فیزیولوژی ورزشی
شماره ۳۳، بهار ۱۳۹۶. صص ۱۸۶-۱۷۳

تأثیر یک دوره مکمل‌دهی ال‌آرژینین بر پاسخ گیرندهٔ نیکوتینی استیل کولین عضلهٔ اسکلتی موش‌های صحرایی نر سالمند به فعالیت حاد وامانده‌ساز

مریم نورشاهی[۱]، رسول رضایی[۲]، سجاد آقاجان[۳]، مجتبی صالح‌پور[۴]، فریبا خداقلی[۵]

۱. دانشیار فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه شهیدبهشتی
۲. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه شهیدبهشتی*
۳. کارشناس ارشد فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه شهیدبهشتی
۴. استادیار فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه تربیت‌دبیر شهیدرجایی
۵. دانشیار مرکز پژوهشات علوم اعصاب، دانشگاه علوم‌پزشکی شهیدبهشتی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۲۵ تاریخ پذیرش:۱۳۹۵/۰۳/۰۱

چکیده

هدف از انجام این پژوهش، بررسی تأثیر یک دوره مکمل‌دهی ال‌آرژینین بر پاسخ گیرندهٔ نیکوتینی استیل کولین بافت عضلات اندام عقبی موش‌های صحرایی سالمند به فعالیت حاد وامانده‌ساز بود. بدین‌منظور، ۳۲ سر موش نر نژاد ویستار (۲۲ ماهه،۲۰±۳۸۰ گرم) آزمودنی‌های این پژوهش را تشکیل دادند و به‌طور تصادفی به چهار گروه مکمل ال‌آرژینین همراه با فعالیت استقامتی وامانده‌ساز بلافاصله، مکمل ال‌آرژینین بلافاصله، ورزش و کنترل تقسیم شدند. قابل‌ذکر است که موش‌های گروه مکمل به‌مدت دو هفته، آب حاوی ۲/۵ درصد ال‌آرژینین را مصرف نمودند. در روز فعالیت ورزشی، رت‌های گروه ورزش در شرایط فعالیت وامانده‌ساز با سرعت ۳۰ متر در دقیقه و شیب پنج درجه، معادل ۸۰ـ۷۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی فعالیت کردند. سپس، حیوانات بلافاصله و چهار ساعت بعد از فعالیت استقامتی وامانده‌ساز بی‌هوش شدند و نمونه‌گیری از بافت عضلهٔ بازکنندهٔ دراز انگشتان پا و نعلی صورت گرفت. جهت بررسی داده‌ها نیز از تحلیل واریانس یک‌سویه استفاده گردید. نتایج نشان می‌دهد که میزان پروتئین گیرندهٔ نیکوتینی استیل کولین عضلهٔ نعلی و بازکنندهٔ دراز انگشتان در گروه‌های ال‌آرژینین بلافاصله، به‌طور معناداری بیشتر از گروه کنترل می‌باشد ($P<0.001$). میزان پروتئین گیرندهٔ نیکوتینی استیل کولین عضلهٔ نعلی و بازکنندهٔ دراز انگشتان نیز در گروه‌های فعالیت وامانده‌ساز چهار ساعت بعد و گروه ال‌آرژینین به‌همراه فعالیت وامانده‌ساز چهار ساعت بعد، به‌طور معناداری بیشتر از گروه کنترل است ($P<0.001$). به‌نظر می‌رسد مکمل‌دهی ال‌آرژینین به‌همراه فعالیت استقامتی می‌تواند روش مناسبی برای کاهش سارکوپنیا با اثرگذاری بر میزان پروتئین گیرندهٔ نیکوتینی استیل کولین در افراد سالمند باشد.

واژگان کلیدی: گیرندهٔ نیکوتینی استیل کولین، ال‌آرژینین، فعالیت حاد وامانده‌ساز

*نویسندهٔ مسئول Email: R_Rezaei@sbu.ac.ir

مقدمه

براساس گزارش مرکز آمار ایران، سالمندان پنج درصد از کل جمعیت ایران را تشکیل می‌دهند که این رقم در سال‌های آینده، رشد قابل‌توجهی خواهد داشت (۱). مهم‌ترین و بارزترین تغییر در این دوره، پدیده‌ای به نام سارکوپنیا[1] می‌باشد. سارکوپنیا با ازدست‌دادن تدریجی توده و قدرت عضلانی (۲) و کاهش سلول‌های ماهواره‌ای (۳)، میزان متابولیسم (۴) و حداکثر اکسیژن مصرفی[2] (vo_{2max}) همراه می‌باشد (۷ـ۵). عوامل زیادی سبب بروز سارکوپنیا می‌گردد که عبارت هستند از: کاهش فعالیت بدنی (۵)، تغییر سطوح هورمونی (۸) و عوامل عصبی (۹). پژوهش‌ها درزمینهٔ تغییرات دستگاه عصبی طی سالمندی نشان می‌دهند که سالمندی سبب کاهش تعداد تارهای عصبی میلین‌دار، قطر و تعداد تارهای عصبی، واحدهای حرکتی و کاهش سرعت هدایت پیام عصبی و غیره می‌گردد (۱۰). دراین‌میان، یکی از تغییرات مهمی که در دوران سالمندی رخ می‌دهد، تغییر ساختاری و عملکردی جایگاه اتصال عصبی عضله[3] (NMJ) می‌باشد؛ به‌طوری‌که کاهش عملکرد و ساختار این قسمت طی سالمندی سبب تضعیف عملکرد جسمانی می‌گردد (۱۱،۱۲). پژوهشگران نشان داده‌اند که انتقال سیناپسی سریع و دقیق، نیازمند تجمع و چگالی بالای گیرنده‌های انتقال‌دهندهٔ پیام عصبی در غشای پس‌سیناپسی است؛ به‌همین‌دلیل، این گیرنده‌ها می‌بایست در قسمت مقابل منطقهٔ آزادشدن ناقلین از پایانهٔ عصبی با چگالی بالا وجود داشته باشند. مطالعات اخیر نشان می‌دهند که پروتئین‌های مختلفی در تشکیل و تثبیت گیرنده استیل کولین[4] (AchR) و NMJ نقش دارند (۱۳) که شامل: نروگلین[5]، عامل فعال ساز گیرنده استیل کولین[6] (ARIA)، پپتید مرتبط با ژن کلسی تونین[7] (CGRP)، آگرین و نیتریک‌اکساید[8] (NO) می‌باشد (۱۳،۱۴).

به‌نظر می‌رسد NO در تنظیم آزادسازی ناقلین عصبی پیش‌سیناپسی و تثبیت غشای پس‌سیناپسی NMJ نقش دارد. عضلهٔ اسکلتی هر سه شکل نیتریک اکساید سنتتاز[9] NOS (بیان نیتریک اکساید

1. Sarcopenia
2. Maximal Oxygen Consumption
3. Neuromuscular Junction
4. Acetylcholine Receptor
5. Neuregulin
6. Acetylcholine Receptor Inducing Activity
7. Calcitonin Gene-Related Peptide
8. Nitric Oxide
9. Nitric Oxide Synthases

سنتتاز نورونی[1] nNOS غالب‌تر است) را بیان می‌کند، اما میزان nNOS در قسمت پس‌سیناپسی NMJ بیشتر می‌باشد (۱۵،۱۶). ازسوی‌دیگر، به‌نظر می‌رسد فعالیت NOS، احتمالاً مداخله‌گر مهمی در مسیرهای سیگنالی کلسیم در عضلهٔ اسکلتی باشد (۱۷). دراین‌میان، سالمندی سبب افزایش نسبت نیتریک اکساید سنتتاز القایی[2] iNOS به nNOS می‌گردد که نشان‌دهندهٔ انتقال نقش انقباضی به‌سمت نقش التهابی می‌باشد (۱۸). پژوهشگران نشان داده‌اند که فعالیت nNOS عضلهٔ نعلی و بازکنندهٔ دراز انگشتان[3] (EDL) موش‌های صحرایی طی دوران سالمندی کاهش یافته است (۱۹) و تمرین استقامتی به‌طور معناداری سبب افزایش بیان پروتئین nNOS در عضلهٔ تندانقباض (بخش سفید عضلهٔ دوقلو) و کندانقباض (نعلی) موش‌های صحرایی شده است (۱۸). درهرحال، محصول nNOS جهت شرکت در فرایندهای فیزیولوژیکی بدن، NO می‌باشد. NO از دو مسیر وابسته به NOS و غیروابسته به NOS سنتز می‌شود (۲۰،۲۱)؛ به‌گونه‌ای‌که مسیر وابسته به NOS، نیازمند اکسیژن (۲۰) و مسیر نیترات ـ نیتریت ـ NO تحت شرایط هایپوکسی مسیر غالب می‌باشد (۲۲). در مسیر وابسته به NOS، آمینو اسید ال‌آرژینین، پیش‌ساز اصلی NO است. ال‌آرژینین در حضور اکسیژن و نیکوتین امید آدنین نوکلئوتید دی فسفات[4] NADPH در مجموعه‌ای از واکنش‌های ردوکس توسط NOS به ال‌سیترولین[5] و NO تبدیل می‌شود؛ ازاین‌رو، به‌نظر می‌رسد مقادیر ال‌آرژینین بر سطوح NO تولیدی نقش داشته باشد (۲۳).

پژوهش‌های انجام‌گرفته در ارتباط با مکمل‌دهی ال‌آرژینین بر فعالیت NO نتایج متفاوتی را نشان داده‌اند. ریپلا کولی[6] و همکاران (۲۰۰۴) با دو هفته مکمل‌دهی ال‌آرژینین، افزایش معناداری را در مقادیر نیتریک اکسید، تنها در گروه ال‌آرژینین مشاهده کردند (۲۴). با توجه به امکان اثر مثبت مکمل ال‌آرژینین بر فعالیت NO از یک‌سو و تأثیر ورزش استقامتی بر nNOS در دورهٔ سالمندی به‌عنوان یکی از عوامل مؤثر بر nAChR ازسوی‌دیگر، این پرسش مطرح می‌گردد که آیا مکمل‌دهی ال‌آرژینین با اثر بر مقادیر NO می‌تواند اثر تعدیل‌کنندهٔ ورزش بر nAChR طی دورهٔ سالمندی را افزایش دهد؟ ازاین‌رو، پژوهش حاضر در نظر دارد با پاسخ به این سؤال که آیا مکمل‌دهی ال‌آرژینین به‌همراه یک جلسه فعالیت ورزشی می‌تواند اثر مثبت بر مقادیر nAChR داشته باشد یا خیر، اثر

1. Neuronal NOS
2. Inducible Nitric Oxide Synthase
3. Extensor Digitorum Longus Muscle
4. Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
5. L Citrulline
6. Ripla Kohli

ورزش به‌همراه مکمل ال‌آرژینین بر nAChR در موش‌های صحرایی نر سالمند نژاد ویستار را موردبررسی قرار داده است.

روش پژوهش

در این پژوهش ۳۲ سر موش صحرایی نر ویستار ۲۲ ماهه به‌عنوان نمونهٔ پژوهش از مؤسسه انستیتو رازی خریداری شدند و در شرایط دمایی ۱/۴±۲۲ درجهٔ سانتی‌گراد، رطوبت ۴±۵۵ درصد و چرخهٔ روشنایی ـ تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت نگهداری گردیدند و به‌وسیلهٔ آب و غذای مخصوص رت تغذیه شدند. تمام حیوانات به‌منظور آشناسازی با نوارگردان، به‌مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت هشت تا ۱۲ متر بر دقیقه، به‌مدت سه روز ورزش کردند. پس از گذشت یک هفته (سازگاری با محیط آزمایشگاه)، موش‌های صحرایی به‌طور تصادفی به چهار گروه مکمل ال‌آرژینین و ورزش (EX+L, n=8)، گروه مکمل ال‌آرژینین بدون ورزش (L, n=8)، گروه ورزش بدون مکمل ال‌آرژینین (EX, n=8) و گروه کنترل (Cont,n=8) تقسیم شدند. تمام گروه‌های مصرف‌کنندهٔ مکمل نیز آب حاوی ۲/۵ درصد مکمل ال‌آرژینین را به‌مدت ۱۴ روز دریافت نمودند (۲۴). شایان‌ذکر است که میزان آب مصرفی در گروه‌های مکمل برای اندازه‌گیری میزان مکمل مصرفی در طول دوره ثبت گردید. حیوانات گروه (EX+L) و (EX) در گروه‌های چهارتایی بلافاصله و چهار ساعت (۲۷ـ۲۵)، پس از انجام فعالیت شدید وامانده‌ساز تشریح شدند و حیوانات گروه (L) و (Cont) نیز در زمان یکسان از روز با گروه‌های تمرینی تشریح گردیدند.

پس از این‌که تمام حیوانات به‌منظور آشناسازی با تردمیل به‌مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ۱۲ـ۸ متر بر دقیقه به‌مدت سه روز ورزش کردند، در روز فعالیت ورزشی، حیوانات گروه ورزش در شرایط فعالیت وامانده‌ساز با سرعت ۳۰ متر در دقیقه و شیب پنج درجه، معادل ۸۰ـ۷۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی قرار گرفتند (۳۰ـ۲۸). شایان‌ذکر است که وامانده‌گی زمانی محسوب می‌شد که وقتی حیوانات به پشت خوابانده می‌شدند، قادر به برگشت به وضعیت اولیه نبودند (۳۱،۳۲).

مکمل‌دهی: با توجه به این‌که میانگین جذب در آب حاوی ال‌آرژینین، ۲/۲۴ گرم در هر کیلوگرم از وزن بدن در هر روز می‌باشد، به‌منظور مکمل‌دهی ال‌آرژینین، آب حاوی ۲/۵ درصد ال‌آرژینین (سیگما ساخت کشور آمریکا[1]) طی پروتکل پژوهش به دو گروه (EX+L) و (L) داده شد (۳۳).

1. A 5006, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA

حیوانات با تزریق درون‌صفاقی ترکیبی از کتامین[1] (۵۰ـ۳۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم وزن بدن) و زایلزین[2] (سه تا پنج میلی‌گرم/ کیلوگرم وزن بدن) بی‌هوش شدند و به‌منظور بافت‌برداری از محفظه خارج گشتند و به روی میز جراحی انتقال داده شدند. با توجه به نقش متفاوت دو عضلهٔ نعلی و EDL، میزان درگیری این دو عضله در فعالیت حاد وامانده‌ساز، عضلهٔ EDL و عضلهٔ نعلی، برای اندازه‌گیری میزان پروتئین nAchR، مقدار ۷۰ کیلو دالتون از آن به روش وسترن بلات[3] (آنتی بادی ساخت شرکت ابکم[4]) برداشته شد.

برای تهیه و آماده‌سازی بافت ابتدا، عضلات جهت استخراج غشای سلولی با روش هاون‌کوبی پودر گردیدند. سپس، برای به‌دست‌آوردن عصارهٔ سلولی، نمونه‌های پودرشدهٔ عضله توسط بافر هموژن لیز شدند. همچنین، به‌منظور هموژن‌کردن بافت، به اندازهٔ چهار الی پنج برابر وزن نمونه‌ها، بافر لیزکننده ریخته شد و با هموژنایزر تامی[5] مدل میکرو اسمش[6] با ۳۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت سه زمان دو دقیقه‌ای با فاصلهٔ زمانی پنج دقیقه بین دفعات برای جلوگیری از گرم‌شدن و دناتوره‌شدن پروتئین، هموژن گشت. سپس، بافت هموژن‌شده به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای مثبت چهار درجهٔ سانتی‌گراد و در دور ۳۶۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید، سوپرناتانت محلول جدا گشت و در فریزر ۸۰- نگهداری شد. جهت تعیین غلظت پروتئین نیز از روش بردفورد[7] استفاده گشت و با استفاده از منحنی استاندارد، غلظت مناسب پروتئین نمونه محاسبه گردید.

برای انجام تست وسترن بلات، مقادیر مساوی از پروتئین توسط ژل سدیم ددوکسیل سولفات پلی آکربل آمید ژل[8] ۱۲ درصد جداسازی شد. بعد از مرحلهٔ الکتروفورز، پروتئین‌های ژل به کاغذ پلی وین ویلیدین فلوراید[9] منتقل شد و کاغذ به‌مدت یک ساعت در محلول بلاکینگ قرار گرفت. سپس، کاغذ یک شب در آنتی‌بادی اولیه (nAChR) در دمای چهار درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد و در روز دوم، سه مرتبه با محلول تی بی اس تی[10] شستشو داده شد و کاغذ به‌مدت یک ساعت توسط

1. Ketamine
2. Xylazine
3. Western Blot
4. Abcam
2. Tomy
3. Micro Smash
7. Bradford
8. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)
9. Polyvinylidene Fluoride (PVDF)
10. TBST

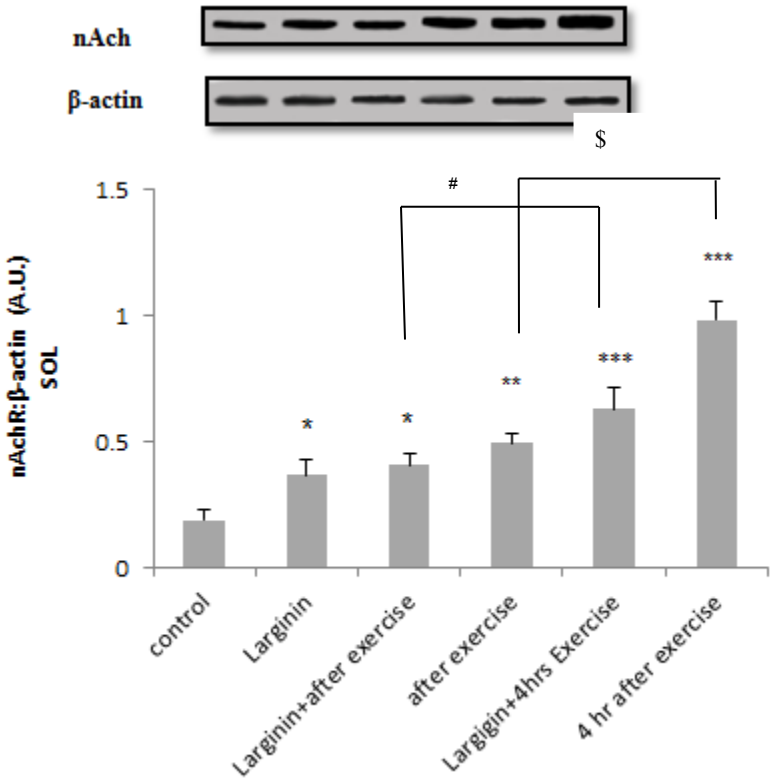
آنتی‌بادی ثانویه انکوبه گردید. پس از این مرحله، بلات‌ها با کیت نورتابی الکتروشیمیایی[1] (ECL) پوشانده شدند و با استفاده از فیلم رادیولوژی ظاهر گشتند. سپس، بلات‌ها در بافر استریپینگ شستشو داده شدند و آنتی‌بادی بتا اکتین به روی کاغذ گذاشته شد و دوباره با آنتی‌بادی ثانویه انکوبه گردیدند و بتااکتین کنترل نیز در فیلم رادیولوژی ظاهر گردید. شایان‌ذکر است که باندهای به‌دست‌آمده توسط برنامهٔ تصویر جی [2]دانسیتومتری شدند.

طبیعی‌بودن داده‌ها به‌وسیلهٔ آزمون کولموگروف ـ اسمیرنوف بررسی گردید. برای بررسی اختلاف معناداری سطوح nAchR در چهار گروه نیز از تحلیل واریانس یکسویه استفاده شد. همچنین، جهت تعیین تفاوت بین گروه‌ها، آزمون تعقیبی بونفرونی مورداستفاده قرار گرفت. سطح معناداری نیز ($P<0.05$) در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌سویه نشان می‌دهد که تغییرات میزان پروتئین nAchR در عضلهٔ نعلی گروه‌های مختلف معنادار می‌باشد ($P<0.0005$) و $F(30,5)=114.932$). نتایج آزمون تعقیبی بونفرونی نیز بیانگر این است که بین میزان nAchR بین گروه کنترل با گروه‌های ال‌آرژینین، ورزش و ال‌آرژینین بلافاصله، ورزش بلافاصله، ال‌آرژینین و ورزش چهار ساعت بعد و ورزش چهار ساعت بعد از ورزش در عضلهٔ سلئوس تفاوت معناداری وجود دارد ($P<0.001$)؛ به‌طوری‌که در گروه‌های یادشده، مقادیر nAchR نسبت به گروه کنترل بیشتر می‌باشد. همچنین، نتایج نشان می‌دهند که مقادیر nAchR در گروه ورزش چهار ساعت بعد با گروه ورزش تفاوت معنا-داری دارد ($P<0.001$) که نشان از افزایش nAchR در گروه ورزش چهار ساعت بعد نسبت به گروه ورزش بلافاصله دارد. یافته‌ها بیانگر این است که مقادیر nAchR بین گروه ورزش به‌همراه ال‌آرژینین و گروه ورزش به‌همراه ال‌آرژینین چهار ساعت بعد تفاوت معناداری مشاهده می‌شود ($P<0.001$) که نشان از افزایش nAchR در گروه ورزش به‌همراه ال‌آرژینین نسبت به گروه ال‌آرژینین دارد.

1. Electrogenerated Chemiluminescence
2. Image J

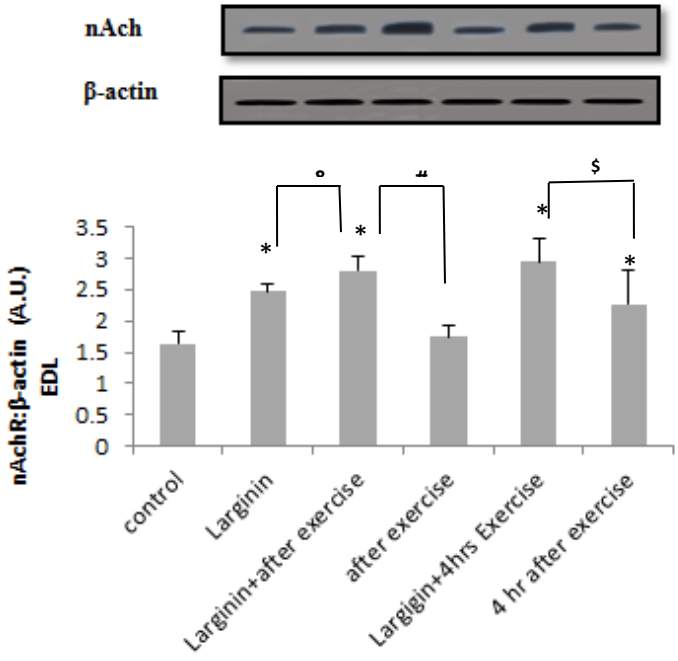


شکل ۱ـ میزان nAchR در عضلهٔ نعلی به‌تفکیک گروه‌ها

*مقادیر به‌صورت میانگین± انحراف استاندارد می‌باشد (n=6)

نتایج آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌سویه نشان می‌دهد که تغییرات میزان پروتئین nAchR در عضلهٔ نعلی گروه‌های مختلف معنادار می‌باشد ($P<0.0005$) و $F(30,5)= 18.499$). همچنین، نتایج تعقیبی بونفرونی بیانگر این است که بین میزان nAchR بین گروه کنترل و گروه‌های ال‌آرژینین، ورزش و ال‌آرژینین بلافاصله، ال‌آرژینین و ورزش چهار ساعت بعد و ورزش چهار ساعت بعد از ورزش در عضلهٔ EDL تفاوت معناداری وجود دارد ($P<0.001$)؛ درحالی‌که بین میزان nAchR گروه کنترل با گروه ورزش بلافاصله تفاوت معناداری مشاهده نمی‌شود. همچنین، در مقادیر nAchR بین

گروه ورزش با گروه ال‌آرژینین و ورزش تفاوت معناداری به‌چشم می‌خورد (P<0.001) که نشان‌دهندهٔ بیشتربودن مقادیر nAchR در گروه ال‌آرژینین و ورزش نسبت به گروه ورزش می‌باشد. علاوه‌براین، یافته‌ها بیانگر این است که مقادیر nAchR بین گروه ال‌آرژینین با گروه ال‌آرژینین و ورزش تفاوت معناداری وجود دارد (P<0.001) که نشان‌دهندهٔ بیشتربودن مقادیر nAchR در گروه ال‌آرژینین و ورزش نسبت به گروه ال‌آرژینین می‌باشد. در مقادیر nAchR نیز بین گروه ورزش و گروه ال‌آرژینین تفاوت معناداری مشاهده می‌شود (P <0.001) که بیانگر بیشتربودن مقادیر nAchR در گروه ال‌آرژینین نسبت به گروه ورزش است. همچنین، مقادیر nAchR در گروه ورزش و ال‌آرژینین چهار ساعت بعد با گروه ورزش چهار ساعت بعد، تفاوت معناداری دارد (P<0.001) که حاکی از بالاتربودن میزان nAchR در گروه ورزش و ال‌آرژینین چهار ساعت بعد درمقایسه با گروه ورزش چهار ساعت است.



*

شکل۲ـ میزان nAchR در عضلهٔ EDL به‌تفکیک گروه‌ها

* مقادیر به‌صورت میانگین± انحراف می‌باشد (n=6)

بحث و نتیجه‌گیری

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که استفاده از مکمل ال‌آرژینین باعث جلوگیری از کاهش گیرنده‌های nAchR در عضلات EDL و سلئوس در رت‌های سالمند می‌گردد. در پژوهش ریپلا کولی و همکاران (۲۰۰۴) همانند پژوهش حاضر، دو هفته مکمل‌دهی ال‌آرژینین باعث افزایش معنا-داری در بیان نیتریک اکسید تنها در گروه ال‌آرژینین شد. با این تفاوت که در پژوهش حاضر، رت‌ها سالمند بودند و مقادیر nAchR که متأثر از مقادیر NO می‌باشد سنجیده شده است. تولید NO به‌عنوان یک مسیر در تنظیم گیرنده‌های nAchR در دوران سالمندی کاهش پیدا می‌کند. به‌نظر می‌رسد مکمل‌دهی ال‌آرژینین از کاهش تولید NOدر رت‌های سالمند جلوگیری کرده است. همچنین، یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد مقادیر nAchR بلافاصله بعد از ورزش نسبت به گروه کنترل در عضلهٔ سلئوس تفاوت معناداری داشته است. این امر می‌تواند بیانگر آن باشد که افت فعالیت NOطی دوران سالمندی، بیشتر در عضلهٔ تندانقباض صورت می‌گیرد؛ لذا، تغییرات nAchR در گروه ورزش نسبت به گروه کنترل در عضلهٔ سلئوس با افزایش همراه بوده است؛ درحالی‌که در عضلهٔ تندانقباض، مقادیر nAchR گروه ورزش بلافاصله، تفاوت معناداری با سطوح nAchR در گروه کنترل نداشته است. این امر نشان‌دهندهٔ عدم اثر فعالیت بر مقادیر nAchR بلافصله بعد از تمرین به‌دلیل افت فعالیتNO طی سالمندی در عضلات تندانقباض می‌باشد. دراین‌رابطه نشان داده شده است که فعالیت nNOS عضلهٔ نعلی و بازکنندهٔ دراز انگشتان (EDL) رت‌ها طی دوران سالمندی کاهش می‌یابد (۱۹). ازآن‌جایی‌که nNOS علاوه بر تولید NO، یک عامل تأثیرگذار در دسته‌بندی nAchR می‌باشد، به‌نظر می‌رسد که در پژوهش حاضر، علت عدم تغییر سطوح nAchR در پاسخ به فعالیت وامانده‌ساز در عضلهٔ EDL، مقادیر پایین nNOS در این عضله باشد.

ازسوی‌دیگر، یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که مقادیر nAchR در هر دو عضلهٔ سلئوس و EDL چهار ساعت بعد از فعالیت ورزشی وامانده‌ساز در هر دو گروه ورزش و ال‌آرژینین و گروه ورزش نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است. به‌نظر می‌رسد فعالیت ورزشی به‌صورت حاد، در ابتدا اثر بسیار کمی بر مقادیر nAchR داشته باشد، اما پس از چهار ساعت، اثرات سازگاری ورزشی به یک جلسه فعالیت باعث افزایش مقادیر nAchR می‌شود که این افزایش در گروه ال‌آرژینین به‌همراه ورزش نسبت به گروه ورزش به‌تنهایی بیشتر بوده است؛ ازاین‌رو، شاید بتوان گفت که جلوگیری از کاهش مقادیر nAchR به‌وسیلهٔ مکمل‌دهی ال‌آرژینین باعث شده است که سطوح nAchR در گروه ال‌آرژینین و ورزش نسبت به گروه ورزش قبل از فعالیت وامانده‌ساز بالاتر باشد و درنتیجه، گروه

ال‌آرژینین و ورزش نسبت به گروه ورزش، به یک جلسه فعالیت وامانده‌ساز پاسخ بهتری داده و لذا، سازگاری‌های صورت‌گرفته در چهار ساعت پس از ورزش در گروه ال‌آرژینین و ورزش بیشتر باشد. همچنین، با توجه به بالاتربودن مقادیر nNOS در عضلات تندانقباض، این امکان وجود دارد که فعالیت به‌تنهایی نتوانسته است باعث ایجاد معناداری بلافاصله پس از فعالیت ورزشی گردد، اما با گذشت چهار ساعت بعد از فعالیت ورزشی، اثر ورزش تقویت گشته و باعث معناداری تفاوت فعالیت ورزشی چهار ساعت بعد نسبت به گروه کنترل گردد.

ازسوی‌دیگر، بین مقادیر nAchR در گروه ال‌آرژینین و ورزش بلافاصله و گروه ال‌آرژینین و ورزش چهار ساعت بعد و نیز بین مقادیر nAchR گروه ورزش بلافاصله و ورزش چهار ساعت در عضلهٔ EDL تفاوت معناداری مشاهده نشد. نتایج پژوهش‌ها نشان می‌دهند که بیان هریک از ایزوفرم‌های NOS با توجه به نوع تار عضلانی متفاوت می‌باشد؛ به‌طوری‌که nNOS در تارهای عضلانی گلیکولیتیکی، بیشتر از تارهای اکسایشی است (۳۵،۳۴)؛ ازاین‌رو، به‌نظر می‌رسد مکمل‌دهی ال‌آرژینین و ورزش اگرچه توانسته است نسبت به گروه کنترل تفاوت معناداری را در دیگر گروه‌ها ایجاد کند، اما این اثر آنقدر بزرگ نبوده است که بتواند منجر به افزایش nAchR در چهار ساعت بعد از ورزش نسبت به گروه‌های بلافاصله بعد از فعالیت گردد. لازم‌به‌ذکر است که NO از دو مسیر اصلی وابسته به NOS و مسیر غیروابسته به NOS سنتز می‌شود. بااین‌حال، تفاوتی اساسی بین این دو مسیر وجود دارد؛ بدین‌معنا که مسیر وابسته به NOS نیازمند اکسیژن است؛ درحالی‌که مسیر نیترات ـ نیتریت ـ NO، تحت شرایط هایپوکسی مسیر بهتری است. در مسیر وابسته به NOS، آمینو اسید ال‌آرژینین، پیش‌ساز اصلی NO است؛ درحالی‌که در مسیر غیروابسته به NOS، نیتریت و نیترات، پیش‌سازهای اصلی تولید NO هستند. با توجه به این‌که این پژوهش با شدت VO_{2MAX} ۸۰ـ۷۰ انجام شده است (۳۰)، احتمالاً شرایطی مانند شرایط هایپوکسی در بافت به‌وجود آورده باشد که می‌تواند مسیر غیروابسته به NOS را درگیر کرده باشد. لازم‌به‌ذکر است که مقادیر پایهٔ نیتریت و نیترات در سن سالمندی کاهش می‌یابد (۲۲)؛ لذا، احتمالاً می‌توان دلیل عدم تغییر میزان nAchRدر عضلهٔ EDL در گروه ورزش بلافاصله نسبت به گروه ورزش چهار ساعت بعد و گروه ال‌آرژینین و ورزش بلافاصله و گروه ورزش و ال‌آرژینین چهار ساعت را سطوح پایین تولیدNO به‌دلیل کمبود پیش‌سازهای مسیر غیروابسته به NOS در شرایط هایپوکسی ذکر کرد. با توجه به موارد یادشده به‌نظر می‌رسد ورزش و مکمل‌دهی ال‌آرژینین می‌تواند به‌عنوان عواملی مستقل بر مقادیر nAchR که در دورهٔ سالمندی با کاهش روبه‌رو هستند اثرگذار باشد. بااین‌حال، چگونگی

استفاده از مکمل ال‌آرژینین به‌همراه ورزش جهت اثرگذاری مثبت و حداکثری بر مقادیر nAchR و نیز شدت مناسب فعالیت ورزشی جهت اثرگذاری این مکمل نیاز به پژوهش و بررسی دارد. علاوه‌براین، به‌نظر می‌رسد مقدار پاسخ nAchR به ورزش و مکمل ال‌آرژینین در عضلهٔ تندانقباض و کندانقباض متفاوت باشد که دلیل این امر را می‌توان عواملی همچون سطوح پایه‌ای متفاوت NO و کاهش عملکرد NOS و دیگر پیش‌سازهای تولید NO در مسیر نیترات- نیتریت-NO دانست (۲۲)؛ ازاین‌رو، به‌نظر می‌رسد جهت اثبات اثرگذاری ورزش به‌همراه مکمل ال‌آرژینین بر مقادیر در هر دو عضلهٔ سلئوس و EDL، نیاز به مطالعات بیشتر با اندازه‌گیری مسیرهای درگیر در تولید NO و عوامل درگیر در تولید و تثبیت nAchR شامل: نروگلین، ARIA، CGRP (پپتید مرتبط با ژن کلسی تونین)، آگرین و نیتریک اکساید (NO) باشد (۱۴).

به‌طورکلی، پژوهش حاضر به‌عنوان اولین پژوهش صورت‌گرفته دراین‌زمینه نشان داد که ورزش و مکمل‌دهی ال‌آرژینین به‌صورت مجزا و استفادهٔ هم‌زمان می‌تواند عاملی مثبت در مقادیر nAchR باشد که طی روند سالمندی با کاهش روبه‌رو می‌شود؛ ازاین‌رو، همان‌طور که در این پژوهش نشان داده شد، فعالیت استقامتی به‌همراه مصرف ال‌آرژینین سبب افزایش nAchR می‌گردد. پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های آتی که در حوزهٔ سالمندی و فعالیت بدنی صورت می‌گیرد، استفاده از مکمل ال‌آرژینین به‌عنوان عاملی اثرگذار بر nAchR نیز موردتوجه قرار گیرد تا اثرات ال‌آرژینین به‌عنوان یک مکمل به‌همراه ورزش جهت استفادهٔ سالمندان با اطلاعات بیشتر و دقیق‌تر موردبررسی قرار گیرد.

پیام مقاله: به‌نظر می‌رسد که مکمل‌دهی ال‌آرژینین به‌همراه فعالیت استقامتی می‌تواند روش مناسبی برای کاهش سارکوپنیا با اثرگذاری بر میزان پروتئین گیرندهٔ نیکوتینی استیل کولین در افراد سالمند باشد.

منابع

1. Rivard A, Fabre J E, Silver M, Chen D, Murohara T, Kearney M, et al. Age-dependent impairment of angiogenesis. Circulation. 1999; 99(1): 111-20.
2. Kim B J, Ahn SH, Kim H M, Lee SH, Koh J M. Low skeletal muscle mass associates with low femoral neck strength, especially in older Korean women: The fourth Korea national health and nutrition examination survey (KNHANES IV). Osteoporosis International. 2015; 26(2): 737-47.
3. Kadi F, Charifi N, Denis C, Lexell J. Satellite cells and myonuclei in young and elderly women and men. Muscle & Nerve. 2003; 29(1): 120-7.

4. Tyrovolas S, Koyanagi A, Olaya B, Ayuso-Mateos J L, Miret M, Chatterji S, et al. Factors associated with skeletal muscle mass, sarcopenia, and sarcopenic obesity in older adults: A multi-continent study. Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle. 2015; 7: 312–321.
5. Chien M Y, Kuo H K, Wu Y T. Sarcopenia, cardiopulmonary fitness, and physical disability in community-dwelling elderly people. Physical Therapy. 2010; 90(9): 1277-87.
6. Lanza I R, Short D K, Short K R, Raghavakaimal S, Basu R, Joyner M J, et al. Endurance exercise as a countermeasure for aging. Diabetes. 2008; 57(11): 2933-42.
7. Trappe T A, Carroll C C, Dickinson J M, LeMoine J K, Haus J M, Sullivan B E, et al. Influence of acetaminophen and ibuprofen on skeletal muscle adaptations to resistance exercise in older adults. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 2011; 300(3): 655-62.
8. Fry C S, Glynn E L, Drummond M J, Timmerman K L, Fujita S, Abe T, et al. Blood flow restriction exercise stimulates mTORC1 signaling and muscle protein synthesis in older men. Journal of Applied Physiology. 2010; 108(5): 1199-209.
9. Doherty T J. Invited review: Aging and sarcopenia. Journal of Applied Physiology. 2003; 95(4): 1717-27.
10. Balice-Gordon R J. Age-related changes in neuromuscular innervation. Muscle & Nerve. 1998; 20(S5): 83-7.
11. Edström E, Altun M, Bergman E, Johnson H, Kullberg S, Ramírez-León V, et al. Factors contributing to neuromuscular impairment and sarcopenia during aging. Physiology & Behavior. 2007; 92(1): 129-35.
12. Jang Y C, Van Remmen H. Age-associated alterations of the neuromuscular junction. Experimental Gerontology. 2011; 46(2): 193-8.
13. Huh K H, Fuhrer C. Clustering of nicotinic acetylcholine receptors: From the neuromuscular junction to interneuronal synapses. Molecular Neurobiology. 2002; 25(1): 79-112.
14. Hasebe M, Yoshino M. Nitric oxide/ cGMP/PKG signaling pathway activated by M1-type muscarinic acetylcholine receptor cascade inhibits Na+-activated K+ currents in Kenyon cells. Journal of Neurophysiology. 2016; 115(6):3174-85.
15.Kramarcy N R, Sealock R. Syntrophin isoforms at the neuromuscular junction: Developmental time course and differential localization. Molecular and Cellular Neuroscience. 2000; 15(3): 262-74.
16. Stamler J S, Meissner G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. Physiological Reviews. 2001; 81(1): 209-37.
17. Smith L W, Smith J D, Criswell D S. Involvement of nitric oxide synthase in skeletal muscle adaptation to chronic overload. Journal of Applied Physiology. 2002; 92(5): 2005-11.
18. Song W, Kwak H B, Kim J H, Lawler J M. Exercise training modulates the nitric oxide synthase profile in skeletal muscle from old rats. The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences. 2009; 64(5): 540.

19. Richmonds C R, Boonyapisit K, Kusner L L, Kaminski H J. Nitric oxide synthase in aging rat skeletal muscle. Mechanisms of Ageing and Development. 1999; 109(3): 177-89.
20. Palmer R M. The L-arginine: Nitric oxide pathway. Current Opinion in Nephrology and Hypertension. 1993; 2(1): 122-8.
21. Stuehr D J, Santolini J, Wang Z Q, Wei C C, Adak S. Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. Journal of Biological Chemistry. 2004; 279(35): 36167-70.
22. Feelisch M, Fernandez B O, Bryan N S, Garcia-Saura M F, Bauer S, Whitlock D R, et al. Tissue processing of nitrite in hypoxia an intricate interplay of nitric oxide-generating and-scavenging systems. Journal of Biological Chemistry. 2008; 283(49): 33927-34.
23. Willoughby DS. Intracellular Mechanistic Role of Nitric Oxide: A Comparative Analysis of the Effectiveness of L-Arginine and L-Citrulline Supplementation on Nitric Oxide Synthesis and Subsequent Exercise Performance in Humans. International Journal of Food and Nutritional Science. 2015;2(1):1-8.
24. Kohli R, Meininger C J, Haynes T E, Yan W, Self J T, Wu G. Dietary L-arginine supplementation enhances endothelial nitric oxide synthesis in streptozotocin-induced diabetic rats. The Journal of Nutrition. 2004; 134(3): 600-8.
25. Falls D L, Rosen K M, Corfas G, Lane W S, Fischbach G D. ARIA, a protein that stimulates acetylcholine receptor synthesis, is a member of the neu ligand family. Cell. 1993; 72(5): 801-13.
26. Greenberg M E, Ziff E B, Greene L A. Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. Science. 1986; 234(4772): 80-3.
27. Adams G. The molecular response of skeletal muscle to resistance training. Deutsche Zeitschrift Sportmedizin. 2010; 3: 61-7.
28. Lawler J M, Powers S K, Hammeren J, Martin A D. Oxygen cost of treadmill running in 24-month-old Fischer-344 rats. Medicine and Science in Sports and Exercise. 1993; 25(11): 1259-64.
29. Naito H, Powers S K, Demirel H A, Aoki J. Exercise training increases heat shock protein in skeletal muscles of old rats. Medicine and Science in Sports and Exercise. 2001; 33(5): 729-34.
30. Batista-de-Oliveira M, Lopes A A C, Mendes-da-Silva R F, Guedes R C A. Aging-dependent brain electrophysiological effects in rats after distinct lactation conditions, and treadmill exercise: A spreading depression analysis. Experimental Gerontology. 2012; 47(6): 452-7.
31. De Oliveira S, Diniz D, Amaya-Farfan J. Carbohydrate–energy restriction may protect the rat brain against oxidative damage and improve physical performance. British Journal of Nutrition. 2003; 89(01): 89-96.
32. Ji L L, Mitchell E W. Effects of adriamycin on heart mitochondrial function in rested and exercised rats. Biochemical Pharmacology. 1994; 47(5): 877-85.

33. Suzuki J. L-arginine supplementation causes additional effects on exercise-induced angiogenesis and VEGF expression in the heart and hind-leg muscles of middle-aged rats. The Journal of Physiological Sciences. 2006; 56(1): 39-44.
34. Hussain S N, El-Dwairi Q, Abdul-Hussain M N, Sakkal D. Expression of nitric oxide synthase isoforms in normal ventilatory and limb muscles. Journal of Applied Physiology. 1997; 83(2): 348-53.
35. Lau K S, Grange R W, Isotani E, Sarelius I H, Kamm K E, Huang P L, et al. nNOS and eNOS modulate cGMP formation and vascular response in contracting fast-twitch skeletal muscle. Physiological Genomics. 2000; 2(1): 21-7.

ارجاع دهی

نورشاهی مریم ، رضایی رسول ، آقاجان سجاد ، صالح پور مجتبی ، خداقلی فریبا. تأثیر یک دوره مکمل‌دهی ال‌آرژنین بر پاسخ گیرندهٔ نیکوتینی استیل کولین عضلهٔ اسکلتی موش‌های صحرایی نر سالمند به فعالیت حاد وامانده‌ساز. فیزیولوژی ورزشی. بهار ۱۳۹۶؛ ۹(۳۳): ۸۶-۱۷۳. شناسه دیجیتال:10.22089/spj.2017.946

Nourshahi. M, Rezaei. R, Aghajan, S. Salehpor. M. Khodagholi, F. Effect of L-Arginine Supplementation on nAchR Response in Skeletal Muscles to Exhaustive Acute Exercise in Old Rats. Spring 2017; 9 (33): 173-86. (In Persian). Doi: 10.22089/spj.2017.946

Effect of L-Arginine Supplementation on nAchR Response in Skeletal Muscles to Exhaustive Acute Exercise in Old Rats

M. Nourshahi[1], R. Rezaei[2], S. Aghajan[3], M. Salehpor[4], F. Khodagholi[5]

1. Associate Professor of Sport Physiology, Shahid Beheshti University
2. Ph. D. Student of Sport Physiology, Shahid Beheshti University *
3. M. Sc. of Sport Physiology, Shahid Beheshti University
4. Assistant Professor of Sport Physiology, Shahid Rajaee Teacher Training University
5. Associate Professor of Neuroscience Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences

Received: 2016/02/14 **Accepted: 2016/05/21**

Abstract

The purpose of this study was to investigate the effect of L-arginine supplementation on the nAchR response in hind limb of old male rats after exhaustive acute exercise. For this purpose, 32 Wistar rats (age: 22 months, weight: 380±20gr) were selected. After one week of familiarization with laboratory environment, they were randomly divided into four groups consisted of: 1) L-Arginine supplement with one session of exhaustive endurance exercise, 2) L-arginine supplement 3) exercise and 4) control group. For the supplementation groups, they consumed water containing 2.5% L-Arginine for two weeks. In the exercise day, the training groups performed an exhaustive running with 30 meters per minute speed and 5-degree incline, equivalent to approximately 75-80% of their VO2max. Immediately and four hours after exercise they anesthesia and sampling was performed from EDL and Soleus muscles. Then, for statistical analysis of the data's, the one-way ANOVA was used. data of this study illustrate that nAchR level in L-arginine supplement, significantly was higher than control group in EDL and Soleus muscles ($P<0.001$). And also, nAchR level in L-Arginine supplement with exercise and exercise group was increased significantly four hours after exhaustive exercise than control group in EDL and Soleus muscles ($P<0.001$). The result showed that L-Arginine supplementation with exercise increased of nAchR levels in old rat. It seems L-Arginine supplementation with exercise can be an appropriate approach to decrease Sarcopenia with effect on nAchR level in old aged people.

Keywords: Nicotinic Acetylcholine Receptor, L Arginine, Exhaustive Acute Exercise

* Corresponding Author Email: R_Rezaei@sbu.ac.ir