

تأثیر یک دوره تمرین هوازی و مهار نیتریک اکساید بر میزان نوروتروپسین عضله کند و تند انقباض موش‌های صحرایی نر سالمند

مجتبی صالح پور^۱✉، جواد نعمتی^۲، رسول رضایی^۲

چکیده

مقدمه: یکی از عوامل از هم پاشی پیوندگاه عصب-عضله در دوران سالمندی نوروتروپسین است. هدف از انجام این پژوهش، بررسی اثر یک دوره تمرین هوازی به همراه مهار نیتریک اکساید (NO) بر مقادیر نوروتروپسین عضلات بازکننده دراز انگشتان پا (EDL) و نعلی در موش‌های صحرایی سالمند بود.

روش بررسی: سی و شش سر موش نر نژاد ویستار مسن (۲۰ ماهه) به صورت تصادفی به شش گروه (۱ کنترل: ۲) کنترل-۲۵ (به همراه مهار NO با استفاده از L-NAME با دوز روزانه ۲۵mg/Kg؛ ۳) کنترل-۱۰۰ (۴) تمرین-۲۵ (۵) تمرین-۱۰۰ (۶) و (۶) تمرین تقسیم شدند. گروه‌های تمرینی به مدت ۸ هفته، هر هفته ۵ روز و روزی ۶۰ دقیقه با سرعت ۲۸ متر بر دقیقه به طور فزاینده روی نوارگردان دویند. ۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرین، عضله نعلی و عضله بازکننده دراز انگشتان برداشته شد.

یافته‌ها: کاهش معنی‌دار نوروتروپسین در گروه‌های کنترل-۲۵ و کنترل-۱۰۰ نسبت به گروه کنترل، در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل، در گروه تمرین-۲۵ نسبت به گروه کنترل-۲۵، و در گروه تمرین-۱۰۰ نسبت به گروه کنترل-۱۰۰ در هر دو عضله مشاهده شد ($p < 0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری: تمرین هوازی سبب کاهش نوروتروپسین می‌شود. همچنین تمرین هوازی حتی در شرایط مهار NOS نیز میزان نوروتروپسین را کاهش می‌دهد. بنابراین انجام تمرین هوازی با کاهش نوروتروپسین و احتمالاً اثر جبرانی در افزایش تولید نیتریک اکساید در دوران سالمندی می‌تواند در استحکام ناحیه تماس عصب-عضله و به تعویق افتادن سارکوپنیای ناشی از تحلیل این ناحیه نقش داشته باشد.

کلمات کلیدی: تمرین هوازی، نیتریک اکساید، سالمندی، موش صحرایی

مقدمه

سالمندی با تغییرات ساختاری و فیزیولوژیکی زیادی همراه است. مهم‌ترین و بارزترین تغییر در این دوره، پدیده‌ای به نام سارکوپنیا^۱ (زال توده ماهیچه‌های اسکلتی بدن به دلیل پیری) است. عوامل زیادی سبب بروز سارکوپنیا می‌گردد که شامل کاهش فعالیت بدنی [۱]، تغییر سطوح هورمونی [۲] و عوامل عصبی است [۳]. یکی از تغییرات مهم عصبی دوران سالمندی که سبب بروز سارکوپنیا می‌گردد، تغییر ساختاری و عملکردی پیوندگاه عصب - عضله (NMJ)^۲ است. به طوری که کاهش عملکرد و ساختار این قسمت طی سالمندی سبب تضعیف عملکرد جسمانی می‌گردد [۴، ۵]. پژوهشگران نشان دادند که انتقال سیناپسی سریع و دقیق نیازمند تجمع و چگالی بالای گیرنده‌های انتقال دهنده پیام عصبی در غشای پس‌سیناپسی است. مطالعات نشان می‌دهند که پروتئین‌های مختلفی در تشکیل و تثبیت گیرنده‌های استیل کولینی (AChR)^۳ و دستگاه NMJ نقش دارند که شامل نوروگلین^۴، عامل فعال‌ساز گیرنده استیل کولین^۵، پپتید مرتبط با ژن کلسی‌تونین^۶، آگرین و نیتریک اکساید (NO) هستند [۶]. به نظر می‌رسد NO در تنظیم آزادسازی ناقلین عصبی پیش‌سیناپسی و تثبیت غشای پس‌سیناپسی NMJ نقش دارد [۷، ۸].

نیتریک اکساید به وسیله آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز (NOS) از تبدیل ال - آرژنین به ال سیتروولین تولید می‌شود [۹] که دارای سه ایزوفرم نورونی یا nNOS^۷، اندوتلیالی یا eNOS^۸ و القایی یا iNOS^۹ است [۱۰]. عضله اسکلتی هر سه شکل نیتریک اکساید سنتتاز NOS را بیان می‌کند (البته بیان nNOS غالب است) ولی میزان nNOS در قسمت پس‌سیناپسی NMJ بیشتر است [۱۰، ۱۱]. پژوهشگران نشان

دادند که فعالیت nNOS عضله نعلی و بازکننده دراز انگشتان (EDL)^{۱۰} رت‌ها طی دوران سالمندی کاهش [۱۲] و تمرین استقامتی به‌طور معناداری سبب افزایش بیان پروتئین nNOS در عضله تند انقباض (بخش سفید عضله دوقلو) و کند انقباض (نعلی) موش‌های صحرائی شده است [۱۳]. از دیگر سو، کولی و همکاران (۲۰۰۴) با انجام پژوهشی بر روی سالمندان بیان داشتند که طی سالمندی مقادیر NO کاهش و مکمل دهی ال - آرژنین منجر به بهبود مقادیر NO می‌گردد [۱۴]. این بدان معنی است که با سالمندی میزان NO کاهش می‌یابد و ورزش و مکمل سبب افزایش آن می‌گردد. همچنین پژوهشگران نشان دادند که مهار nNOS منجر به کاهش سطح گیرنده استیل کولین نسبت به گروه کنترل می‌گردد [۱۵]. در حالی که ورزش به تنهایی و ورزش همراه با مصرف ان - نیترو - ال - آرژنین متیل استر (L-NAME)^{۱۱} به عنوان ماده مهارکننده nNOS منجر به افزایش مقادیر پروتئین گیرنده استیل کولینی نسبت به گروه کنترل گردید. این مقادیر در گروه ورزش بیشتر از گروه ورزش همراه با مصرف LNAME بود. این نتایج نشان می‌دهد که علی‌رغم اثر جبرانی ورزش در تولید NO در گروه ورزش همراه با مصرف LNAME، مهار NO در گروه ورزش می‌تواند تا حدی اثرات ورزش بر سطوح این گیرنده‌ها را نسبت به گروه ورزش به تنهایی کاهش دهد [۱۶]. از سوی دیگر، پروتئین آگرین^{۱۲} یکی از عوامل مهمی است که در بیان و دسته‌بندی nAChR در جایگاه اتصال عصبی - عضلانی نقش محوری داشته و شرط لازم و کافی برای ایجاد تمایز پس‌سیناپسی NMJ است [۱۷]. این پروتئوگلیکان به وسیله نورون حرکتی ساخته شده و در سراسر آکسون‌ها انتقال می‌یابد و در نهایت در محیط خارج سلولی جایی که تمایز پس‌سیناپسی نظیر دسته‌بندی AChR در آنجا رخ می‌دهد، آزاد می‌شود [۱۸، ۱۹]. آگرین برای تشکیل و

1. Sarcopenia
2. neuromuscular junction
3. Acetylcholine receptor
4. Neuregulin
5. Acetylcholine receptor inducing activity (ARIA)
6. Calcitonin Gene-related peptide (CGRP)
7. Neuronal nitric oxide synthase
8. Endothelial nitric oxide synthase
9. Inducible nitric oxide synthase

10. Extensor digitorum longus

11. NG nitro- L- arginine methyl ester

12. Agrin

فعالیت nNOS [۲۰] و کاهش نوروتروپسین منجر به بهبود عوامل درگیر در تثبیت AchR به ویژه در دوران سالمندی می‌گردد. بنابراین این سؤال مطرح می‌گردد که تغییرات NO طی سالمندی آیا بر میزان نوروتروپسین به عنوان عامل مهارکننده آگرین اثرگذار است؟ و آیا ورزش می‌تواند اثر احتمالی تغییرات NO بر میزان این پروتئین را در عضله اسکلتی کند و تند انقباض تعدیل نماید؟ بنابراین هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر یک دوره تمرین هوازی و مهار نیتریک اکساید بر میزان نوروتروپسین عضله کند و تند انقباض موش‌های صحرایی نر سالمند بود.

روش بررسی

در این پژوهش ۳۶ سر موش نر ویستار ۲۰ ماهه به عنوان نمونه تحقیق از مؤسسه رازی خربداری و در شرایط دمایی $22 \pm 1/4$ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۵٪ و چرخه روشنایی-تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت نگهداری و به وسیله آب و غذای مخصوص رت تغذیه شدند. تمام حیوانات به منظور آشناسازی با نوارگردان به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۸-۱۲ متر بر دقیقه به مدت سه روز ورزش کردند. بعد از گذشت یک هفته (سازگاری با محیط آزمایشگاه) رت‌ها به طور تصادفی به شش گروه (۱ کنترل؛ ۲) کنترل به همراه مهار NO با دوز روزانه 25mg/Kg ؛ ۳) کنترل به همراه مهار NO با دوز روزانه 100mg/Kg ؛ ۴) تمرین استقامتی به همراه مهار NO با دوز روزانه 25mg/Kg ؛ ۵) تمرین استقامتی به همراه مهار NO با دوز روزانه 100mg/Kg ؛ ۶) تمرین استقامتی تقسیم شدند. تمامی مراحل کار این پژوهش زیر نظر کمیته اخلاق پژوهشی پژوهشگاه تربیت بدنی و علوم ورزشی انجام شد.

سه روز قبل از شروع آزمایش برای مهار nNOS روزانه از L-NAME (Sigma N5751) به صورت محلول با آب آشامیدنی در دو دوز ۲۵ (معادل $0/187$ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) و ۱۰۰ (معادل $0/75$ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) به ازای هر کیلوگرم از وزن موش‌ها خوراندند شد (شواهد نشان دادند که

تجمع پس‌سیناپسی nAChR پیامش را در قسمت خارج‌غشایی از طریق تیروزین کیناز ویژه عضله اعمال می‌کند. همچنین، شواهد اخیر حاصل از مطالعات کشت سلول عضلانی و مطالعات انجام شده در دوران جنینی حاکی از آن است که NO یک اثرکننده تمایز پس‌سیناپسی ناشی از آگرین در NMJ بوده و در تجمع AchR ناشی از آگرین نقش دارد [۱۷، ۱۸]. پژوهشگران نشان داد که مهار NO منجر به کاهش سطوح آگرین و فعالیت استقامتی منجر به افزایش سطوح آگرین می‌گردد [۲۰]. علاوه بر این، در دوران سالمندی آگرین با افزایش پروتئینی به نام نوروتروپسین^۲ مهار شده و این موضوع سبب تحلیل NMJ می‌گردد [۲۱].

نوروتروپسین با اتصال به آگرین و تجزیه آن منجر به کاهش مسیر پیام‌رسانی آگرین می‌گردد [۲۱]. با افزایش میزان نوروتروپسین از طریق القای ژن میزان NMJ کاهش پیدا می‌کند [۲۲]. درای و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که تمرین می‌تواند به همراه مصرف مکمل ویتامین D باعث کاهش تخریب آگرین در افراد سالمند گردد. در واقع نوروتروپسین سبب آزاد کردن پاپانه C- آگرین می‌گردد و از این طریق آگرین را مهار می‌کند [۲۳]. همچنین نشان داده شد که فعالیت ورزشی در طی سالمندی منجر به کاهش مقادیر نوروتروپسین می‌گردد که پیامد آن کاهش تخریب آگرین است [۲۳].

با توجه به مطالب ارائه شده می‌توان گفت که از یکسو NO نقش مهمی در تجمع AchR ناشی از آگرین ایفا می‌کند در حالی که نوروتروپسین می‌تواند با تجزیه آگرین، تأثیر مهاری بر این مسیر داشته باشد. از دیگر سو، مهار فعالیت NO منجر به کاهش همجوشی و بیژیکول‌های نوروترانسمیتری می‌گردد در حالی که ورزش منجر به بهبود جریان نوروترانسمیتری افزایش مقادیر آگرین و کاهش سارکوپنیا می‌گردد [۲۴-۲۶]. همچنین، ورزش به ویژه تمرین هوازی به خاطر اثرات سودمندش در سازگاری‌های NMJ از جمله افزایش AchR [۱۶]، آگرین،

1. muscle-specific tyrosine kinase (musk)
2. Neurotrypsin

(Abcam) برداشته شدند.

برای انجام تست وسترن بلات مقادیر مساوی از پروتئین توسط ژل پلی آکریل آمید SDS-PAGE ۱۲٪ جداسازی شد. بعد از مرحله الکتروفورز، پروتئین‌های ژل به کاغذ PVDF منتقل شده و کاغذ در محلول بلاکینگ برای یک ساعت قرار گرفت. سپس کاغذ یک شب در آنتی‌بادی اولیه (آنتی‌نوروتروپسین) در چهار درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و در روز دوم سه بار با محلول TBST شستشو داده شد و کاغذ با آنتی‌بادی ثانویه به مدت یک ساعت انکوبه شد. بعد از این مرحله بلات‌ها را با کیت ECL پوشانده و با استفاده از فیلم رادیولوژی ظاهر شدند. سپس بلات‌ها را در بافر استریپینگ شستشو داده و آنتی‌بادی بتا‌کتین را به روی کاغذ گذاشته و دوباره با آنتی‌بادی ثانویه انکوبه شدند و بتا‌کتین کنترل نیز در فیلم رادیولوژی ظاهر شد. توسط برنامه Image J باندهای به دست آمده دانسیتومتری شدند.

طبیعی بودن داده‌ها به وسیله آزمون کولموگروف-اسمیرنوف مشخص شد. برای بررسی اختلاف معناداری سطوح نوروتروپسین در شش گروه از آزمون آنوای یکطرفه استفاده شد. برای تعیین تفاوت بین گروه‌ها از آزمون تعقیبی بونفرونی استفاده شد. سطح معناداری نیز $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

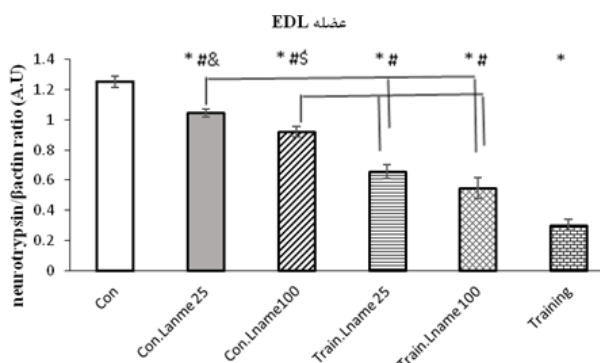
نتایج آزمون آماری تحلیل واریانس یک سویه نشان داد که تغییرات میزان پروتئین نوروتروپسین در عضله نعلی گروه‌های مختلف معنادار بود ($F(3, 5) = 114/932, p = 0/001$). نتایج آزمون تعقیبی بونفرونی نشان داد که میزان نوروتروپسین بین گروه کنترل با دیگر گروه‌ها تفاوت معناداری وجود داشت و میزان نوروتروپسین در گروه‌های دیگر نسبت به گروه کنترل کاهش یافت ($p = 0/001$). همچنین مقادیر نوروتروپسین در گروه تمرین استقامتی با تمام گروه‌ها تفاوت معناداری داشت به طوری که کاهش این پروتئین در گروه تمرین استقامتی

دوز ۱۰۰ تا ۹۸٪ سبب مهار L-NAME می‌گردد و دوز ۲۵ نیز به عنوان دوز با مهار کمتر در نظر گرفته شد [۲۰] و این کار تا زمان کشتار حیوانات ادامه داشت. همچنین برای کنترل میزان مصرف L-NAME، در هر قفس یک موش قرار گرفت و آب مصرفی حیوانات نیز هر روز در یک ساعت مشخص اندازه‌گیری شد.

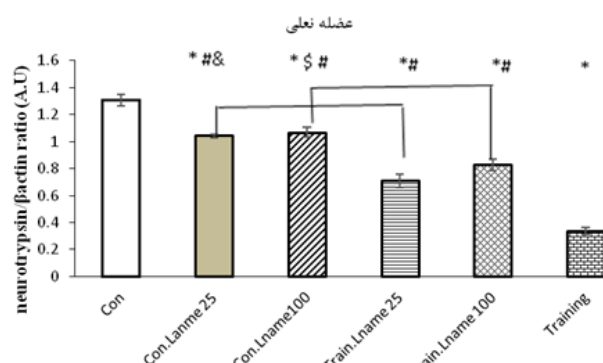
موش‌ها در گروه تجربی به مدت هشت هفته، هر هفته پنج روز روی نوارگردان مخصوص حیوانات (ساخت شرکت تکنیک آزما) تمرین می‌کردند. کل دوره تمرین به سه مرحله آشنایی، اضافه بار و حفظ یا تثبیت شدت کار تقسیم شد. در مرحله آشنایی (هفته اول)، موش‌ها هر روز به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه روی نوارگردان ویژه جوندگان راه می‌رفتند. در مرحله اضافه بار (هفته دوم تا چهارم)، موش‌ها ابتدا به مدت ۱۵ دقیقه و با سرعت ۱۲ متر بر دقیقه راه رفته و به تدریج در مدت ۳ هفته شدت و مدت فعالیت افزایش یافت تا به میزان نهایی تعیین شده برای هر گروه رسید. در مرحله حفظ یا تثبیت، هفته پنجم تا هشتم موش‌ها به مدت چهار هفته با شدت تعیین شده ۲۸ متر بر دقیقه، معادل ۷۵-۸۰٪ حداکثر اکسیژن مصرفی و به مدت ۶۰ دقیقه روی نوارگردان دویدند، که در تمامی مراحل فوق شیب نوارگردان صفر درجه بود و هرگز از شوک الکتریکی استفاده نگردید [۲۷] ضمناً از مجموع زمان فعالیت، پنج دقیقه برای گرم کردن و پنج دقیقه برای سرد کردن موش‌ها با سرعت هفت متر بر دقیقه در نظر گرفته شد.

حیوانات با تزریق درون صفاقی ترکیبی از کتامین^۱ (۳۰-۵۰ mg/Kg) و زایلازین^۲ (۳-۵ mg/Kg) بی‌هوش و به منظور بافت برداری از محافظه خارج و به روی میز جراحی انتقال داده شدند. با توجه به نقش متفاوت دو عضله نعلی به عنوان عضله کند انقباض و EDL به عنوان عضله تند انقباض، این دو عضله برای اندازه‌گیری میزان پروتئین نوروتروپسین به روش وسترن بلات (Anti-Neurotrypsin) شرکت

1. Ketamine
2. Xylazine



نمودار ۲- میزان نوروتروپوسین در عضله EDL به تفکیک گروهها



نمودار ۱- میزان نوروتروپوسین در عضله نعلی به تفکیک گروهها

علامت # نشان دهنده تفاوت معنی دار با گروه تمرین
علامت \$ نشان دهنده تفاوت معنی دار گروه کنترل-۲۵ با گروه تمرین-۱۰۰ است.

علامت * نشان دهنده تفاوت معنی دار با گروه کنترل
علامت & نشان دهنده تفاوت معنی دار گروه کنترل-۲۵ با گروه تمرین-۲۵

($p=0/001$). نتایج حاکی از کاهش مقادیر نوروتروپوسین در گروه‌های تمرین استقامتی به همراه مهارگر نیتریک اکساید نسبت به گروه‌های کنترل مهارگر نیتریک اکساید بود.

بحث و نتیجه گیری

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که هر دو دوز مهارکننده NOS ۲۵ و ۱۰۰ باعث کاهش مقادیر نوروتروپوسین در عضله نعلی شده است. همچنین، ورزش به همراه مهارگر نوروتروپوسین باعث کاهش مقادیر نوروتروپوسین شده است. با این حال، ورزش بدون مهارگر نیتریک اکساید بیشترین کاهش را در مقادیر نوروتروپوسین ایجاد کرده است.

اثر مهار NO بر کاهش سطوح نوروتروپوسین را در پیوندگاه عصب-عضله نسبت به گروه کنترل را می‌توان ناشی از کاهش همجوشی ویزیکول‌های نوروترانسمیتری با انتهای پایانه‌های عصبی دانست [۸]. یاکولوا و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که مهار نیتریک اکساید باعث کاهش همجوشی ویزیکول‌های حامل نوروترانسمیتری با نواحی انتهایی پایانه‌های عصبی می‌شود که این عمل منجر به کاهش مقادیر مولکول‌های فعال در فضای سیناپسی می‌گردد [۸]. با توجه به اینکه در پژوهش حاضر مهارگر NO در تمام دوره هشت هفته‌ای به حیوانات داده شده، شاید بتوان گفت کاهش NO منجر به کاهش همجوشی ویزیکول‌های نوروترانسمیتری و متعاقب آن کاهش ریزش مولکول‌های فعال همچون نوروتروپوسین به فضای سیناپسی شده که پیامد آن کاهش مقادیر نوروتروپوسین در

نسبت به گروه‌های دیگر بیشتر بود ($p=0/001$). همچنین مقادیر نوروتروپوسین در گروه‌های کنترل با مهار نیتریک اکساید با دوزهای ۲۵ و ۱۰۰ به ترتیب با گروه‌های تمرین استقامتی و مهار با دوزهای ۲۵ و ۱۰۰ ($p=0/001$) تفاوت معنی داری داشت، به طوری که در گروه‌های تمرین استقامتی و مهار نیتریک اکساید دوز ۲۵ و ۱۰۰ نسبت به گروه‌های کنترل مهارگر نیتریک اکساید دوز ۲۵ و ۱۰۰ میزان پروتئین نوروتروپوسین کاهش یافت.

نتایج آزمون آماری تحلیل واریانس یک سویه نشان داد که تغییرات میزان پروتئین نوروتروپوسین عضله EDL گروه‌های مختلف معنادار بود ($p=0/001$ و $F(30, 5) = 18/449$). نتایج آزمون تعقیبی بونفرونی نشان داد که بین میزان نوروتروپوسین بین گروه کنترل با دیگر گروه‌ها تفاوت معناداری وجود داشت و میزان این پروتئین در گروه‌های دیگر نسبت به گروه کنترل کاهش یافت ($p=0/001$). همچنین مقادیر نوروتروپوسین در گروه تمرین استقامتی با تمام گروه‌ها تفاوت معناداری داشت ($p=0/001$) به طوری که میزان کاهش این پروتئین نسبت به دیگر گروه‌ها بیشتر بود. همچنین در مقادیر نوروتروپوسین در گروه کنترل با مهار نیتریک اکساید با دوز ۲۵ با گروه تمرین استقامتی و مهارگر دوز ۲۵ تفاوت معنی داری یافت شد ($p=0/001$). همچنین مقادیر نوروتروپوسین در گروه کنترل با مهار نیتریک اکساید دوز ۱۰۰ با گروه تمرین استقامتی و مهارگر نیتریک اکساید دوز ۱۰۰ تفاوت معنی داری داشت

EDL و نعلی در موش‌های سالمند است.

یکی دیگر از یافته‌های دیگر تحقیق حاضر عدم وجود تفاوت معنادار در دوزهای ۲۵ و ۱۰۰ در کاهش مقادیر نوروتروپسین است. این امر نشان می‌دهد که احتمالاً پژوهشگران بتوانند برای درک مکانیسم‌های احتمالی با استفاده از مقادیر کمتر مهارکننده نیتریک اکساید (دوز ۲۵) اقدام نمایند. از دیگر نکات جالب پژوهش حاضر همسویی فیزیولوژیک نتایج پژوهش حاضر با یافته‌های صالح پور و همکاران در دو پژوهش صورت گرفته درباره اثر توأمان ورزش استقامتی و مهار NO بر تغییرات آگرین و nAChR بود [۱۶، ۲۰]. به طوری که مهار NO با دوز ۱۰۰ منجر به کاهش سطوح آگرین نسبت به گروه کنترل شده بود و ورزش به همراه مهارکننده و همچنین ورزش به تنهایی این اثر مهار را رفع و منجر به افزایش مقادیر آگرین بیشتر از سطوح کنترل شده بود [۲۰]. در رابطه با تغییرات nAChR نیز مهار NO منجر به کاهش مقادیر nAChR و ورزش منجر به افزایش مقادیر nAChR حتی در گروه ورزش به همراه مهارکننده nNOS شد [۱۶]. در واقع پیامد احتمالی اثر توأمان ورزش استقامتی و مهار NO سبب کاهش نوروتروپسین شده و مهار نوروتروپسین نیز به نوبه خود سبب مهار تجزیه آگرین شده و در نتیجه میزان آگرین افزایش می‌یابد. افزایش آگرین نیز مسیره‌های پایین دست را فعال کرده و مقادیر nAChR را افزایش خواهد داد. این موضوع در دوران سالمندی که با افزایش میزان نوروتروپسین [۲۳] و همچنین کاهش مقادیر NO همراه است [۱۲]، اهمیت زیادی خواهد داشت.

به طور کلی با توجه به نتایج پژوهش‌های یاد شده و پژوهش حاضر می‌توان نتیجه گرفت که مهار NO منجر به کاهش عوامل مثبت و منفی اثر گذار بر مقادیر nAChR همچون آگرین و نوروتروپسین می‌گردد و ورزش به صورت انتخابی منجر به افزایش آگرین و کاهش نوروتروپسین می‌گردد که نتیجه آن افزایش مقادیر nAChR طی دوران سالمندی است. با توجه به اینکه شواهد نشان دادند NO در سیستم

گروه‌های مهارگر ۲۵ و ۱۰۰ و تمرین به همراه مهارگر ۲۵ و ۱۰۰ شده است. از دیگر سو، با توجه به کاهش مقادیر نوروتروپسین در دو گروه ورزش به همراه مصرف مهارکننده NOS با دوزهای ۲۵ و ۱۰۰ شاید بتوان گفت اگرچه مهار NO منجر به کاهش مقادیر نوروتروپسین شده است، با این حال ورزش در حالت مهار NOS نیز منجر به کاهش نوروتروپسین شده است که این امر نشان دهنده مسیره‌های احتمالی دیگر به غیر از مسیر NO است [۲۴، ۲۸].

یکی از نتایج جالب پژوهش حاضر کاهش معنادار مقادیر نوروتروپسین در گروه ورزش نسبت به دیگر گروه‌ها است. با توجه به اینکه کاهش مقادیر نوروتروپسین در گروه ورزش نسبت به گروه ورزش به همراه مهارگر NO معنادار شده است، شاید بتوان گفت یکی از مسیره‌های که ورزش از طریق آن باعث کاهش مقادیر نوروتروپسین می‌گردد از طریق فعالیت NOS است. اگرچه جهت اثر مهار ورزش بر مسیره‌های بالا دستی تولید نوروتروپسین تحقیقی مشاهده نشد، با این حال، یکی از احتمالات کاهش مقادیر نوروتروپسین از طریق ورزش را می‌توان اثرگذاری ورزش بر مسیره‌های احتمالی در مهار تخریب و افزایش تولید پروتئین‌های سلولی [۳۰-۲۸] و انتقال نوروتروپسین به فضای سیناپسی با دخالت NO دانست [۸]. با این وجود، برای درک بهتر نیاز به انجام پژوهش‌های بیشتر با سنجش عوامل بالا دستی تولید و رهایش نوروتروپسین احساس می‌شود.

مشابه عضله نعلی در عضله EDL نیز مهار NO به تنهایی منجر به کاهش سطوح نوروتروپسین شد. همچنین ورزش به همراه دوزهای مختلف مهارکننده NO نیز منجر به کاهش نوروتروپسین شد. با این حال ورزش به تنهایی بیشترین اثر کاهشی در مقادیر نوروتروپسین را داشت. که نشان دهنده اثرگذار بودن مسیر NO در کاهش مقادیر نوروتروپسین ناشی از ورزش است. با توجه به یکسان بودن تغییرات دو عضله شاید بتوان گفت که اثرگذاری ورزش بر مقادیر نوروتروپسین با حضور و مهار NO فارغ از مشخصات فیزیولوژیک در عضلات

نوروتروپوسین و سارکوپنیای ناشی از آن در دوران سالمندی مؤثر باشد. با این حال، به نظر می‌رسد اثر ورزش مسیرهای تولیدی مقادیر نوروتروپوسین قبل از ریزش در فضای سیناپسی باشد با این حال برای درک بهتر این مسیر نیاز به انجام پژوهش‌های بیشتری است. همچنین تأیید اثر مکمل‌دهی با عوامل تقویت مسیر NO همچون مکمل ال-آرژنین نیاز به انجام تحقیقی با اندازه‌گیری موارد فوق به همراه مصرف مکمل ال آرژنین احساس می‌شود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی طبق قرارداد شماره ۳۲۲۹۰ مورخ ۹۷/۱۲/۲۶ انجام شد. این مطالعه با کد اخلاق IR.SSRC.REC.1399.073 در پژوهشگاه تربیت بدنی و علوم ورزشی در تاریخ ۱۳۹۹/۶/۲۶ به تصویب رسیده است.

تعارض در منافع

بین نویسندگان هیچ‌گونه تعارضی در منافع انتشار این مقاله وجود ندارد.

عصبی می‌تواند هم به عنوان یک ناقل مهاری و هم به عنوان یک ناقل تحریکی عمل کند [۸] احتمالاً کاهش نوروتروپوسین همراه با مهار NO، می‌تواند نشان‌گر این موضوع باشد که کاهش فعالیت آنزیم nNOS و کاهش NO احتمالاً یک بازخورد منفی و اثر مهاری در ره‌ایش نوروتروپوسین طی این دوران برای حفظ یا کاهش پیشروی تحلیل NMJ داشته باشد. با توجه به اینکه ورزش منجر به کاهش مقادیر نوروتروپوسین، افزایش فعالیت NO و همچنین منجر به افزایش مقادیر آگرین می‌گردد، به نظر می‌رسد ورزش در سطح بالاتر از ریزش و ره‌ایش نورترانس‌میتری همچون مسیرهای تولید آگرین و نوروتروپوسین در سطح نورونی منجر به افزایش تولید آگرین و کاهش مقادیر نوروتروپوسین می‌گردد. با توجه به موارد یاد شده شاید بتوان گفت ورزش جدای از مسیرهای تنظیم ره‌ایش نورترانس‌میتری و تثبیت گیرنده استیل‌کولینی به وسیله NO منجر به کاهش مقادیر نوروتروپوسین در بالا دست شده و در نتیجه افزایش مقادیر NO ناشی ورزش منجر به همجوشی بیشتر ویزیکول‌های نورترانس‌میتری گشته که پیامد آن با مقادیر کاهش یافته نوروتروپوسین منجر به افزایش آگرین و افزایش تثبیت nAChR و در نتیجه بهبود وضعیت NMJ است. به نظر می‌رسد فعالیت‌هوازی منظم در کاهش مقادیر

References

- Chien MY, Kuo HK, Wu YT. Sarcopenia, cardiopulmonary fitness, and physical disability in community-dwelling elderly people. *Physical therapy*. 2010;90(9):1277-1287. doi:10.2522/ptj.20090322
- Fry CS, Glynn EL, Drummond MJ, Timmerman KL, 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):1199-1209. doi:10.1152/jappphysiol.01266.2009
- Doherty TJ. Invited review: aging and sarcopenia. *Journal of applied physiology*. 2003;95(4):1717-1727. doi:10.1152/jappphysiol.00347.2003
- 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):129-135. doi:10.1016/j.physbeh.2007.05.040
- Jang YC, Van Remmen H. Age-associated alterations of the neuromuscular junction. *Experimental gerontology*. 2011;46(2):193-198. doi:10.1016/j.exger.2010.08.029
- Huh KH, Fuhrer C. Clustering of nicotinic acetylcholine receptors: from the neuromuscular junction to interneuronal synapses. *Molecular neurobiology*. 2002;25(1):79-112. doi:10.1385/MN:25:1:079
- Benarroch EE. Nitric oxide: a pleiotropic signal in the nervous system. *Neurology*. 2011;77(16):1568-1576. doi:10.1212/WNL.0b013e318233b3e4
- Yakovleva O, Shafigullin M, Sitdikova G. The role of nitric oxide in the regulation of neurotransmitter release and processes of exo-and endocytosis of synaptic vesicles in mouse motor nerve endings. *Neurochemical journal*. 2013;7(2):103-110. doi:10.1134/S1819712413020104
- Moncada S, Higgs E. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *The FASEB journal*. 1995;9(13):1319-1330. doi:10.1096/fasebj.9.13.7557022

10. Stamler JS, Meissner G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiological reviews*. 2001;81(1):209-237. doi:10.1152/physrev.2001.81.1.209
11. Kramarcy NR, Sealock R. Syntrophin isoforms at the neuromuscular junction: developmental time course and differential localization. *Molecular and cellular neuroscience*. 2000;15(3):262-274. doi:10.1006/mcne.1999.0823
12. Richmonds CR, Boonyapisit K, Kusner LL, Kaminski HJ. Nitric oxide synthase in aging rat skeletal muscle. *Mechanisms of ageing and development*. 1999;109(3):177-189. doi:10.1016/S0047-6374(99)00035-4
13. Song W, Kwak HB, Kim JH, Lawler JM. 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. doi:10.1093/gerona/glp021
14. Kohli R, Meininger CJ, Haynes TE, Yan W, Self JT, Wu G. Dietary L-arginine supplementation enhances endothelial nitric oxide synthesis in streptozotocin-induced diabetic rats. *The journal of nutrition*. 2004;134(3):600-608. doi:10.1093/jn/134.3.600
15. Nelson ME, Rejeski WJ, Blair SN, Duncan PW, Judge JO, King AC, et al. Physical activity and public health in older adults: recommendation from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Medicine and science in sports and exercise*. 2007;39(8):1435. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.185650
16. Salehpour M, Nourshahi M, khodaghohi F, Rajabi H. Effect of eight weeks endurance training and nNOS inhibition on skeletal muscle nicotinic acetylcholine receptor levels in old rats. *exercise and sport physiology*. 2015;26(7):81-96.[persian]
17. Godfrey EW, Schwarte RC. The role of nitric oxide signaling in the formation of the neuromuscular junction. *Journal of neurocytology*. 2003;32(5):591-602. doi:10.1023/B:NEUR.0000020612.87729.98
18. Huh K-H, Fuhrer C. Clustering of nicotinic acetylcholine receptors: from the neuromuscular junction to interneuronal synapses. *Molecular neurobiology*. 2002;25(1):79-112. doi:10.1385/MN:25:1:079
19. Wu H, Xiong WC, Mei L. To build a synapse: signaling pathways in neuromuscular junction assembly. *Development*. 2010;137(7):1017-1033. doi:10.1242/dev.038711
20. salehpour M, Nourshahi M, Khodaghohi F, Rajabi H. Effect of eight weeks endurance training and nNOS inhibition on skeletal muscle agrin levels in old rats. *exercise and sport physiology*. 2015;7(1):997-1004.[persian]
21. Bütikofer L, Zurlinden A, Bolliger MF, Kunz B, Sonderegger P. Destabilization of the neuromuscular junction by proteolytic cleavage of agrin results in precocious sarcopenia. *The FASEB journal*. 2011;25(12):4378-4393. doi:10.1096/fj.11-191262
22. Bolliger MF, Zurlinden A, Lüscher D, Bütikofer L, Shakhova O, Francolini M, et al. Specific proteolytic cleavage of agrin regulates maturation of the neuromuscular junction. *Journal of cell science*. 2010;123(22):3944-3955. doi:10.1242/jcs.072090
23. Drey M, Sieber C, Bauer J, Uter W, Dahinden P, Fariello R, et al. C-terminal Agrin Fragment as a potential marker for sarcopenia caused by degeneration of the neuromuscular junction. *Experimental gerontology*. 2013;48(1):76-80. doi:10.1016/j.exger.2012.05.021
24. Fragala MS, Jajtner AR, Beyer KS, Townsend JR, Emerson NS, Scanlon TC, et al. Biomarkers of muscle quality: N-terminal propeptide of type III procollagen and C-terminal agrin fragment responses to resistance exercise training in older adults. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*. 2014;5(2):139-148. doi:10.1007/s13539-013-0120-z
25. Rudolf R, Khan MM, Labeit S, Deschenes MR. Degeneration of neuromuscular junction in age and dystrophy. *Frontiers in aging neuroscience*. 2014;6:1-11. doi:10.3389/fnagi.2014.00099
26. Smith LW, Smith JD, Criswell DS. Involvement of nitric oxide synthase in skeletal muscle adaptation to chronic overload. *Journal of applied physiology*. 2002;92(5):2005-2011. doi:10.1152/jappphysiol.00950.2001
27. Naito H, Powers SK, Demirel HA, Aoki J. Exercise training increases heat shock protein in skeletal muscles of old rats. *Medicine and science in sports and exercise*. 2001;33(5):729-734. doi:10.1097/00005768-200105000-00008
28. Thwe PM, Amiel E. The role of nitric oxide in metabolic regulation of dendritic cell immune function. *Cancer letters*. 2018;412:236-242. doi:10.1016/j.canlet.2017.10.032
29. Sarkar S, Korolchuk VI, Renna M, Imarisio S, Fleming A, Williams A, et al. Complex inhibitory effects of nitric oxide on autophagy. *Molecular cell*. 2011;43(1):19-32. doi:10.1016/j.molcel.2011.04.029
30. Bauchart-Thevret C, Cui L, Wu G, Burrin DG. Arginine-induced stimulation of protein synthesis and survival in IPEC-J2 cells is mediated by mTOR but not nitric oxide. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2010;299(6):E899-E909. doi:10.1152/ajpendo.00068.2010

The effect of a period of aerobic exercise with inhibition of nitric oxide on the fast and slow twitch muscle fibers neurotrypsin levels in elderly male rats

Mojtaba Salehpour^{1✉}, Javad Nemati², Rasoul Rezaei²

Abstract

Background: One of the causes of neuromuscular junction (NMJ) disruption in old age is neurotrophin. The aim of this study was to investigate the effect of aerobic exercise with nitric oxide (NO) inhibition on neurotrypsin levels of soleus and extensor digitorum longus (EDL) muscles in elderly rats.

Materials and methods: old Wistar male rats (n=36, 20 months old) were randomly divided into six groups: 1) control, 2) control-25 (with NO inhibition using L-NAME at a daily dose of 25mg/Kg), 3) control-100, 4) exercise-25, 5) exercise-100, and 6) exercise. The training groups were exercised progressively on a treadmill for eight weeks, five days a week for 60 minutes at a speed of 28 m/min. The soleus and EDL muscles were removed 48 hours after the last session of exercise training.

Results: In both muscles, a significant decrease in neurotrophin was observed in the control-25 and control-100 compared to the control group, in the exercise group compared to the control group, in the exercise-25 compared to the control-25, and in the exercise-100 compared to the control-100.

Conclusion: In summary, the aerobic exercise reduces neurotrophin levels, even with inhibition of nNOS. Therefore, aerobic exercise with a decrease in neurotrophin and possibly a compensatory effect on increasing NO production in old age can play a role in maintain NMJ and delaying sarcopenia due to destabilization of the NMJ.

Keywords: Aerobic Exercise, Nitric Oxide, Aging, Rat

1. Assistant professor, Department of sport and exercise physiology, Faculty of sport sciences, Shahid Rajaei Teacher Training University, Tehran, Iran (✉Corresponding author) salehpour57@gmail.com

2. Assistant professor, Department of sport sciences, Faculty of educational sciences and psychology, Shiraz University, Shiraz, Iran