S. Dinicola, A. Pasqualato, V. Morini, and M. Bizzari, "Phenotypic switch induced by simulated microgravity on MDA-MB-231 breast cancer cells," *BioMed research international*, Vol.2014, pp.1-12, 2014.
- [30] M.-O. Baek, C.B. Ahn, H.-J. Cho, J.-Y. Choi, K.H. Son, and M.-S. Yoon, "Simulated microgravity inhibits C2C12 myogenesis via phospholipase D2-induced Akt/FOXO1 regulation," *Scientific reports*, Vol. 9, No. 1, pp. 1-13, 2019.
- [31] Y. Yang, A. Creer, B. Jemiolo, and S. Trappe, "Time course of myogenic and metabolic gene expression in response to acute exercise in human skeletal muscle," *applied physiology*, Vol. 98, No. 5, pp. 1745-1752, 2005.