

## اثر ۸ هفته تمرین مقاومتی فزاینده بر میزان پروتئین آگرین در عضلات اسکلتی موش های سالمند و ایستار

دکتر حسن قدیمی ایلخانلار<sup>۱</sup>، دکتر مریم نورشاهی<sup>۲</sup>، دکتر فریبا خداقلی<sup>۳</sup>، دکتر رضا قراخانلو<sup>۴</sup>

### چکیده

**زمینه و هدف:** گیرنده پروتئینی آگرین یکی از عوامل بسیار مهم در شکل گیری، بلوغ و ثبات اتصال عصبی-عضلانی (NMJ) است. معمولاً تخریب آگرین به ویژه در افراد سالمند باعث عدم ثبات و تخریب پذیری NMJ و به دنبال آن بروز سارکوپنیا در افراد سالمند می-شود. هدف از این تحقیق، بررسی تأثیر هشت هفته تمرین مقاومتی بر میزان پروتئین آگرین عضلات اسکلتی در موش های صحرایی نژاد ویستار سالمند بود.

**مواد و روش ها:** ۲۰ سرموش صحرایی نژاد ویستار مسن (۳۴ ماهه) پس از یک هفته آشناسازی با شرایط آزمایشگاهی به صورت تصادفی به دو گروه کنترل (n=۱۰) و گروه تمرین مقاومتی (n=۱۰) تقسیم شدند. پروتکل تمرینی گروه تمرین مقاومتی شامل بالا رفتن از نردبان با حمل وزنه هایی برابر با ۰،۷۵،۹۰ و ۱۰۰ درصد وزن بدن حیوانات به مدت ۸ هفته و سه جلسه در هفته بود. گروه کنترل در مجاورت گروه تجربی و در آزمایشگاه بدون اجرای هیچ گونه تمرینی نگهداری می شدند. حیوانات ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین با کتامین و زایلازین بیهوش شده و سپس تشریح شدند. عضله کند انقباض نعلی و تند انقباض باز کننده دراز انگشتان (EDL) جدا و در نیتروژن مایع منجمد و تا زمان آنالیز بافت ها در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. به منظور سنجش تغییرات پروتئین در بافت های عضلانی از روش وسترن بلات و برای تجزیه و تحلیل داده های آماری از آزمون t-مستقل استفاده شد.

**یافته ها:** تجزیه و تحلیل اطلاعات به دست آمده از تحقیق نشان داد که بین میزان پروتئین آگرین عضلات کند انقباض نعلی و گروه کنترل تفاوت معنی داری وجود داشت (p<۰/۰۰۱). همچنین یافته نشان داد که تفاوت میزان آگرین گروه کنترل و تمرین در عضله تند انقباض (EDL) معنی دار بود (p<۰/۰۰۱).

**بحث و نتیجه گیری:** از آنجایی که تخریب و کاهش میزان آگرین باعث تخریب NMJ و تخریب تار های عضلانی و بروز سارکوپنیا می شود، لذا با توجه به نتایج تحقیق حاضر احتمالاً تمرین مقاومتی می تواند نقش موثری در افزایش میزان آگرین و به دنبال آن در جلوگیری از تخریب NMJ و بروز سارکوپنیا داشته باشد.

**واژه های کلیدی:** گیرنده پروتئینی آگرین، سالمندی، سارکوپنیا، تمرین مقاومتی، موش های نر ویستار.

## مقدمه

دوره پیری انسان با کاهش پیشرونده توده عضلانی و همچنین کاهش عملکرد آن مشخص می‌شود (۱). این تغییرات حاصل از سن در عضلات به عنوان سارکوپنیا شناخته شده است (۲). از مشخصه‌های مهم سارکوپنیا، آن است که اندازه هر دو نوع تارعضلانی تند انقباضی کند انقباضی کاهش می‌یابد، ولی کاهش تارهای عضلانی تند انقباضی در مقایسه با تارهای نوع کند انقباضی در اثر افزایش سن شدیدتر است (۳). مطالعات اخیر نشان می‌دهند که در سارکوپنیا انحطاط نوروں‌های حرکتی و به دنبال آن قطع عصب حرکتی یکی از علل عمده از دست دادن توده عضلانی است که فیبرهای عضلانی چرخه‌ای از قطع عصب و عصب‌گیری مجدد را متحمل می‌شوند. در طی این چرخه، برخی از میوفیبریل‌ها به ویژه فیبرهای نوع تند انقباضی از بین می‌روند، و فیبرهایی عضلانی که توسط نوروں‌های حرکتی سریع (الیاف نوع II) عصب‌دهی می‌شدند توسط نوروں‌های حرکتی نوع آهسته (الیاف نوع I) مجدداً عصب‌دهی می‌شوند، این اتفاق منجر به افزایش تارهای عضلانی نوع کند انقباضی در کل آتروفی عضلانی می‌شود، که این تغییر در تارهای عضلانی از مشخصه مهم سارکوپنیا است (۳،۴،۵،۶). سارکوپنیا دارای علل متعدد بوده و عوامل عصبی و عضلانی زیادی در بروز آن نقش دارند. اگرچه تحقیقات زیادی در مورد سالمندی و سارکوپنیا انجام گرفته است ولی اکثر تحقیقات بر تغییرات عضلانی و به پیامد‌ها و عواقب ناشی از بروز سارکوپنیا در عضلات توجه داشته‌اند و تحقیقات بسیار اندکی عوامل مختلف ایجادکننده سارکوپنیا را مورد بررسی قرار داده‌اند و به ویژه نقش عوامل عصبی دخیل در بروز سارکوپنیا بسیار کمتر مورد مطالعه و تحقیق واقع شده است. از عوامل عصبی بسیار مهم بروز این عارضه، انحطاط موتونورون‌ها و تخریب ساختار و عملکرد اتصال عصبی-عضلانی (NMJ) می‌باشد (۵). NMJ به لحاظ ساختار مولکولی دارای ساختار بسیار پیچیده بوده و پروتئین‌ها و گیرنده‌های پروتئینی متعددی در شکل‌گیری، ثبات، بلوغ آن نقش دارند. یکی از گیرنده‌های پروتئینی بسیار کلیدی که در شکل‌گیری، ثبات و بلوغ NMJ نقش بسیار اساسی داشته و تخریب آن باعث تخریب NMJ می‌شود، گیرنده پروتئینی آگرین است (۷،۸،۹). آگرین به لحاظ ساختار مولکولی دارای بیش از ۲۰۰۰ اسیدهای آمینه با جرم مولکولی ۲۲۵ کیلو دالتون است که مهمترین نقش عملکردی مشخص شده آن توسعه، بلوغ، محافظت و ثبات NMJ است (۱۰). آگرین به شدت در سیستم عصبی مرکزی و محیطی در حال رشد و در طول دوره شکل‌گیری سیناپس‌های میان می‌شود و جنین‌های دارای نقص آگرین نوعی عدم اتصالاتی بین ساختارهای پیش‌سیناپسی و پس‌سیناپسی را نشان داده و دارای انتقال سیناپسی معیوب هستند و در موش‌هایی که دارای نقص و کمبود پروتئین آگرین هستند، اتصال عصبی عضلانی تشکیل نمی‌شود (۷). آگرین به عنوان یک پروتوگلیکان خارج سلولی توسط موتونورون‌ها ساخته شده و به NMJ آزاد می‌شود و باعث خوشه‌بندی و تجمع گیرنده‌های استیل‌کولینی نیکوئینی (AChRs) می‌شود (۸،۹). گیرنده پروتئینی آگرین این نقش بسیار مهم خود را از طریق مسیر سیگنالی آگرین-Rapsin-LRP-Musk انجام می‌دهد که در کل علاوه بر شکل‌گیری، ثبات و بلوغ NMJ، موجب خوشه‌بندی و تراکم گیرنده‌های استیل‌کولینی (AChRs) در قسمت پایین دستی مسیر سیگنالی خود می‌شود (۱۱) بنابراین علاوه بر نقش آگرین در شکل‌گیری و بلوغ NMJ و خوشه‌بندی گیرنده‌های استیل‌کولینی (AChRs) یکی دیگر از مهمترین نقش‌های آگرین حفظ ثبات، پایداری و یکپارچگی NMJ است (۱۲،۱۳).

معلوم شده است که در دوره سالمندی NMJ تخریب شده و باعث بروز سارکوپنیا و تخریب و آتروفی عضلات می گردد و برخی از تحقیقات اعلام کردند که تخریب NMJ در اثر تخریب موتونورون ها و گیرنده پروتئینی آگرین اتفاق می افتد (۷،۸،۹). در این رابطه درای و همکاران<sup>۱</sup> (۲۰۱۳) اعلام کردند که بین تخریب موتونورون ها و به دنبال آن تخریب گیرنده پروتئینی آگرین ارتباط وجود دارد (۱۰). بولینگر و همکاران<sup>۲</sup> (۲۰۱۱) ، بوتیکوفر و همکاران<sup>۳</sup> (۲۰۱۲) استفان هاتورز و همکاران<sup>۴</sup> (۲۰۱۳) هر کدام در تحقیق جداگانه اعلام کردند که تخریب آگرین موجب تخریب NMJ و بروز سارکوپنیا می شود (۷،۸،۱۴).

کانگ و همکاران هم در مقایسه موتونورون های موش های جوان ۱۱-۱۳ ماهه با موش های سالمند ۳۶-۳۷ ماهه اعلام کردند که موش های پیرتر به طور معنی داری دارای موتونورون های کمتر در مقایسه با موش های جوان در عضله، سطح مقطع عرضی عضلانی کوچکتر و نیروی عضلانی کمتر هستند (۵). بنابراین با توجه به نتیجه دست آمده از تحقیقات گوناگون تخریب آگرین و به دنبال آن تخریب NMJ یکی از علل بسیار مهم بروز سارکوپنیا در دوره سالمندی و پیری است.

از طرف دیگر نقش ورزش در جلوگیری از تغییرات موتونورون ها که سازنده آگرین هستند و فعال سازی NMJ و محافظت از آن به ویژه در افراد سالمند و بروز سارکوپنیا مکررا به اثبات رسیده است به عنوان مثال در این رابطه تحقیقات نشان داده اند که تمرین ورزشی مزمن و فعالیت عصبی عضلانی شدید تغییرات موتونورون ها را خنثی کرده و شروع قطع عصب و سارکوپنیا در سالمندان را به تاخیر می اندازد (۲۹،۴۲). همچنین در رابطه با اثر تمرین ورزشی بر آگرین درای و همکاران اثر تمرین توانی و مقاومتی را همراه با مکمل ویتامین D را در مورد تخریب گیرنده پروتئینی آگرین (قطعه C- ترمینال آگرین) و تخریب NMJs و بروز سارکوپنیا را در ۴۷ زن سالمند بی تحرک مورد مطالعه قرار دادند ، نتایج یافته های آنان نشان داد که مکمل ویتامین D و فعالیت بدنی مقاومتی و توانی به طور معنی داری با کاهش تخریب آگرین و NMJ در ارتباط بوده است (۹). ولی استانکو و همکاران<sup>۵</sup> نشان دادند که تحریک الکتریکی مزمن اثر چندانی بر گیرنده پروتئینی آگرین ندارد (۱۵).

در این رابطه استفان هاتورز و همکاران در تحقیقی در ارتباط با تزریق آگرین عصبی (NT-1654) به موش هایی که در معرض بیان بالای نوروترپسین دچار سارکوپنیا شده بودند دریافتند که تزریق آگرین به این موش ها باعث ثبات NMJ و معکوس شدن روند سارکوپنیا و همچنین عصب دهی مجدد عضلات آسیب دیده در موش های دچار سارکوپنیا می شود (۱۶). همچنین در این رابطه فراگالا و همکاران<sup>۶</sup> (۲۰۱۳) در تحقیق بر کیفیت عضلات ۲۳ زن سالمند ۶۱-۸۵ سال اثر ۶ هفته تمرین مقاومتی کوتاه مدت را بر میزان قطعه C- ترمینال آگرین که نشانگر شکافته شدن و تخریب آگرین است در گردش خون و ارتباط آن با توده بدون چرب را مورد بررسی قرار دادند. آنها اعلام کردند که میزان CAF در اثر تمرین مقاومتی کوتاه مدت در افراد مسن ۱۰/۴ درصد افزایش یافت که این تغییر به لحاظ کلینیکی دارای افزایش معنی دار بود. آنها همچنین اعلام کردند که میزان CAF پایه در

۱ Drey&etal(2013)

۲ Bollinger&etal(2011)

۳ Butikofer&etal(2011)

۴ Stefan Hattwer&etal(2014)

۵ Stanco & etal 1998

۶ Fragala &etal 2013

زنان سالمند بالاتر از مردان سالمند است و میزان CAF به طور معنی‌داری با سطح مقطع عضله پهن جانبی رابطه دارد (۱۷).

علاوه بر ایند ارتباط با اثر تمرینات ورزشی بر NMJ تحقیقات نشان داده‌اند که تمرینات ورزشی می‌توانند بر ساختار و مورفولوژی NMJ اثر گذار باشند و حتی نقش محافظتی بر NMJ در افراد سالمند ایفا کنند. در این رابطه دشن و همکاران<sup>۱</sup> (۲۰۱۰) دریافتند که مقادیر بالای فعالیت NMJ باعث محافظت از NMJ در تخریب ناشی از سارکوپنیا می‌شود (۱۸). آگار و همکاران<sup>۲</sup> (۲۰۱۰) دریافتند که تمرینات قدرتی به ویژه تمرینات توانی موجب فعالیت بالای NMJ می‌شود که می‌تواند کارایی NMJ را بالا ببرد (۱۹). در این رابطه دشن و همکاران (۲۰۱۰) اعلام کردند که فعال سازی مکرر NMJ می‌تواند موجب تغییرات معنی‌داری در عملکرد و ریخت‌شناختی اتصال عصبی - عضلانی شود. این محققان دریافتند که تمرینات مقاومتی (یعنی، بالا رفتن از نرده بان همراه با حمل وزنه به مدت ۷ روز)، سازگاری‌هایی را در NMJ عضله نعلی (SOL) به وجود می‌آورد و باعث محافظت از NMJ در برابر سارکوپنیا ناشی از پیری می‌شود (۲۰).

در رابطه با تغییرات تارهای FT و ST در سالمندی که معمولاً با افزایش سن دچار آتروفی و تحلیل می‌شوند اسپانگنبرگ و بوث<sup>۳</sup> اعلام کردند که تمرینات مقاومتی باعث افزایش تارهای نوع IIa در انسان و افزایش تارهای نوع IIx در موش‌ها می‌شود (۲۱) که این تغییرات ناشی از تمرینات مقاومتی در تارها در جهت معکوس با سارکوپنیا است.

با توجه به اینکه اثر تمرین ورزشی بر NMJ و پیشگیری از بروز سارکوپنیا به اثبات رسیده است، احتمالاً تمرینات ورزشی مقاومتی یکی از راهکارهای مناسب در حفاظت از NMJ و پیش‌گیری و درمان سارکوپنیا باشد (۱۹،۹،۲۰). ولی با بررسی‌های به عمل آمده تا به امروز هیچ تحقیقی اثر تمرینات ورزشی را در ارتباط با گیرنده پروتئینی آگرین مورد مطالعه قرار نداده است. بنابراین با توجه به اثر تمرین مقاومتی در پیشگیری از تخریب NMJ، پیشگیری از تخریب تارها و بروز سارکوپنیا، افزایش کارایی NMJ (۹،۱۹،۲۰)، کاهش میزان تخریب آگرین (۹)، افزایش سنتز پروتئین و جلوگیری از آتروفی و سارکوپنیا (۳) و تغییر فنوتیپ تارها به سمت تارهای تند انقباض که مخالف با اثر سارکوپنیا است (۲۰)، تحقیق حاضر به منظور بررسی اثر ۸ هفته تمرین مقاومتی فزاینده بر میزان پروتئین آگرین در بافت عضلات کند انقباض (ST) نعلی (soleus) و عضله تند انقباض (FT) بازکننده طولی انگشتان (EDL) و به طور کل پیشگیری از تخریب NMJ و بروز سارکوپنیا طراحی و انجام شده است.

## مواد و روش‌ها

این پژوهش از نوع تجربی-بنیادی بوده و دارای یک گروه کنترل و یک گروه تجربی است. در این تحقیق ۲۰ سرموش صحرائی مسن ۲۴ ماهه نژاد ویستار سالم و با میانگین وزنی  $485 \pm 3/5$  که هیچ‌گونه تحقیقی قبلاً روی آنها انجام نشده است از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشکده فارماکولوژی دانشگاه تهران خریداری شد. موش‌ها در قفس‌های ویژه از جنس پلی‌کربنات شفاف و در محیط آزمایشگاهی  $22 \pm 5$  درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۳۰ تا ۷۰ درصد و چرخه ۱۲ ساعت خواب و

<sup>۱</sup> Deschenes & etal 2010

<sup>۲</sup> Aagaard & etal 2010

<sup>۳</sup> Spangenburg & Booth 2003

بیداری و با در دسترس بودن آزاد آب و غذا نگهداری و کنترل شدند. تمام آزمایشهای صورت گرفته براساس دستورالعمل کمیته کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه شهید بهشتی طراحی گردید. پس از یک هفته آشنایی با محیط و زندگی در شرایط آزمایشگاهی، حیوانات به روش تصادفی به گروه تمرین مقاومتی و کنترل تقسیم شدند. تمرین مقاومتی شامل بالا رفتن از نردبان (طول ۱ متر، شیب ۸۵ درجه، ۲۶ پله و ۲ سانتی متر فضای بین هرپله) بود که ۳ جلسه در هفته و به مدت ۸ هفته انجام گرفت. موش ها به منظور آشنا سازی (هفته دوم) با نحوه اجرای پروتکل تمرینی ۴ روز به مدت ۴۵ دقیقه بدون وزنه تمرین بالا رفتن از نردبان را انجام دادند. در اولین جلسه اصلی اجرای پروتکل تمرینی، وزنه ها توسط یک کیسه پارچه ای با چسب لکوپلاست به دوسوم انتهای فوقانی دم موش ها بسته می شد و به منظور تحریک آزمودنیها در صورت نیاز از لمس کردن دم آنها جهت بالا رفتن از نردبان استفاده می شد. به منظور انجام تکرار اول، وزنه ای معادل ۵۰ درصد وزن بدن موش ها به دم آنها متصل شده و به ترتیب ۷۵، ۹۰ و ۱۰۰ درصد برای هر تکرار افزایش می یافت. اگر موش قادر به حمل بار بود با هر تکرار موفق ۳۰ گرم وزنه به کیسه حاوی وزنه اضافه می شد تا حیوان به واماندگی برسد که در نهایت کل تکرار حرکات تمرینی به ۸ بار می رسید. آخرین وزنه حمل شده قبل از واماندگی، به عنوان وزنه حداکثر برای پروتکل جلسه بعد استفاده می شد. بنابراین در جلسه های بعدی تمرین به ترتیب ۵۰، ۷۵، ۹۰ و ۱۰۰ درصد وزنه حداکثر جلسه قبل استفاده و به ازای هر تکرار موفق ۳۰ گرم وزنه اضافه به وزنه قبلی حمل شده اضافه می شد. با این تفاوت که بعد از واماندگی و عدم توانایی در اجرا توسط هر موش جهت جلوگیری از آسیب حیوانات و جهت تکمیل تمرین طراحی شده، با ۷۰ درصد حداکثر وزنه تمرین می کردند، به طوری که هر جلسه تمرین شامل حداقل ۶ و حداکثر ۸ تکرار بود و بین هر تکرار ۲ دقیقه استراحت وجود داشت که استراحت با رسیدن موش به بالای نردبان شروع می شد. بعد از اتمام زمان استراحت مراحل بعدی تمرین مجدداً تکرار می شد (۲۲)

با توجه به برنامه زمانبندی پروتکل تمرین و اتمام مدت تمرین، جهت از بین بردن اثرات حاد تمرین در هنگام بافت برداری و تشریح حیوانات ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین تشریح شدند. بدین منظور موش ها با تزریق درون صفاقی ترکیبی از کتامین<sup>۱</sup> (۳۰-۵۰ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن) و زایلزین<sup>۲</sup> (۳-۵ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن) بی هوش 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 مقاومتی، عضله EDL و عضله نعلی برای اندازه گیری میزان پروتئین آگرین به روش وسترن بلات و با استفاده از آنتی بادی مخصوص آگرین (Anti-Agrin antibody 131 شرکت abcam) جداسازی و استخراج شدند. برای انجام تست وسترن بلات مقادیر مساوی از پروتئین توسط ژل پلی آکرل 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 در ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شده و در روز دوم ۳ بار با محلول TBST شستشو داده و کاغذ با آنتی بادی ثانویه به مدت یک ساعت انکوبه گردید. بعد از این مرحله کاغذ ها با

1. Ketamine

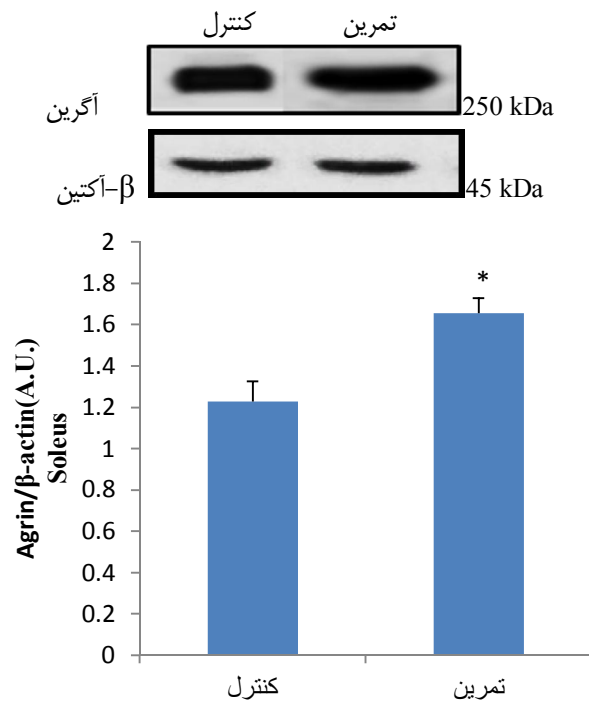
2. Xylazine

کیت ECL پوشانده و با استفاده از فیلم رادیولوژی ظاهر شد. در مرحله بعد بلات ها در بافر استرپینگ شستشو داده شده و آنتی بادی بتاآکتین به روی کاغذ اضافه شده و دوباره با آنتی بادی ثانویه انکوبه شد و بتاآکتین کنترل هم در فیلم رادیولوژی ظاهر شده و در نهایت توسط برنامه Image J باند‌های بدست آمده دانسیتومتری گردید.

**تجزیه و تحلیل آماری:** از آزمون کلموگروف-اسمیرونوفبرای تعیین طبیعی بودن توزیع داده ها استفاده شد و برای مقایسه تغییرات گروه‌های مختلف از آزمون t-مستقل استفاده شد. سطح معنی داری برای تمام تحلیل‌های آماری  $p < 0.05$  در نظر گرفته شد. محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار spss 17 انجام گرفت.

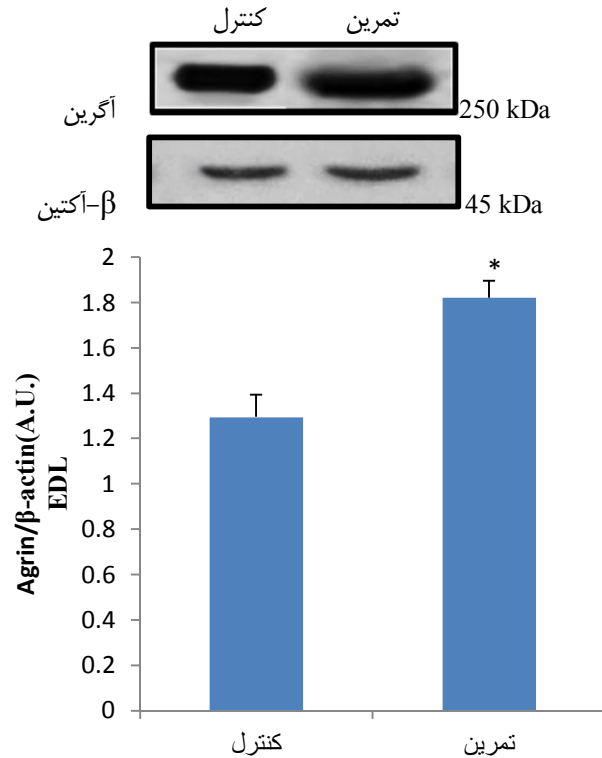
### یافته های تحقیق

تجزیه و تحلیل یافته های تحقیق نشان داد که میزان گیرنده پروتئینی آگرین عضله نعلی در گروه تجربی پس از اجرای تمرین مقاومتی در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی داری نشان داد ( $t_{(22)} = 12/137, p \leq 0.001$ ). وسترن بلات نشان داد که چگالی باند آگرین نسبت به باند  $\beta$ -actin در گروه تمرین حدود  $1/65$  و در گروه کنترل حدود  $1/22$  بود (نمودار ۱). همچنین نتایج تجزیه و تحلیل آماری به دست آمده در رابطه با اثر تمرین مقاومتی بر آگرین عضله EDL نتایج نشان داد که میزان آگرین در عضله EDL گروه تمرین نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی داری نشان داد و این نوع تمرین باعث افزایش معنی داری در میزان آگرین شده است. ( $t_{(22)} = 14/806, p \leq 0.001$ ). نتایج وسترن بلات نشان داد که چگالی باند آگرین نسبت به باند  $\beta$ -actin در گروه تمرین حدود  $1/82$  و در گروه کنترل حدود  $1/29$  بود (نمودار ۲).



### نمودار ۱. مقایسه میانگین ( $\pm$ انحراف معیار) میزان آگرین عضله نعلی موش های سالمند گروه کنترل و تمرین مقاومتی

\* اختلاف معنی دار بین گروه ها در سطح  $P < 0.001$



### نمودار ۲. مقایسه میانگین ( $\pm$ انحراف معیار) میزان آگرین عضله EDL موش های سالمند گروه کنترل و تمرین مقاومتی

\* اختلاف معنی دار بین گروه ها در سطح  $P < 0.001$

#### بحث و نتیجه گیری

هدف تحقیق حاضر بررسی اثر یک دوره تمرین مقاومتی فزاینده بر میزان گیرنده پروتئینی آگرین در موش های نر ویستار بود. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که هشت هفته تمرین مقاومتی باعث اختلاف معنی دار در میزان آگرین عضله تند انقباض EDL شد. همچنین چنین اختلاف معنی داری در میزان آگرین در عضلات کند انقباض نعلی در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد که این تغییرات همراه با افزایش میزان آگرین در هر دو نوع عضله نعلی و EDL بود. تجزیه و تحلیل بیشتر داده ها نشان داد که میزان افزایش آگرین در تارهای تند انقباض EDL بیشتر از تار های کند انقباض نعلی بود. همانطوری که قبلا اشاره شد گیرنده پروتئینی آگرین نقش بسیار مهمی

در شکل گیری، بلوغ، تثبیت اتصال عصبی-عضلانی دارد (۱۲) و تخریب آن باعث تخریب NMJ و بروز سارکوپنیا در عضلات افراد سالمند

می شود (۲۰۱). با توجه به نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر ۸ هفته تمرین مقاومتی فزاینده در موش های سالمند نژاد ویستار باعث افزایش میزان آگرین عضلات تند انقباض و کند انقباض در این حیوانات شده است که احتمالاً بیانگر سازگاری عصبی - عضلانی ناشی از این نوع تمرین بعد از دو ماه تمرین بوده است . نتایج تحقیقات مکرراً نشان داده‌اند که تار های عضلانی تند انقباض بیشتر در معرض تخریب در سالمندی و سارکوپنیا می‌شوند که دلیل آنرا قطع عصب و عصب گیری مجدد این تارها در اثر سارکوپنیا اعلام کرده اند که برخی تحقیقات علت آنرا تخریب آگرین و کاهش آگرین اعلام کرده اند (۳،۵). در این رابطه نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در اثر تمرین مقاومتی میزان آگرین در عضله تند انقباض EDL افزایش یافت و این افزایش حتی در مقایسه با عضلات کند انقباض نعلی بیشتر بود که بیانگر کارآمدی و فراخوانی بیشتر این عضلات در اثر تمرین مقاومتی بود که می تواند در پیشگیری از سارکوپنیا مفید باشد. از طرف دیگر تمرینات ورزشی مختلف می توانند از تخریب موتونورون های سازنده آگرین و فعال سازی NMJ و محافظت از آن به ویژه در افراد سالمند و همچنین در پیشگیری از بروز سارکوپنیا موثر باشند (۹،۱۸،۴).

همچنین نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در اثر اجرای این نوع تمرین میزان پروتئین آگرین در عضلا کند انقباض نعلی حیوانات تحت تمرین افزایش یافت که این اتفاق نشان دهنده آن است این نوع تمرین دارای شدت مناسبی در فعال کردن عضلات کند انقباض بوده است و با انجام طولانی مدت این تمرین با ایجاد سازگاری عصبی-عضلانی باعث افزایش میزان آگرین در این نوع عضلات شده است. در این رابطه استانکو و همکاران نشان دادند که تحریک الکتریکی مزمن اثر چندانی بر گیرنده پروتئینی آگرین ندارد (۱۵). بنابراین با توجه به یافته های این محققان می‌توان گفت که شدت تمرین نقش تعیین کننده ای در فعال کردن سنتر آگرین دارد که به دلیل افزایش میزان آگرین در اثر این نوع تمرین بیانگر اثر بخش بودن آن می باشد ولی نتایج تحقیق حاضر با نتایج یافته های استانکو و همکاران همخوانی ندارد که علت آن می تواند به تفاوت در شدت و میزان تحریک اعمال شده بر عضلات باشد.

همانطوریکه اکثر تحقیقات نشان داده اند ، کاهش میزان آگرین و تخریب آن موجب تخریب NMJ و بروز سارکوپنیا می شود. ولی در تحقیق حاضر میزان آگرین پس از تمرین مقاومتی هم در عضلات کند انقباض و هم تند انقباض افزایش یافت که می تواند بیانگر نقش محافظتی تمرین مقاومتی از NMJ و پیشگیری از سارکوپنیا باشد. در این رابطه استفان هاتورز و همکاران (۲۰۱۴) در تحقیقی در ارتباط با تزریق آگرین عصبی (NT-1654) به موش هایی که در معرض بیان بالای نوروترپسین دچار سارکوپنیا شده بودند دریافتند که تزریق آگرین به این موش ها باعث ثبات NMJ و معکوس شدن روند سارکوپنیا و همچنین عصب دهی مجدد عضلات آسیب دیده در موش های دچار سارکوپنیا می شود (۱۶) که یافته تحقیق حاضر با یافته های استفان و همکاران همخوانی دارد. همچنین در رابطه با اثر تمرین ورزشی بر آگرین درای و همکاران اثر تمرین توانی و مقاومتی همراه با مکمل ویتامین D را در مورد تخریب گیرنده پروتئینی آگرین (قطعه C- ترمینال آگرین) و تخریب NMJs و بروز سارکوپنیا در ۴۷ زن سالمند بی تحرک مورد مطالعه قرار دادند، نتایج یافته‌های آنان نشان داد که مکمل ویتامین



D و فعالیت بدنی مقاومتی و توانی به طور معنی داری با کاهش تخریب آگرین و NMJ در ارتباط بود (۹) که نتایج حاصل از تحقیق حاضر با یافته های درای و همکاران همخوانی دارد.

ولی در این رابطه فراگالا و همکاراندر تحقیق بر روی کیفیت عضلات ۲۳ زن مسن ۶۱-۸۵ سال اثر ۶ هفته تمرین مقاومتی کوتاه مدت را بر میزان قطعه C- ترمینال آگرین که نشانگر شکافته شدن و تخریب آگرین در گردش خون و ارتباط آن با توده عضلانی بدون چرب است را مورد بررسی قرار دادند. آنها اعلام کردند که میزان CAF که نشانگر تخریب آگرین است در اثر تمرین مقاومتی کوتاه مدت در افراد مسن ۴/۱۰ درصد افزایش یافت که این تغییر به لحاظ کلینیکی دارای افزایش معنی دار بود. آنها همچنین اعلام کردند که میزان CAF پایه در زنان مسن بالاتر از مردان مسن است و میزان CAF به طور معنی داری با سطح مقطع عضله پهن جانبی رابطه دارد (۱۷) که با توجه به نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر مبنی بر افزایش میزان آگرین که در تضاد با تخریب آن است یافته های تحقیق حاضر به نتایج تحقیق فراگالا و همکاران همخوانی ندارد.

همچنین در ارتباط با اثر تمرینات ورزشی بر NMJ تحقیقات نشان داده اند که تمرینات ورزشی می توانند بر ساختار و مورفولوژی NMJ اثر گذار باشند و حتی نقش محافظتی بر NMJ در افراد سالمند ایفا کنند. در این رابطه دشن و همکاران (۲۰۱۰) دریافتند که مقادیر بالای تحریک و فعال سازی NMJ باعث محافظت NMJ در برابر تخریب ناشی از سارکوپنیا می شود (۱۸). آگارد و همکاران اعلام کردند که تمرینات قدرتی به ویژه تمرینات توانی موجب فعالیت بالای NMJ می شود که می تواند کارایی NMJ را بالا ببرد (۱۹). همچنین محققان نشان دادند که تمرین ورزشی باعث فعال شدن NMJ شده و علاوه بر تغییرات ساختاری و مورفولوژیکی NMJ باعث محافظت آن در برابر سارکوپنیا می شود (۱۹). در این رابطه دشن و همکاران اعلام کردند که فعال سازی مکرر NMJ می تواند موجب تغییرات معنی داری در عملکرد و ریخت شناختی NMJ شود. این محققان دریافتند که تمرینات مقاومتی (یعنی، بالا رفتن از نرده بان همراه با حمل وزنه به مدت ۷ روز)، سازگاریهایی را در NMJ عضله نعلی به وجود می آورد و باعث محافظت از NMJ در برابر سارکوپنیا ناشی از پیری می شود (۲۰). همانطور که تحقیقات متعددی اعلام کرده اند، تخریب آگرین و کاهش میزان آن و افزایش میزان CAF که نشانگر تخریب آگرین است عملکرد محافظتی آگرین از NMJ را از بین می برد و با ایجاد بی ثباتی و تخریب آن موجب بروز سارکوپنیا و حتی سارکوپنیا زودرس می شود لذا با افزایش آگرین از طریق این نوع تمرین می توان استنباط کرد که تمرین مقاومتی می تواند نقش مهمی در پیشگیری از تخریب NMJ و بروز سارکوپنیا ایفا نماید. یکی دیگر از تغییرات عمده در سارکوپنیا آسیب پذیری بیشتر تارهای FT نسبت به ST و کاهش در اندازه هردو نوع تار FT و ST است ولی کاهش تارهای نوع FT در مقایسه با تارهای نوع ST در اثر افزایش سن و سارکوپنیا شدیدتر است (۳،۴،۵). با توجه به نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر، شاید یکی از دلایل احتمالی تغییرات و آسیب پذیری تارهای عضلانی کاهش میزان آگرین عضلات افراد مسن باشد، به دلیل آنکه در نتایج تحقیق حاضر، میزان آگرین در هر دو عضلات FT و ST افزایش یافت و این افزایش در تارهای FT که بیشتر در معرض آسیب هستند نسبت به تارهای ST بالاتر بود، لذا می توان گفت یکی از دلایل احتمالی تخریب بیشتر تارهای FT به دلیل پایین بودن میزان آگرین در این نوع تارها و به دنبال آن آسیب NMJ تارهای FT باشد که با توجه به سازگاری ایجاد شده می توان گفت تمرین مقاومتی می تواند نقش مناسبی در پیشگیری از تخریب تارها در سالمندی و بروز سارکوپنیا ایفا نماید.

به طور خلاصه نتایج این پژوهش نشان داد که هشت هفته تمرین مقاومتی در افزایش میزان آگرین در عضلات موش های ویستار بسیار موثر بود که این تغییرات هم در عضلات تند انقباض EDL و هم عضلات کند انقباض نعلی مشاهده شد که احتمالاً این افزایش به دلیل سازگاری عصبی-عضلانی ایجاد شده در طی مدت تمرین بوده این سازگاری احتمالاً به دلیل افزایش تولید آگرین در سلول های سازنده آن و یا به دلیل افزایش میزان رهایش آن از سیستم عصبی و به ویژه از انتهای موتونورون ها به صفحه محرکه بوده است لذا انجام تمرین مقاومتی می تواند با افزایش در میزان آگرین از اثر تخریبی افزایش سن بر سیستم عصبی و به ویژه بر NMJ عضلات افراد سالمند محافظت نموده و از بروز سارکوپنیا در افراد سالمند پیشگیری نماید. بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق به افراد سالمند توصیه می شود تا جهت پیشگیری از تحلیل و آتروفی عضلات و عدم ابتلا به سارکوپنیا و یا در صورت ابتلا به این عارضه، تمرین مقاومتی را به عنوان یک روش درمانی مناسب در زندگی روزمره خود مد نظر قرار دهند.

### References:

1. Greenlund LJ, Nair KS. 2003. Sarcopenia--consequences, mechanisms, and potential therapies. *Mech Ageing Dev.* 124: 287-99.
2. Lang T, et al. 2010. Sarcopenia etiology, clinical consequences, intervention, and assessment. *Osteoporos Int.* 21: 543-59.
3. Lexell J, et al. 1995. Heavy-resistance training in older Scandinavian men and women: short- and long-term effects on arm and leg muscles. *Scand J Med Sci Sports.* 5: 329-41.
4. Deschene MR. 2004. Effects of aging on muscle fibre type and size. *Sports Medicine.* 34: 809-824.
5. Kung TA, Cederna PS, Meulen JH, Urbanek MG, Faulkner JA. 2013. Motor Unit Changes Seen With Skeletal Muscle Sarcopenia in Oldest Old Rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 42: 563-579.
6. Dirks AJ, Leeuwenburgh C. 2005. The role of apoptosis in age related skeletal muscle atrophy. *Sports Medicine*, vol. 35, no. 6, pp. 473-483.
7. Butikofer L, Zurlinden A, Bolliger MF, Kunz B, Sonderegger P. 2011. Destabilization of the neuromuscular junction by proteolytic cleavage of agrin results in precocious sarcopenia. *FASEB J.* 25: 4378-4393.
8. Bolliger MF, Zurlinden A, Luscher D, Butikofer L, Shakhova O, Francolini M, Kozlov SV, Cinelli P, Stephan A, Kistler AD, Rulicke T, Pelczar P, Ledermann B, Fumagalli G, Gloor SM, Kunz B, Sonderegger P. 2010. Specific proteolytic cleavage of agrin regulates maturation of the neuromuscular junction. *J. Cell Sci.* 123: 3944-3955.
9. Drey M, C. Sieber CC, Bauer JM, Uter W, Dahinden P, Fariello RG, Vrijbloed JV and the FiAT intervention group. 2013. C-terminal Agrin Fragment as a potential marker for sarcopenia caused by degeneration of the neuromuscular junction. *Experimental Gerontology* 48 : 76-80.
10. Tsen G, Halfter W, Kröger S, Cole GJ. 1995. Agrin is a heparan sulfate proteoglycan. *J Biol Chem.* 270 : 3392-3399.
11. Gingras J, Rassadi S, Cooper E, Ferns M. 2002. Agrin plays an organizing role in the formation of sympathetic synapses. *The Journal of cell biology.* 158: 1109-1118.
12. Haitao Wu, Wen C, Xiong & Lin Mei. 2010. To build a synapse: signaling pathways in neuromuscular junction assembly. *Development.* 137: 1017-1033

13. Kroger S, Schröder JE .2002. Agrin in the developing CNS: new roles for a synapse organizer. *News Physiol. Sci.* 17 : 207–12.
14. Stefan Hettwer , Pius Dahinden , Stefan Kucsera , Carlo Farina ,Shaheen Ahmed , Ruggero Fariello , Michael Drey , Cornel Christian Sieber , Jan Willem Vrijbloed.2012. Elevated levels of a C-terminal agrin fragment identifies a new subset of sarcopenia patients. *Experimental Gerontology.*24:354-367.
15. Anne MS, Micheal JW.1998. Agrin and acetylcholin receptor distribution following electrical stimulation. *Muscle & Nerve* .407-409
16. Stefan Hettwer, Shuo Lin, Stefan Kucsera, Monika Haubitz, Filippo Oliveri, Ruggero G. Fariello, MA. Ruegg, Jan W, Vrijbloed.2014. Injection of a Soluble Fragment of Neural Agrin (NT-1654) Considerably Improves the Muscle Pathology Caused by the Disassembly of the Neuromuscular Junction. *PLOS ONE.* 9:1-9.
17. Fragala MS, Jajtner AR, Beyer KS, Townsend JR, Emerson NS, Scanlon TC, Oliveira LP, Hoffman JR, Stout JR.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. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* . 7:124-132.
18. Deschenes MR, Roby MA, Eason MK, Harris MB.2010. Remodeling of the neuromuscular junction precedes sarcopenia related alterations in myofibers. *Exp. Gerontol.* 45:389–393.
19. Aagaard P, Suetta C, Caserotti P, Magnusson SP, Kjaer M.2010. Role of the nervous system in sarcopenia and muscle atrophy with aging: strength training as a countermeasure. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 20:49–64.
20. Deschenes MR, Judelson DA, Kraemer WJ.2010. Effects of resistance training on neuromuscular junction morphology. *Muscle Nerve* .;23:1576–1581.
21. Spangenburg EE, Booth FW.2003. Molecular regulation of individual skeletal muscle fibre types. *Acta Physiol Scand.*178:413–424.
22. Matheny W, Merritt E, Zannikos SV, Farrar RP, Adamo ML.2009. Serum IGF-I deficiency does not prevent compensatory skeletal muscle hypertrophy in resistance exercise. *Experimental Biology and Medicine.*23:164-70.