

## تأثیر یک دوره مکمل‌دهی ال آرژینین بر پاسخ گیرنده نیکوتینی استیل کولین عضله اسکلتی موش‌های صحرائی نر سالمند به فعالیت حاد و امانده‌ساز

مریم نورشاهی<sup>۱</sup>، رسول رضایی<sup>۲</sup>، سجاد آقاجان<sup>۳</sup>، مجتبی صالح‌پور<sup>۴</sup>، فریا خداقلی<sup>۵</sup>

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 علوم پزشکی شهیدبهشتی

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۳/۰۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۲۵

### چکیده

هدف از انجام این پژوهش، بررسی تأثیر یک دوره مکمل‌دهی ال آرژینین بر پاسخ گیرنده نیکوتینی استیل کولین بافت عضلات اندام عقبی موش‌های صحرائی سالمند به فعالیت حاد و امانده‌ساز بود. بدین منظور، ۳۲ سر موش نر نژاد ویستار (۲۲ ماهه،  $380 \pm 20$  گرم) آزمودنی‌های این پژوهش را تشکیل دادند و به‌طور تصادفی به چهار گروه مکمل ال آرژینین همراه با فعالیت استقامتی و امانده‌ساز بلافاصله، مکمل ال آرژینین بلافاصله، ورزش و کنترل تقسیم شدند. قابل ذکر است که موش‌های گروه مکمل به مدت دو هفته، آب حاوی ۲/۵ درصد ال آرژینین را مصرف نمودند. در روز فعالیت ورزشی، رت‌های گروه ورزش در شرایط فعالیت و امانده‌ساز با سرعت ۳۰ متر در دقیقه و شیب پنج درجه، معادل ۷۵-۸۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی فعالیت کردند. سپس، حیوانات بلافاصله و چهار ساعت بعد از فعالیت استقامتی و امانده‌ساز بی‌هوش شدند و نمونه‌گیری از بافت عضله بازکننده دراز انگشتان پا و نعلی صورت گرفت. جهت بررسی داده‌ها نیز از تحلیل واریانس یک‌سویه استفاده گردید. نتایج نشان می‌دهد که میزان پروتئین گیرنده نیکوتینی استیل کولین عضله نعلی و بازکننده دراز انگشتان در گروه‌های ال آرژینین بلافاصله، به‌طور معناداری بیشتر از گروه کنترل می‌باشد ( $P < 0.001$ ). میزان پروتئین گیرنده نیکوتینی استیل کولین عضله نعلی و بازکننده دراز انگشتان نیز در گروه‌های فعالیت و امانده‌ساز چهار ساعت بعد و گروه ال آرژینین به همراه فعالیت و امانده‌ساز چهار ساعت بعد، به‌طور معناداری بیشتر از گروه کنترل است ( $P < 0.001$ ). به نظر می‌رسد مکمل‌دهی ال آرژینین به همراه فعالیت استقامتی می‌تواند روش مناسبی برای کاهش سارکوپنیا با اثرگذاری بر میزان پروتئین گیرنده نیکوتینی استیل کولین در افراد سالمند باشد.

**واژگان کلیدی:** گیرنده نیکوتینی استیل کولین، ال آرژینین، فعالیت حاد و امانده‌ساز

**مقدمه**

براساس گزارش مرکز آمار ایران، سالمندان پنج درصد از کل جمعیت ایران را تشکیل می‌دهند که این رقم در سال‌های آینده، رشد قابل توجهی خواهد داشت (۱). مهم‌ترین و بارزترین تغییر در این دوره، پدیده‌ای به نام سارکوپنیا<sup>۱</sup> می‌باشد. سارکوپنیا با ازدست‌دادن تدریجی توده و قدرت عضلانی (۲) و کاهش سلول‌های ماهواره‌ای (۳)، میزان متابولیسم (۴) و حداکثر اکسیژن مصرفی<sup>۲</sup> (VO<sub>2max</sub>) همراه می‌باشد (۵-۷). عوامل زیادی سبب بروز سارکوپنیا می‌گردد که عبارت هستند از: کاهش فعالیت بدنی (۵)، تغییر سطوح هورمونی (۸) و عوامل عصبی (۹). پژوهش‌ها در زمینه 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). در این میان، یکی از تغییرات مهمی که در دوران سالمندی رخ می‌دهد، تغییر ساختاری و عملکردی جایگاه اتصال عصبی عضله<sup>۳</sup> (NMJ) می‌باشد؛ به طوری که 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 انتقال‌دهنده پیام عصبی در غشای پس‌سیناپسی است؛ به همین دلیل، این گیرنده‌ها می‌بایست در قسمت مقابل منطقه آزاد شدن ناقلین از پایانه عصبی با چگالی بالا وجود داشته باشند. مطالعات اخیر نشان می‌دهند که پروتئین‌های مختلفی در تشکیل و تثبیت گیرنده استیل کولین<sup>۴</sup> (AChR) و NMJ نقش دارند (۱۳) که شامل: نروگلین<sup>۵</sup>، عامل فعال ساز گیرنده استیل کولین<sup>۶</sup> (ARIA)، پپتید مرتبط با ژن کلسی تونین<sup>۷</sup> (CGRP)، آگرین و نیتریک اکساید<sup>۸</sup> (NO) می‌باشد (۱۳، ۱۴).

به نظر می‌رسد NO در تنظیم آزادسازی ناقلین عصبی پیش‌سیناپسی و تثبیت غشای پس‌سیناپسی NMJ نقش دارد. عضله اسکلتی هر سه شکل نیتریک اکساید سنتتاز<sup>۹</sup> 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<sup>۱</sup> nNOS غالب تر است) را بیان می کند، اما میزان nNOS در قسمت پس سیناپسی NMJ بیشتر می باشد (۱۵،۱۶). از سوی دیگر، به نظر می رسد فعالیت NOS، احتمالاً مداخله گر مهمی در مسیرهای سیگنالی کلسیم در عضله اسکلتی باشد (۱۷). در این میان، سالمندی سبب افزایش نسبت نیتریک اکساید سنتتاز القایی<sup>۲</sup> iNOS به nNOS می گردد که نشان دهنده انتقال نقش انقباضی به سمت نقش التهابی می باشد (۱۸). پژوهشگران نشان داده اند که فعالیت nNOS عضله نعلی و بازکننده دراز انگشتان<sup>۳</sup> (EDL) موش های صحرایی طی دوران سالمندی کاهش یافته است (۱۹) و تمرین استقامتی به طور معناداری سبب افزایش بیان پروتئین nNOS در عضله تندانقباض (بخش سفید عضله دوقلو) و کندانقباض (نعلی) موش های صحرایی شده است (۱۸). در هر حال، محصول nNOS جهت شرکت در فرایندهای فیزیولوژیکی بدن، NO می باشد. NO از دو مسیر وابسته به NOS و غیروابسته به NOS سنتز می شود (۲۰،۲۱)؛ به گونه ای که مسیر وابسته به NOS، نیازمند اکسیژن (۲۰) و مسیر نیترات - نیتريت - NO تحت شرایط هایپوکسی مسیر غالب می باشد (۲۲). در مسیر وابسته به NOS، آمینو اسید ال آرژنین، پیش ساز اصلی NO است. ال آرژنین در حضور اکسیژن و نیکوتین امید آدنین نوکلئوتید دی فسفات<sup>۴</sup> NADPH در مجموعه ای از واکنش های ردوکس توسط NOS به ال سیتروولین<sup>۵</sup> و NO تبدیل می شود؛ از این رو، به نظر می رسد مقادیر ال آرژنین بر سطوح NO تولیدی نقش داشته باشد (۲۳).

پژوهش های انجام گرفته در ارتباط با مکمل دهی ال آرژنین بر فعالیت NO نتایج متفاوتی را نشان داده اند. ریپلا کولی<sup>۶</sup> و همکاران (۲۰۰۴) با دو هفته مکمل دهی ال آرژنین، افزایش معناداری را در مقادیر نیتریک اکسید، تنها در گروه ال آرژنین مشاهده کردند (۲۴). با توجه به امکان اثر مثبت مکمل ال آرژنین بر فعالیت NO از یک سو و تأثیر ورزش استقامتی بر nNOS در دوره سالمندی به عنوان یکی از عوامل مؤثر بر nAChR از سوی دیگر، این پرسش مطرح می گردد که آیا مکمل دهی ال آرژنین با اثر بر مقادیر NO می تواند اثر تعدیل کننده ورزش بر nAChR طی دوره سالمندی را افزایش دهد؟ از این رو، پژوهش حاضر در نظر دارد با پاسخ به این سؤال که آیا مکمل دهی ال آرژنین به همراه یک جلسه فعالیت ورزشی می تواند 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. Rippla Kohli

ورزش به همراه مکمل ال آرژینین بر nAChR در موش‌های صحرایی نر سالمند نژاد ویستار را مورد بررسی قرار داده است.

### روش پژوهش

در این پژوهش ۳۲ سر موش صحرایی نر ویستار ۲۲ ماهه به عنوان نمونه پژوهش از مؤسسه انستیتو رازی خریداری شدند و در شرایط دمایی  $22 \pm 1/4$  درجه سانتی‌گراد، رطوبت  $55 \pm 4$  درصد و چرخه روشنایی - تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت نگهداری گردیدند و به وسیله آب و غذای مخصوص رت تغذیه شدند. تمام حیوانات به منظور آشناسازی با نوارگردان، به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت هشت تا ۱۲ متر بر دقیقه، به مدت سه روز ورزش کردند. پس از گذشت یک هفته (سازگاری با محیط آزمایشگاه)، موش‌های صحرایی به طور تصادفی به چهار گروه مکمل ال آرژینین و ورزش (EX+L, n=8)، گروه مکمل ال آرژینین بدون ورزش (L, n=8)، گروه ورزش بدون مکمل ال آرژینین (EX, n=8) و گروه کنترل (Cont, n=8) تقسیم شدند. تمام گروه‌های مصرف‌کننده مکمل نیز آب حاوی ۲/۵ درصد مکمل ال آرژینین را به مدت ۱۴ روز دریافت نمودند (۲۴). شایان ذکر 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 (۲۷-۲۵)، پس از انجام فعالیت شدید و امانده‌ساز تشریح شدند و حیوانات گروه (L) و (Cont) نیز در زمان یکسان از روز با گروه‌های تمرینی تشریح گردیدند.

پس از این که تمام حیوانات به منظور آشناسازی با تردمیل به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ۱۲-۸ متر بر دقیقه به مدت سه روز ورزش کردند، در روز فعالیت ورزشی، حیوانات گروه ورزش در شرایط فعالیت و امانده‌ساز با سرعت ۳۰ متر در دقیقه و شیب پنج درجه، معادل ۷۵-۸۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی قرار گرفتند (۳۰-۲۸). شایان ذکر است که و امانده‌گی زمانی محسوب می‌شد که وقتی حیوانات به پشت خوابانده می‌شدند، قادر به برگشت به وضعیت اولیه نبودند (۳۱، ۳۲).

مکمل دهی: با توجه به این که میانگین جذب در آب حاوی ال آرژینین، ۲/۲۴ گرم در هر کیلوگرم از وزن بدن در هر روز می‌باشد، به منظور مکمل دهی ال آرژینین، آب حاوی ۲/۵ درصد ال آرژینین (سیگما ساخت کشور آمریکا<sup>۱</sup>) 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 درون صفاقی ترکیبی از کتامین<sup>۱</sup> (۵۰-۳۰ میلی گرم/ کیلوگرم وزن بدن) و زایلزین<sup>۲</sup> (سه تا پنج میلی گرم/ کیلوگرم وزن بدن) بی هوش شدند و به منظور بافت برداری از محفظه خارج گشتند و به روی میز جراحی انتقال داده شدند. با توجه به نقش متفاوت دو عضله نعلی و EDL، میزان درگیری این دو عضله در فعالیت حاد و امانده ساز، عضله EDL و عضله نعلی، برای اندازه گیری میزان پروتئین nAChR، مقدار ۷۰ کیلو دالتون از آن به روش وسترن بلات<sup>۳</sup> (آنتی بادی ساخت شرکت ابکم<sup>۴</sup>) برداشته شد.

برای تهیه و آماده سازی بافت ابتدا، عضلات جهت استخراج غشای سلولی با روش هاون کوبی پودر گردیدند. سپس، برای به دست آوردن عصاره سلولی، نمونه های پودر شده عضله توسط بافر هموژن لیز شدند. همچنین، به منظور هموژن کردن بافت، به اندازه چهار الی پنج برابر وزن نمونه ها، بافر لیزکننده ریخته شد و با هموژنایزر تامی<sup>۵</sup> مدل میکرو اسمش<sup>۶</sup> با ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت سه زمان دو دقیقه ای با فاصله زمانی پنج دقیقه بین دفعات برای جلوگیری از گرم شدن و دناتوره شدن پروتئین، هموژن گشت. سپس، بافت هموژن شده به مدت ۱۰ دقیقه در دمای مثبت چهار درجه سانتی گراد 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<sup>۷</sup> 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 آکرل آمید ژل<sup>۸</sup> ۱۲ درصد جداسازی شد. بعد از مرحله الکتروفورز، پروتئین های ژل به کاغذ پلی وینیلیدین فلوراید<sup>۹</sup> منتقل شد و کاغذ به مدت یک ساعت در محلول بلاکینگ قرار گرفت. سپس، کاغذ یک شب در آنتی بادی اولیه (nAChR) در دمای چهار درجه سانتی گراد قرار داده شد و در روز دوم، سه مرتبه با محلول تی بی اس تی<sup>۱۰</sup> شستشو داده شد و کاغذ به مدت 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

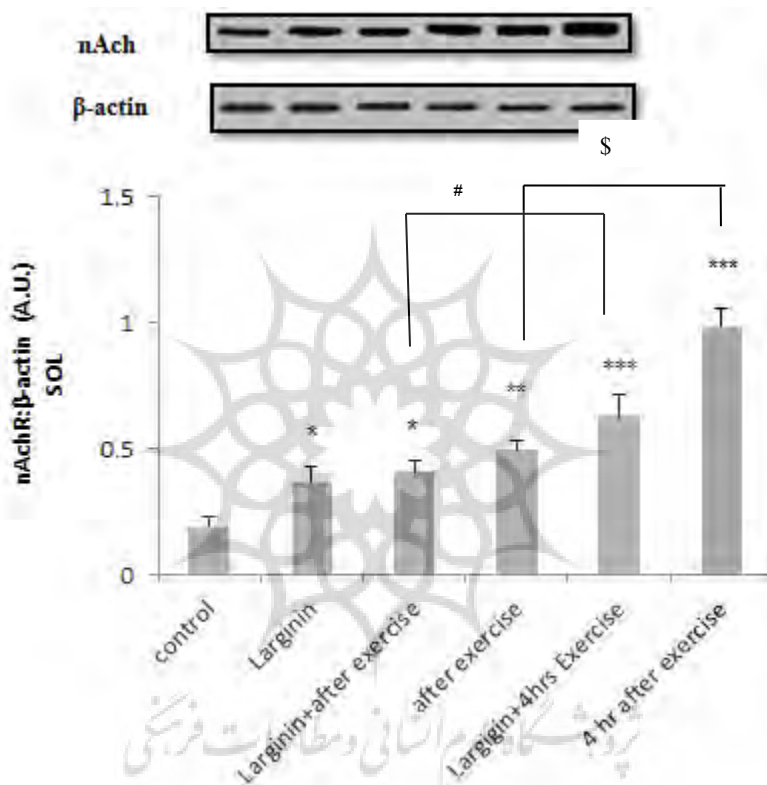
آنتی‌بادی ثانویه انکوبه گردید. پس از این مرحله، بلات‌ها با کیت نورتابی الکتروشیمیایی<sup>۱</sup> (ECL) پوشانده شدند و با استفاده از فیلم رادیولوژی ظاهر گشتند. سپس، بلات‌ها در بافر استریپینگ شستشو داده شدند و آنتی‌بادی بتا‌اکتین به روی کاغذ گذاشته شد و دوباره با آنتی‌بادی ثانویه انکوبه گردیدند و بتا‌اکتین کنترل نیز در فیلم رادیولوژی ظاهر گردید. شایان‌ذکر است که باندهای به‌دست‌آمده توسط برنامه تصویر جی‌آدنسیتومتری شدند.

طبیعی بودن داده‌ها به‌وسیله آزمون کولموگروف - 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 مورد استفاده 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 عضله 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 عضله 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. Electrogenated Chemiluminescence
  2. Image J

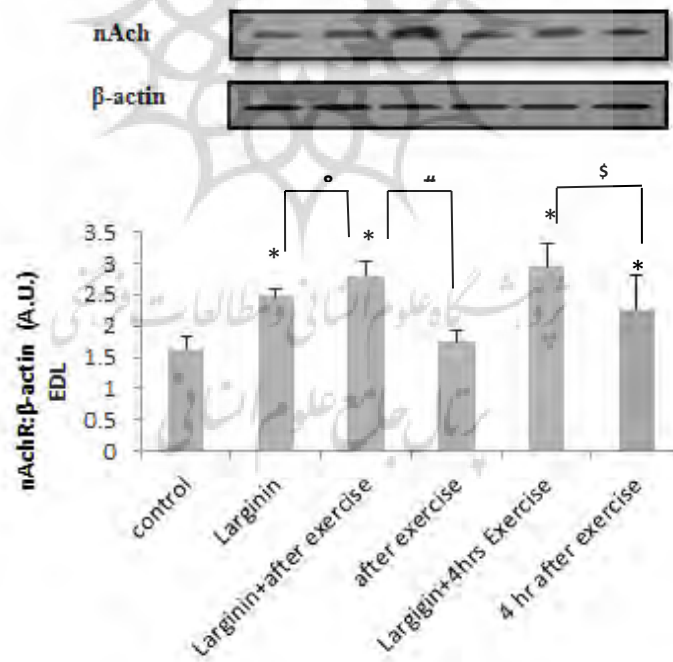


شکل ۱- میزان nAChR در عضله نعلی به تفکیک گروه‌ها

\*مقادیر به صورت میانگین ± انحراف استاندارد می‌باشد (n=6)

نتایج آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌سویه نشان می‌دهد که تغییرات میزان پروتئین nAChR در عضله 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 ال آرژنین، ورزش و ال آرژنین بلافاصله، ال آرژنین و ورزش چهار ساعت بعد و ورزش چهار ساعت بعد از ورزش در عضله 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 آل آرژینین و ورزش تفاوت معناداری به چشم می خورد ( $P < 0.001$ ) که نشان دهنده بیشتر بودن مقادیر nAchR در گروه آل آرژینین و ورزش نسبت به گروه ورزش می باشد. علاوه بر این، یافته ها بیانگر این است که مقادیر nAchR بین گروه آل آرژینین با گروه آل آرژینین و ورزش تفاوت معناداری وجود دارد ( $P < 0.001$ ) که نشان دهنده بیشتر بودن مقادیر nAchR در گروه آل آرژینین و ورزش نسبت به گروه آل آرژینین می باشد. در مقادیر nAchR نیز بین گروه ورزش و گروه آل آرژینین تفاوت معناداری مشاهده می شود ( $P < 0.001$ ) که بیانگر بیشتر بودن مقادیر nAchR در گروه آل آرژینین نسبت به گروه ورزش است. همچنین، مقادیر nAchR در گروه ورزش و آل آرژینین چهار ساعت بعد با گروه ورزش چهار ساعت بعد، تفاوت معناداری دارد ( $P < 0.001$ ) که حاکی از بالاتر بودن میزان nAchR در گروه ورزش و آل آرژینین چهار ساعت بعد در مقایسه با گروه ورزش چهار ساعت است.



\*

شکل ۲- میزان nAchR در عضله EDL به تفکیک گروه ها

\* مقادیر به صورت میانگین  $\pm$  انحراف می باشد (n=6)



## بحث و نتیجه گیری

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که استفاده از مکمل ال آرژینین 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 مکمل دهی ال آرژینین باعث افزایش معنا-داری در بیان نیتریک اکسید تنها در گروه ال آرژینین 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 مکمل دهی ال آرژینین از کاهش تولید NO در رت‌های سالمند جلوگیری کرده است. همچنین، یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد مقادیر nAChR بلافاصله بعد از ورزش نسبت به گروه کنترل در عضله سلئوس تفاوت معناداری داشته است. این امر می‌تواند بیانگر آن باشد که افت فعالیت NO طی دوران سالمندی، بیشتر در عضله تندانقباض صورت می‌گیرد؛ لذا، تغییرات nAChR در گروه ورزش نسبت به گروه کنترل در عضله سلئوس با افزایش همراه بوده است؛ درحالی‌که در عضله تندانقباض، مقادیر nAChR گروه ورزش بلافاصله، تفاوت معناداری با سطوح nAChR در گروه کنترل نداشته است. این امر نشان‌دهنده عدم اثر فعالیت بر مقادیر nAChR بلافاصله بعد از تمرین به‌دلیل افت فعالیت NO طی سالمندی در عضلات تندانقباض می‌باشد. در این رابطه نشان داده شده است که فعالیت nNOS عضله نعلی و بازکننده دراز انگشتان (EDL) رت‌ها طی دوران سالمندی کاهش می‌یابد (۱۹). از آنجایی که 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 عضله EDL، مقادیر پایین nNOS در این عضله باشد.

از سوی دیگر، یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که مقادیر nAChR در هر دو عضله سلئوس و EDL چهار ساعت بعد از فعالیت ورزشی وامانده‌ساز در هر دو گروه ورزش و ال آرژینین 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 ال آرژینین به‌همراه ورزش نسبت به گروه ورزش به‌تنهایی بیشتر بوده است؛ از این‌رو، شاید بتوان گفت که جلوگیری از کاهش مقادیر nAChR به‌وسیله مکمل دهی ال آرژینین باعث شده است که سطوح nAChR در گروه ال آرژینین و ورزش نسبت به گروه ورزش قبل از فعالیت وامانده‌ساز بالاتر باشد و در نتیجه، گروه

ال آرژینین و ورزش نسبت به گروه ورزش، به یک جلسه فعالیت وامانده ساز پاسخ بهتری داده و لذا، سازگاری‌های صورت گرفته در چهار ساعت پس از ورزش در گروه ال آرژینین و ورزش بیشتر باشد. همچنین، با توجه به بالاتر بودن مقادیر nNOS در عضلات تندانباض، این امکان وجود دارد که فعالیت به تنهایی 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.

از سوی دیگر، بین مقادیر nAChR در گروه ال آرژینین و ورزش بلافاصله و گروه ال آرژینین و ورزش چهار ساعت بعد و نیز بین مقادیر nAChR گروه ورزش بلافاصله و ورزش چهار ساعت در عضله EDL تفاوت معناداری مشاهده نشد. نتایج پژوهش‌ها نشان می‌دهند که بیان هریک از ایزوفرم‌های NOS با توجه به نوع تار عضلانی متفاوت می‌باشد؛ به طوری که nNOS در تارهای عضلانی گلیکولیتیک، بیشتر از تارهای اکسایشی است (۳۵،۳۴)؛ از این رو، به نظر می‌رسد مکمل‌دهی ال آرژینین و ورزش اگرچه نتوانسته 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. لازم به ذکر است که NO از دو مسیر اصلی وابسته به NOS و مسیر غیروابسته به NOS سنتز می‌شود. با این حال، تفاوتی اساسی بین این دو مسیر وجود دارد؛ بدین معنا که مسیر وابسته به NOS نیازمند اکسیژن است؛ در حالی که مسیر نیترات - نیتريت - NO، تحت شرایط هایپوکسی مسیر بهتری است. در مسیر وابسته به NOS، آمینو اسید ال آرژینین، پیش‌ساز اصلی NO است؛ در حالی که در مسیر غیروابسته به NOS، نیتريت و نیترات، پیش‌سازهای اصلی تولید NO هستند. با توجه به این که این پژوهش با شدت  $VO_{2MAX}$  ۷۰-۸۰ انجام شده است (۳۰)، احتمالاً شرایطی مانند شرایط هایپوکسی در بافت به وجود آورده باشد که می‌تواند مسیر غیروابسته به NOS را درگیر کرده باشد. لازم به ذکر است که مقادیر پایه نیتريت و نیترات در سن سالمندی کاهش می‌یابد (۲۲)؛ لذا، احتمالاً می‌توان دلیل عدم تغییر میزان nAChR در عضله EDL در گروه ورزش بلافاصله نسبت به گروه ورزش چهار ساعت بعد و گروه ال آرژینین و ورزش بلافاصله و گروه ورزش و ال آرژینین چهار ساعت را سطوح پایین تولید NO به دلیل کمبود پیش‌سازهای مسیر غیروابسته به NOS در شرایط هایپوکسی ذکر کرد. با توجه به موارد یاد شده به نظر می‌رسد ورزش و مکمل‌دهی ال آرژینین می‌تواند به عنوان عواملی مستقل بر مقادیر nAChR که در دوره سالمندی با کاهش روبه‌رو هستند اثرگذار باشد. با این حال، چگونگی

استفاده از مکمل ال آرژنین به همراه 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. علاوه بر این، به نظر می رسد مقدار پاسخ nAchR به ورزش و مکمل ال آرژنین در عضله تندانقباض و کندانقباض متفاوت باشد که دلیل این امر را می توان عواملی همچون سطوح پایه ای متفاوت NO و کاهش عملکرد NOS و دیگر پیش سازهای تولید NO در مسیر نیترات- نیتريت-NO دانست (۲۲)؛ از این رو، به نظر می رسد جهت اثبات اثرگذاری ورزش به همراه مکمل ال آرژنین بر مقادیر در هر دو عضله سلئوس و EDL، نیاز به مطالعات بیشتر با اندازه گیری مسیرهای درگیر در تولید NO و عوامل درگیر در تولید و تثبیت nAchR شامل: نروگلین، ARIA، CGRP (پپتید مرتبط با ژن کلسی تونین)، آگرن و نیتريك اكساید (NO) باشد (۱۴).

به طور کلی، پژوهش حاضر به عنوان اولین پژوهش صورت گرفته در این زمینه نشان داد که ورزش و مکمل دهی ال آرژنین به صورت مجزا و استفاده هم زمان می تواند عاملی مثبت در مقادیر nAchR باشد که طی روند سالمندی با کاهش روبه رو می شود؛ از این رو، همان طور که در این پژوهش نشان داده شد، فعالیت استقامتی به همراه مصرف ال آرژنین سبب افزایش nAchR می گردد. پیشنهاد می شود در پژوهش های آتی که در حوزه سالمندی و فعالیت بدنی صورت می گیرد، استفاده از مکمل ال آرژنین به عنوان عاملی اثرگذار بر nAchR نیز مورد توجه قرار گیرد تا اثرات ال آرژنین به عنوان یک مکمل به همراه ورزش جهت استفاده سالمندان با اطلاعات بیشتر و دقیق تر مورد بررسی قرار گیرد.

**پیام مقاله:** به نظر می رسد که مکمل دهی ال آرژنین به همراه فعالیت استقامتی می تواند روش مناسبی برای کاهش سارکوپنیا با اثرگذاری بر میزان پروتئین گیرنده 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<sup>+</sup>-activated K<sup>+</sup> 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 مکمل دهی ال آرژنین بر پاسخ گیرنده نیکوتینی استیل کولین عضله اسکلتی موش های صحرائی نر سالمند به فعالیت حاد وامانده ساز. فیزیولوژی ورزشی. بهار ۱۳۹۶؛ ۹(۳۳): ۸۶-۱۷۳. شناسه دیجیتال: 10.22089/spj.2017.946

Nourshahi. M, Rezaei. R, Aghajan, S. Salehpor. M. Khodaghali, 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<sup>1</sup>, R. Rezaei<sup>2</sup>, S. Aghajan<sup>3</sup>, M. Salehpor<sup>4</sup>,  
F. Khodagholi<sup>5</sup>

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 Rajaei 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 VO<sub>2</sub>max. 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