تأثیر هشت هفته تمرین استقامتی و مهار nNOS بر میزان پروتئین اگرین در عضله اسکلتی موش‌های صحرایی مسن

مجتبی صالح‌پور[۱]✉، مریم نورشاهی[۲]، فریبا خداقلی[۳]، حمید رجبی[۴]

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزش دانشگاه شهید بهشتی
۲. دانشیار گروه فیزیولوژی ورزش دانشگاه شهید بهشتی
۳. دانشیار مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۴. دانشیار گروه فیزیولوژی ورزش دانشگاه خوارزمی

تاریخ دریافت مقاله:۹۳/۹/۰۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۹۳/۹/۱۸

چکیده

هدف:ساختار و عملکرد پیوندگاه عصب ـ عضله طی سالمندی تغییرات عمده‌ای از جمله کاهش فعالیت نیتریک اکساید سنتاز نورونی (nNOS) می‌یابد که در نهایت سبب تضعیف عملکرد جسمانی و بروز سارکوپنیا می‌گردد.هدف از انجام این پژوهش تعیین تأثیر هشت هفته تمرین استقامتی همراه با مهار nNOS بر میزان پروتئین اگرین بود. **روش‌شناسی پژوهش**: تولید نیتریک اکساید (NO) بوسیله دو دوز 25^{-1} $mg^{-1}.kg^{-1}.day$ و $100N^{G}$ نیترو- L– آرژنین متیل استر (L-NAME) (مهار کننده nNOS)، مهار شد. چهل و هشت سر موش نر نژاد ویستار مسن (۲۰ماهه) به صورت تصادفی به شش گروه کنترل، LNAME25,100، گروه‌های تمرین همراه با LNAME (Training+LNAME25,100) و گروه تمرین استقامتی (Training) تقسیم شدند. سه روز قبل از اجرای پروتکل مصرف LNAME شروع و تا زمان تشریح حیوانات این کار ادامه داشت. 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 دویدند. ۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرین، پس از بی‌هوش کردن حیوانات، عضله نعلی و عضله بازکننده دراز انگشتان (EDL) برداشته شد. **یافته‌ها**: بررسی وسترن بلاتینگ نشان داد که میزان پروتئین اگرین عضله نعلی و EDL نیز در گروه‌های Training+LNAME25, 100 و گروه تمرین استقامتی به طور معناداری بیشتر از گروه کنترل بود (P<۰/۰۵)و مصرف LNAME با دوز ۱۰۰ سبب کاهش اگرین شد(P<۰/۰۵). **نتیجه‌گیری**: با توجه به یافته‌های پژوهش حاضر کاهش فعالیت nNOSسبب کاهش میزان پروتئین اگرین شده و تمرین استقامتی نه تنها سبب افزایش میزان اگرین می‌شود، بلکه می‌تواند محرکی برای افزایش میزان این پروتئین طی دوران سالمندی باشد. نتایج این پژوهش نشان داد که تمرین استقامتی می‌تواند سبب افزایش میزان اگرین حتی در موش‌هایی که LNAME دریافت می‌کردند شود. به طور کلی، تمرین استقامتی می‌تواند روش مناسبی برای کاهش سارکوپنیا در افراد سالمند باشد.

کلید واژه‌ها: تمرین استقامتی، پیوندگاه عصب – عضله، اگرین، سالمندی، نیتریک اکساید

Effect of Eight Weeks Endurance Training and nNOS Inhibition on Skeletal Muscle Agrin levels in Old Rats

Abstract

Purpose: The structure and function of neuromuscular junction (NMJ) changes significantly such as decrease nNOS activity during aging and results in decrease of physical performance and sarcopenia. The purpose of this study was to determine the effect of eight weeks of endurance training and neuronal nitric oxide synthase (nNOS) inhibition on skeletal muscle agrin levels in old rats. **Methodology:** Endogenous NO production was blocked by two administering NG-nitro-L- arginine methyl ester (LNAME) dosages (25 and 100 $mg^{-1}.kg^{-1}.day^{-1}$) solved in drinking water. Forty eight old male Wistar rats (20 months) were randomly divided into six groups: Control, LNAME25, LNAME100, endurance training with LNAME25, endurance training with LNAME100 and training. LNAME treatment began three days before exercise protocol and continued until the last day. Endurance training groups were exercised on treadmill for 8 weeks, 5 times a week and 60 minutes a day at velocity up to 28 m/min progressively. Forty eight hours after last session of exercise training, animals were anesthetized and soleus and Extensor digitorum longus (EDL) were removed. **Results:** Western Blotting analysis revealed that Soleus and EDL muscles agrin content in Training+ LNAME 25,100 and Training groups were significantly higher than control group (P<0.05) and LNAME 100 $mg^{-1}.kg^{-1}.day^{-1}$ treatment significantly decreased agrin content in these muscles (P<0.05). **Conclusion:** It seems that decrease in nNOS activity during aging, could be responsible for decrease in agrin level and NMJ weakness. Our data suggested that daily endurance training could increase agrin level even in rats which received LNAME. In general, daily training could be a suitable route to reduce sarcopenia in aged population.

Keywords: Endurance training, Neuromuscular Junction, agrin, aging, nitric oxide

✉ **نویسنده مسئول:** مجتبی صالح‌پور شماره تماس:۰۹۳۸۱۸۱۸۱۵۷

آدرس: تهران، ولنجک، دانشگاه شهید بهشتی دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی گروه فیزیولوژی ورزش

پست الکترونیکی:salehpour57@gmail.com

مقدمه

طی سالمندی تغییرات ساختاری و فیزیولوژیکی زیادی رخ می‌دهد (۱, ۲). مهم‌ترین و بارزترین تغییری که در دورهٔ سالمندی مشاهده می‌شود پدیده‌ای به نام سارکوپنیا[1] است. یکی از عوامل مهمی که طی سالمندی سبب بروز سارکوپنیا می‌گردد تحلیل ناحیهٔ NMJ می‌باشد (۳).. NMJ سیناپس شیمیایی است که دارای بخش‌های پیش‌سیناپسی، فضای‌سیناپسی و پس‌سیناپسی می‌باشد. بخش پیش‌سیناپسی یا پایانهٔ عصب حرکتی، مسئول سنتز، ذخیره و آزادسازی استیل‌کولین و اگرین است. بخش فضای سیناپسی، غشای پایهٔ سیناپسی را دربرگرفته و اتصال بین غشاهای سیناپسی را برعهده دارد. بخش پس‌سیناپسی غشای عضلانی بوده و دارای چگالی بالایی از گیرنده‌های استیل‌کولینی و مولکول‌های دیگریست که برای تثبیت و حفظ NMJ اهمیت دارند (۴). در غشای تار عضلانی در NMJ طیف وسیعی از پروتئین‌ها از جمله دیستروگلیکان‌ها وجود دارند، اما احتمالاً مهم‌ترین آنها گیرنده‌های استیل کولینی[2] (AchR) می‌باشند. (۵). مطالعات اخیر نشان می‌دهند که پروتئین‌های مختلفی در تشکیل و تثبیت AchR ها و دستگاه NMJ نقش دارند(۶) عواملی که تحت عنوان رونویسی خاص سیناپسی بر روی تشکیل AchR تأثیر دارند شامل نروگلین[3]، ARIA[4]، CGRP[5] (پپتید مرتبط با ژن کلسی تونین)، آگرین و نیتریک‌اکساید می‌باشد (۶). مطالعات نشان می‌دهند که اگرین[6] یکی از عوامل مهمی است که در بیان و دسته‌بندی nAchR در جایگاه اتصال عصبی ـ عضلانی نقش محوری داشته و شرط لازم و کافی برای ایجاد تمایز پس‌سیناپسی NMJ است (۷). این پروتئوگلیکان بوسیلهٔ نرون 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. بدین ترتیب موجب تجمع اگرین در غشای پایه می‌شود (۶, ۸). در تأیید نقش اگرین، کمبود اگرین در موش‌ها سبب نقص در تمایز NMJ، AchR و عدم تظاهر پروتئین‌های پس‌سیناپسی دیگر شد. اگرین برای تشکیل و تجمع پس‌سیناپسی nAchR پیامش را در قسمت خارج غشایی از طریق تیروزین کیناز ویژه عضله (Musk) اعمال می‌کند (۷). همچنین شواهد اخیر حاصل از مطالعات کشت سلول عضلانی و مطالعات انجام شده در دوران جنینی حاکی از آن است که نیتریک‌اکساید (NO) یک اثرکننده تمایز پس‌سیناپسی ناشی از اگرین در NMJ بوده و در تجمع AchR ناشی از اگرین نقش دارد (۶, ۷). NO بوسیلهٔ آنزیم نیتریک‌اکسایدسنتاز (NOS) از تبدیل ال- آرژنین به ال سیترولین تولید می‌شود (۹).

NOSها دارای سه ایزوفرم NOS نرونی یا nNOS[7]، NOS اندوتلیالی یا eNOS[8] و NOS القایی یا iNOD[9] است(۱۰). nNOSمهم‌ترین ایزوفرم است که در عضلات اسکلتی و قلبی همهٔ‌پستانداران بیان شده و در NMJ نیز تجمع می‌یابد (۱۱) و در قسمت پس‌سیناپسی NMJ بیشتر است (۱۰, ۱۲). طی سالیان گذشته محققان نقش‌های زیادی را برای NO شناسایی کردند و این اکتشاف همچنان ادامه دارد. به عنوان مثال NO در مسیر سیگنالی سلول، جلوگیری از ایسکمی، مرگ برنامه‌ریزی شدهٔ سلول و تنظیم تون عروقی (۱۳) و در عضلهٔ اسکلتی، در هم‌جوشی میوبلاست (۱۴)، اضافه شدن سارکومرها (۱۵)، تنظیم انقباض عضلانی (۱۶)، تنفس میتوکندریایی و انتقال سیناپسی نقش دارد (۱۷). نتایج پژوهش‌ها نشان می‌دهند که بیان هر یک از ایزوفرم‌های NOS بسته به نوع تار عضلانی متفاوت است، به‌طوری‌که nNOS در تارهای عضلانی گلیکولیتیکی بیشتر از تارهای اکسایشی است (۱۸-۲۰). بیان nNOS در عضلات موش‌های صحرایی بعد از تمرین درازمدت و فعالیت کوتاه مدت شدید، افزایش یافت (۲۱, ۲۲). همچنین بیان nNOS بوسیلهٔ آسیب برخوردی و فعالیت عضلانی نیز افزایش می‌یابد(۲۳). ازسوی‌دیگر، سالمندی سبب افزایش نسبت iNOS به nNOS می‌گردد که نشان‌دهندهٔ انتقال نقش انقباضی به سمت نقش التهابی می‌باشد(۲۴). برخی از محققان نشان دادند که فعالیت nNOSعضلهٔ نعلی و بازکنندهٔ دراز انگشتان(EDL) رت‌ها طی دوران سالمندی کاهش می‌یابد(۲۵). در این رابطه سانگ و همکاران (۲۰۰۹) گزارش دادند که بیان پروتئین nNOS همراه با افزایش سن کاهش می‌یابد، اما تمرین استقامتی به طور معناداری سبب افزایش بیان پروتئین nNOS در عضلهٔ تند انقباض (بخش سفید عضلهٔ دوقلو) و کند انقباض (نعلی) موش‌های صحرایی شد (۲۴). با توجه مطالب ارائه شده می‌توان گفت که NO نقش مهمی در تجمع AchR ناشی از اگرین ایفا می‌کند. بنابراین پدیدهٔ سالمندی و فعالیت‌عضلانی می‌توانند عوامل تأثیرگذار بر اگرین، فعالیت nNOS و

هم‌چنین NMJ باشد که باید بیشتر مورد توجه قرار بگیرد.

به‌طورکلی،با توجه به شواهد موجود، اطلاعاتی در زمینه تأثیر فعالیت‌بدنی بر اگرین وNO به عنوان یک مسیر سیگنالی درگیر در حفظ و تثبیت AchR و همچنین تغییرات آن طی سالمندی و تأثیرش بر NMJ طی دوران سالمندی وجود ندارد. بنابراین، با توجه به اهمیت انجام تمرینات استقامتی برای افراد سالمند به لحاظ سلامت قلبی‌عروقی، متابولیسم گلوکز و ترکیب بدن (۲۶)، اثرات سودمند تمرین استقامتی در سازگاری‌های NMJ از جمله افزایش گیرنده‌های استیل‌کولینی و فعالیت nNOS و هم‌چنین اهمیت اگرین و NO در تشکیل، حفظ و تثبیت گیرنده‌های استیل‌کولینی، پژوهشگر به دنبال پاسخ به این سوال بود که آیا هشت هفته تمرین استقامتی و مهار nNOSمی‌تواند میزان پروتئین اگرین عضلهٔ موش‌های صحرایی نر مسن را تغییر دهد.

روش‌شناسی

آزمودنی‌ها

چهل و هشت سر موش‌های نر مسن (۲۰ ماهه) (انحراف معیار±میانگین وزنی ۱۲/۷±۳۵۷/۹ گرم) نژاد ویستار آزمودنی‌های این تحقیق بودند که از انستیتو پاستور خریداری شدند. موش‌ها در گروه‌های دو تایی و در محیطی با میانگین دمای ۱/۴ ± ۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۴ ±۵۵٪ و چرخه روشنایی-تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت در قفس‌های مخصوص از جنس پلی کربنات نگهداری شدند. تمامی حیوانات به آب و غذای ویژهٔ موش دسترسی آزاد داشتند. غذای آزمودنی‌های این پژوهش، تولید شرکت خوراک دام پارس بود. در تمام مراحل پژوهش، آب مورد نیاز حیوان به صورت آزاد در اختیار آن‌ها قرار داده شد. آزمودنی‌ها پس از سه روز آشنایی با محیط آزمایشگاه به طور تصادفی به گروه‌های هشت سری کنترل، گروه‌های LNAME 25,100، گروه‌های تمرین استقامتی همراه با LNAME (Training+LNAME25، Training+LNAME100) و گروه تمرین استقامتی (Training) تقسیم شدند.

مهارnNOS

سه روز قبل از شروع آزمایش برای مهار nNOSروزانه از N^G نیترو- L – آرژنین متیل استر (L-NAME) (Sigma N5751) به صورت محلول با آب آشامیدنی در دو دوز ۲۵ (معادل ۰/۱۸۷ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) و ۱۰۰ (معادل ۰/۷۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) میلی‌گرم به ازای هر کیلو گرم از وزن موش‌ها خورانده شد (شواهد نشان دادند که این دوز تا ۹۸ درصد سبب مهار LNAME) () و این کار تا زمان کشتار حیوانات ادامه داشت(۲۷) .

پروتکل تمرین

موش‌ها در گروه تجربی به مدت ۸ هفته، هر هفته ۵ روز روی نوارگردان مخصوص حیوانات (ساخت شرکت تکنیک آزما) تمرین می‌کردند. کل دوره تمرین به سه مرحلهٔ آشنایی، اضافه بار و حفظ یا تثبیت بار کار تقسیم شد. در مرحلهٔ آشنایی(هفته اول)، موش‌ها هر روز به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه روی نوار گردان ویژه جوندگان راه می‌رفتند. در مرحلهٔ اضافه بار (هفتهٔ 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 مرحلهٔ حفظ یا تثبیت، هفتهٔ پنجم تا هشتم موش‌ها به مدت ۴هفته با شدت تعیین شدهٔ ۲۸ متر بر دقیقه، معادل ۷۵-۸۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی و به مدت ۶۰ دقیقه روی نوارگردان دویدند، که در تمامی مراحل فوق شیب نوارگردان صفر درجه بود(۲۸).ضمناً از مجموع زمان فعالیت، ۵ دقیقه برای گرم کردن، و ۵ دقیقه برای سرد کردن موش‌ها با سرعت ۷ متر بر دقیقه در نظر گرفته شد.لازم به ذکر است که ۲ سر از موش‌های گروه Training+LNAME25 و ۳ سر از موش‌های گروه Training+LNAME100 و همچنین ۲ سر از موش‌های گروه LNAME100 حین انجام پروتکل تلف شدند.

بافت برداری

به منظور از بین بردن اثر حاد آخرین جلسه تمرین استقامتی، چهل و هشت ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی، نمونه‌گیری انجام شد. موش‌ها با تزریق درون صفاقی ترکیبی از کتامین[10] (۳۰-۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن) و زایلزین[11] (۳-۵ میلی‌گرم/ کیلوگرم وزن بدن) بی‌هوش و به منظور بافت برداری از محفظه خارج و به روی میز جراحی انتقال داده شدند. با توجه به نقش متفاوت دو عضله نعلی و EDL میزان درگیری این دو عضله در تمرین

استقامتی، عضله EDL و عضله نعلی برای اندازه گیری میزان پروتئین اگرین به روش وسترن بلات (Anti-Agrin شرکت abcam) برداشته شدند.

وسترن بلات

برای انجام آزمون وسترن بلات مقادیر مساوی از پروتئین توسط ژل پلی آکریل آمید SDS-PAGE ۱۲٪ جداسازی شد. بعد از مرحله الکتروفورز، پروتئین های ژل به کاغذ PVDF منتقل شده و کاغذ در محلول بلاکینگ برای ۱ ساعت قرار گرفت. سپس کاغذ یک شب در آنتی بادی اولیه (Anti-Agrin شرکت abcam) در ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد و در روز دوم ۳ بار با محلول TBST شستشو داده شد و کاغذ با آنتی بادی 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 آنتی بادی بتااکتین را به روی کاغذ گذاشته و دوباره با آنتی بادی ثانویه انکوبه شدند و بتااکتین کنترل نیز در فیلم رادیولوژی ظاهر شد. توسط برنامه Image J باندهای بدست آمده دانسیتومتری شدند.

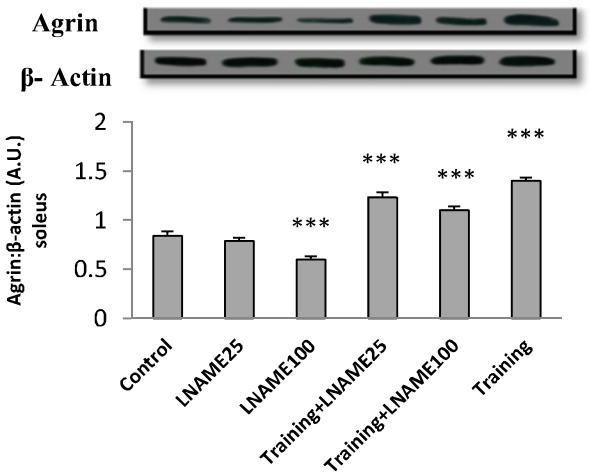
تجزیه و تحلیل آماری

برای مقایسه تغییرات گروه‌های مختلف از آزمون تحلیل واریانس یک سویه استفاده شد. در صورت مشاهده تفاوت معنادار بین گروه‌های مختلف، برای یافتن محل تفاوت‌ها به آزمون تعقیبی توکی مراجعه شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS 18 استفاده شد. سطح معنی‌داری برای تمام تحلیل های آماری $P< 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌های تحقیق

میانگین و انحراف معیار تغییرات وزن موش‌های صحرایی در گروه‌های مختلف در جدول ۱ نشان داده شده است.

نتایج آزمون آماری تحلیل واریانس یک سویه نشان داد که تغییرات میزان پروتئین اگرین در عضله نعلی گروه های مختلف معنادار بود ($P<۰/۰۰۰۵$) و $F(۵،۱۷) = 185.25$). نتایج آزمون توکی نشان داد که بین گروه کنترل با LNAME100 ($P<۰/۰۰۰۵$)، گروه تمرین استقامتی همراه با LNAME 25 ($P<۰/۰۰۰۵$)، گروه تمرین استقامتی همراه با LNAME 100 ($P<۰/۰۰۰۵$) و گروه تمرین استقامتی ($P<۰/۰۰۰۵$) تفاوت معنادار وجود دارد، اما بین میزان پروتئین اگرین گروه کنترل با گروه LNAME 25تفاوت معناداری وجود ندارد ($P=۰/۶۵۴$). همچنین مشاهده شد که تغییرات بین LNAME25 و LNAME100 با سه گروه تمرینی معنادار است ($P<۰/۰۰۰۵$). تفاوت بین گروه تمرین استقامتی و گروه‌های تمرین استقامتی همراه با LNAME25 ($P=۰/۰۰۲$) و LNAME100 ($P<۰/۰۰۰۵$) نیز معنادار بود (نمودار۱).



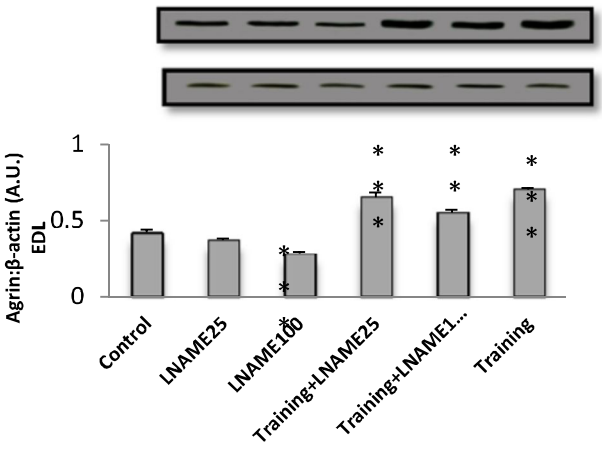
نمودار۱. میانگین‌ها و انحراف معیار پروتئین اگرین در عضله نعلی گروه‌ها. علامت *** نشان دهنده تفاوت معنادار گروه‌ها با گروه کنترل است.

جدول ۱. میانگین ± انحراف معیار وزن (گرم) گروه‌های مختلف تمرینی

گروه زمان	Control	LNAME25mg/kg	LNAME100mg/kg	Training+ LNAME25mg/kg	Training+ LNAME100mg/kg	Training
هفته اول	۳۵۶/۷±۲۷/۱	۳۴۸/۲±۱۸/۹	۳۶۶±۳۰/۳	۳۳۹/۶±۱۴/۴	۳۶۱/۴±۳۵	۳۷۵/۳±۲۶/۵
هفته هشتم	۳۷۸/۵±۲۸/۱	۳۴۰/۷±۳۰/۵	۳۵۶/۸±۱۸/۶	۳۲۹/۸±۱۲/۶	۳۳۹/۲±۳۳/۳*	۳۶۳/۶±۲۵/۴*

علامت * نشان دهنده معنادار بودن تفاوت گروه‌ها با گروه کنترل است.

نتایج بدست آمده از آزمون آماری تحلیل واریانس یک سویه برای تغییرات میزان پروتئین اگرین در عضله EDL نشان داد که تفاوت مشاهده شده بین گروه های مختلف معنادار بود (P<۰/۰۰۰۵) و F(۵،۱۷) =۱۷۶/۵۲). همچنین نتایج آزمون توکی نشان داد که بین میزان پروتئین اگرین گروه کنترل با گروه LNAME 25تفاوت معناداری وجود ندارد (P=۰/۱۲۹) ولی بین گروه کنترل با LNAME100 (P<۰/۰۰۰۵)، گروه تمرین استقامتی همراه با LNAME 25 (P<۰/۰۰۰۵)، گروه تمرین استقامتی همراه با LNAME 100 (P<۰/۰۰۰۵) و گروه تمرین استقامتی (P<۰/۰۰۰۵) تفاوت معنادار وجود دارد. همچنین مشاهده شد که تغییرات بین LNAME25 و LNAME100 با سه گروه تمرینی معنادار است (P<۰/۰۰۰۵) و تفاوت بین گروه تمرین استقامتی با گروه تمرین استقامتی همراه با LNAME100 (نیز معنادار بود (P<۰/۰۰۰۵) با این وجود تفاوت بین گروه تمرین استقامتی و گروه‌های تمرین استقامتی همراه با LNAME25 معنادار نبود(P=۰/۱۱۷) (نمودار۲).



نمودار۲. میانگین‌ها و انحراف معیار پروتئین اگرین در عضله EDL گروه‌ها. علامت ***نشان دهنده تفاوت معنادار گروه‌ها با گروه کنترل است

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش‌های گذشته مبنی بر این است که اگرین شرط لازم و کافی برای تشکیل و تثبیت nAchR است که این کار را ازطریق مسیرهای سیگنالی متفاوت نظیر تیروزین کیناز ویژه عضله (Musk)، کمپلکس دیستروگلیکان و نروگلین – ۱ (NRG-1) انجام می‌دهد که البته تاثیر تمرین ورزشی بر این پروتئین و مسیرهای سیگنالی آن تا کنون ناشناخته باقی‌مانده است(۲۹).

براساس نتایج این پژوهش هشت هفته تمرین استقامتی سبب افزایش میزان پروتئین اگرین در عضله نعلی و EDL شد. پژوهش‌های قبلی نشان دادند که اگرین از پایانه عصبی نورون‌های حرکتی آزاد شده و در غشای پایه سیناپسی تجمع می‌یابد و مستقیماً سبب تشکیل NMJ می‌شود (۳۰). از سوی دیگر بزاکاوا و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که تزریق اگرین سبب افزایش بیان و اثر بخشی اگرین در عضله نعلی قطع عصب شده می‌گردد و تجمع nAchR را با نیمه عمر طولانی‌تری در این عضله افزایش می‌دهد. آنها همچنین اذعان داشتند که اگرین به روش وابسته به انقباض و فعالیت عضلانی سبب افزایش ثبات nAchR می‌گردد و در زمان انقباض‌های شدید اگرین به تنهایی قادر به افزایش سطح nAchR در NMJ شود (۳۰). در پژوهش‌های قبلی نشان داده شد که میزان پروتئین nAchR پس از هشت هفته تمرین استقامتی افزایش می‌یابد(۳۱) . بنابراین، این شدت از تمرین احتمالاً محرک خوبی برای آزادسازی اگرین از نورون‌های حرکتی است که سبب افزایش میزان این پروتئین در غشای پایه شده و احتمالاً دلیل افزایش nAchR پس از انجام فعالیت ورزشی نیز باشد. دری و همکاران (۲۰۱۲) نیز گزارش دادند که انجام فعالیت قدرتی و مصرف ویتامین D سبب کاهش یکی از عوامل ازهمپاشی NMJ در دوران سالمندی به نام نروتریپسن می‌گردد. در واقع نروتریپسین سبب آزاد کردن پایانهٔ C– اگرین (CAF) می‌گردد و از این طریق اگرین را مهار می‌کند(۳۲). هتور[۱۲] و همکاران (۲۰۱۳) نیز گزارش دادند غلظت CAF جریان خون افراد سالمند مبتلا به سارکوپنیا افزایش می‌یابد (۳۳). بنابراین، با توجه به اینکه آزمودنی‌های این پژوهش موش‌های صحرایی مسن بودند، یکی دیگر از دلایل افزایش اگرین پس از هشت هفته تمرین استقامتی احتمالاً کاهش نروتریپسین و کاهش CAFباشد که نیاز به انجام مطالعات بیشتری در این زمینه دارد.

نتایج این پژوهش نشان داد که مهار nNOS با دوز ۱۰۰ سبب کاهش میزان اگرین در دو عضله نعلی و EDL موش‌های مسن شد. در زمینه تاثیر مهار nNOS بر میزان پروتئین اگرین پژوهشی انجام نشده است، با توجه به کاهش میزان اگرین طی مهار nNOS در پژوهش حاضر به نظر می‌رسد کاهش میزان Noبازخورد منفی بر اگرین خواهد داشت، اما سازوکار این تأثیر مشخص نیست و نیاز

به انجام پژوهش‌های بیشتر در این زمینه می‌باشد. از سوی دیگر نتایج پژوهش حاضر نشان داد که هشت هفته تمرین استقامتی همراه مهار nNOS با مقادیر ۱۰۰و ۲۵ سبب افزایش میزان پروتئین اگرین در عضله نعلی و EDL موش‌های صحرایی مسن شد. نتایج پژوهش‌های گذشته نشان می‌دهد که بعد از تمرین ورزشی (۳۴) یا تحریک الکتریکی (۳۵)، NOS در عضلهٔ اسکلتی دارای یک تنظیم افزایشی بوده و بیان و فعالیت NOS رابطهٔ مستقیمی با الگوی اعمال بار دارد، به طوری‌که حذف بار سبب تنظیم کاهشی و اعمال بار مجدد نیز سبب طبیعی شدن بیان NOS می‌گردد. شواهد موجود حاکی از آن است که فعالیت ورزشی سبب افزایش کوفاکتورهای لازم برای فعالیت NOS نظیر FAD (فلاوین آدنین دی نوکلئوتید) - FMN (فلاوین منو نوکلئوتید) - آهن پروتروفین ۹ (هم) - تترا هیدرو پورین – کالمودولین می‌گردد (۳۶)، به طوری‌که افزایش این کوفاکتورها، فعالیت NOS را افزایش داده و احتمالا تمرین ورزشی مهار NO را از این طریق جبران کرده است. از آنجایی که مسیر دیگر تولید NO در داخل بدن از پروکسید نیترات (NO/O2) است(۱۰)، احتمال دارد هنگام تمرین استقامتی جبران مهار NO از این طریق نیز انجام شده باشد. عامل مهم دیگری که با انجام فعالیت ورزشی بیان و فعالیت nNOS را افزایش می‌دهد Ca^{2+} است، محققان نشان دادند که فعالیت eNOS و nNOS وابسته به کلسیم-کالمودولین است و این ایزوفرم‌ها در سطوح کلسیمی پایهٔ سیتوپلاسم فعالیت آنزیمی کمی دارند(۳۷).به نظر می‌رسد تمرین استقامتی از طریق جبران NO اثر منفی مهار nNOS بر میزان پروتئین اگرین را از بین خواهد برد. با توجه به اینکه فعالیت ورزشی تاثیر جبرانی در مهار nNOS دارد و با توجه به اینکه میزان اگرین پس از هشت هفته تمرین استقامتی و مهار nNOS افزایش یافت، دو فرضیه برای سازوکار تاثیر nNOS بر میزان اگرین مطرح می‌شود. فرضیه اول اینکه احتمالاً مهار nNOS آزادسازی اگرین را در سطح نورون حرکتی (محل آزادسازی اگرین) تحت تاثیر قرار می‌دهد و سبب کاهش میزان اگرین می‌گردد. از سوی دیگر در سنین سالمندی میزان نوتریپسین افزایش می‌یابد که از طریق آزادسازی CAF سبب مهار اگرین می‌گردد. البته برای تایید این فرضیه‌ها نیاز به انجام پژوهش‌های بیشتری می‌باشد.

به طور کلی،هشت هفته تمرین استقامتی سبب افزایش میزان پروتئین اگرین می‌گردد. با توجه به این‌که اگرین شرط لازم و کافی برای دسته‌بندی و تجمع nAchR است، بنابراین افزایش میزان اگرین و فعال شدن مسیر سیگنالی آن پس از هشت هفته تمرین استقامتی می‌تواند سازوکار اصلی افزایش nAchR در NMJ پس از تمرین باشد. همچنین در پژوهش حاضر نشان داده شد که مهار nNOS سبب کاهش میزان اگرین می‌شود که سازوکار آن مشخص نیست. بنابراین کاهش nNOS طی سالمندی می‌تواند تاثیر منفی بر میزان اگرین داشته باشد و احتمالاً یکی از دلایل تحلیل NMJ طی دوران سالمندی کاهش میزان اگرین ناشی از کاهش nNOS باشد. البته همانطور که در این پژوهش نشان داده شد تمرین استقامتی حتی در شرایط مهار nNOS سبب افزایش اگرین می‌گردد. بنابراین انجام تمرین استقامتی از طریق افزایش میزان اگرین و NO طی دوران سالمندی می‌تواند در تجمع nAchR و استحکام NMJ و احتمالاً به تعویق افتادن سارکوپنیای ناشی از تحلیل NMJ نقش داشته باشد. با توجه به اهمیت اگرین در NMJ و با توجه به اینکه یکی از دلایل بروز سارکوپنیا در دوران سالمندی تحلیل NMJ است و همانطور که در این پژوهش نشان داده شد که تمرین استقامتی سبب افزایش اگرین می‌گردد، پیشنهاد می‌شود افراد سالمند برای حفظ و نوسازی NMJ طی دوران سالمندی از پروتکل‌های تمرین استقامتی بهره‌مند شوند.همچنین با توجه به اهمیت نقش اگرین و مسیر سیگنالی nNOS در استحکام NMJ پیشنهاد می‌شود پژوهش بعدی به مقایسه تأثیر پروتکل‌های تمرینی مختلف بر میزان اگرین و nNOS بین افراد جوان و سالمند بپردازند.

پی‌نوشت‌ها

1. Sarcopenia
2. Acetylcholine receptor
3. Neuregulin
4. Acetycholine receptor inducing activity
5. Calcitonin Gene-related peptide
6. Agrin
7. Neuronal nitric oxide synthase
8. Endothelial nitric oxide synthase
9. Inducible nitric oxide synthase
10. Ketamine
11. Xylazine
12. Hettwer

منابع

1. Gallegly JC, Turesky NA, Strotman BA, Gurley CM, Peterson CA, Dupont-Versteegden EE.(2004). Satellite cell regulation of muscle mass is altered at old age. Journal of Applied Physiology.;97(3):1082-90.
2. Narici MV, Maffulli N.(2010). Sarcopenia: characteristics, mechanisms and functional significance. British medical bulletin.;95(1):139-59.
3. Gonzalez-Freire M, de Cabo R, Studenski SA, Ferrucci L.(2014). The neuromuscular junction: aging at the crossroad between nerves and muscle. Frontiers in aging neuroscience.;6.
4. Punga AR, Ruegg MA. (2012).Signaling and aging at the neuromuscular synapse: lessons learnt from neuromuscular diseases. Current Opinion in Pharmacology.
5. Hoch W.(2001). Formation of the neuromuscular junction. European Journal of Biochemistry.;265(1):1-10.
6. Huh KH, Fuhrer C.(2002). Clustering of nicotinic acetylcholine receptors: from the neuromuscular junction to interneuronal synapses. Molecular neurobiology.;25(1):79-112.
7. Godfrey EW, Schwarte RC.(2003). The role of nitric oxide signaling in the formation of the neuromuscular junction. Journal of neurocytology.;32(5):591-602.
8. Wu H, Xiong WC, Mei L.(2010).To build a synapse: signaling pathways in neuromuscular junction assembly. Development.;137(7):1017-33.
9. Moncada S, Higgs E.(1995).Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. The FASEB journal.;9(13):1319-30.
10. Stamler JS, Meissner G.(2001).Physiology of nitric oxide in skeletal muscle.Physiological reviews.;81(1):209-37.
11. Chaubourt E, Voisin V, Fossier P, Baux G, Israël M, De La Porte S.(2002). Muscular nitric oxide synthase (muNOS) and utrophin. Journal of Physiology-Paris.;96(1):43-52.
12. Kramarcy NR, Sealock R.(2000).Syntrophin isoforms at the neuromuscular junction: developmental time course and differential localization. Molecular and Cellular Neuroscience.;15(3):262-74.
13. Pilgram GSK, Potikanond S, Baines RA, Fradkin LG, Noordermeer JN.(2010). The roles of the dystrophin-associated glycoprotein complex at the synapse. Molecular neurobiology.;41(1):1-21.
14. Lee KH, Baek MY, Moon KY, Song WK, Chung CH, Ha DB, et al.(1994).Nitric oxide as a messenger molecule for myoblast fusion. Journal of Biological Chemistry.;269(20):14371-4.
15. Koh TJ, Tidball JG.(1999). Nitric oxide synthase inhibitors reduce sarcomere addition in rat skeletal muscle. The Journal of physiology.;519(1):189-96.
16. Kobzik L, Reid MB, Bredt DS, Stamler JS.(1994). Nitric oxide in skeletal muscle. Nature.; 372(6506):546-8.
17. Wadley GD, McConell GK.(2007). Effect of nitric oxide synthase inhibition on mitochondrial biogenesis in rat skeletal muscle. Journal of Applied Physiology.;102(1):314-20.
18. Hussain SNA, El-Dwairi Q, Abdul-Hussain MN, Sakkal D.(1997).Expression of nitric oxide synthase isoforms in normal ventilatory and limb muscles. Journal of Applied Physiology.;83(2):348-53.
19. Kobzik L, Stringer B, Balligand JL, Reid MB, Stamler JS.(1995). Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships. Biochemical and biophysical research communications.;211(2):375.
20. Lau Kims, Grange RW, Isotani E, Sarelius IH, Kamm KE, Huang PL, et al.(2000). nNOS and eNOS modulate cGMP formation and vascular response in contracting fast-twitch skeletal muscle. Physiological genomics.;2(1):21-7.
21. McConell GK, Bradley SJ, Stephens TJ, Canny BJ, Kingwell BA, Lee-Young RS.(2007). Skeletal muscle nNOSμ protein content is increased by exercise training in humans. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.;293(2):R821-R8.
22. Vassilakopoulos T, Deckman G, Kebbewar M, Rallis G, Harfouche R, Hussain SNA.(2003). Regulation of nitric oxide production in limb and ventilatory muscles during chronic exercise training. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology.;284(3):L452-L7.
23. Rubinstein I, Abassi Z, Coleman R, Milman F, Winaver J, Better OS.(1998). Involvement of nitric oxide system in experimental muscle crush injury. Journal of Clinical Investigation.;101(6):1325.
24. Song W, Kwak HB, Kim JH, Lawler JM.(2009). 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.;64(5):540.
25. Richmonds CR, Boonyapisit K, Kusner LL, Kaminski HJ.(1999). Nitric oxide synthase in aging rat skeletal muscle. Mechanisms of ageing and development.;109(3):177-89.

26. Nelson ME, Rejeski WJ, Blair SN, Duncan PW, Judge JO, King AC, et al.(2007). 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.;39(8):1435.
27. Smith LW, Smith JD, Criswell DS.(2002). Involvement of nitric oxide synthase in skeletal muscle adaptation to chronic overload. Journal of Applied Physiology.;92(5):2005-11.
28. Naito H, Powers SK, Demirel HA, Aoki J.(2001). Exercise training increases heat shock protein in skeletal muscles of old rats. Medicine and science in sports and exercise.;33(5):729.
29. Huh K-H, Fuhrer C.(2002). Clustering of nicotinic acetylcholine receptors: from the neuromuscular junction to interneuronal synapses. Molecular neurobiology.;25(1):79-112.
30. Bezakova G, Ruegg MA.(2003). New insights into the roles of agrin. Nature Reviews Molecular Cell Biology.;4(4):295-309.
31. Gorgin Karaji Z, Parnoo A, Gharakhanlou R, Rajabi S.(2013). The Effect of Endurance Training on amount of Nicotinic Acetylcholine Receptors (nAChR) in Fast and Slow Twitch Muscle of Male Wistar Rats. Journal of Kermanshah University of Medical Sciences.;16(7):518-24.
32. Drey M, Sieber C, Bauer J, Uter W, Dahinden P, Fariello R, et al.(2012). C-terminal Agrin Fragment as a marker for sarcopenia caused by degeneration of the neuromuscular junction. Experimental gerontology.
33. Fragala MS, Jajtner AR, Beyer KS, Townsend JR, Emerson NS, Scanlon TC, et al.(2013). 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.:1-10.
34. Balon TW, Nadler JL.(1997). Evidence that nitric oxide increases glucose transport in skeletal muscle. Journal of Applied Physiology.;82(1):359-63.
35. Reiser PJ, Kline WO, Vaghy PL.(1997). Induction of neuronal type nitric oxide synthase in skeletal muscle by chronic electrical stimulation in vivo. Journal of Applied Physiology.;82(4):1250-5.
36. Akimitsu T, Gute DC, Korthuis RJ.(1995). Leukocyte adhesion induced by inhibition of nitric oxide production in skeletal muscle. Journal of Applied Physiology.;78(5):1725-32.
37. Nathan C, Xie QW.(1994). Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. Cell.;78(6):915.