

اثر L-آرژنین بر انتقال عصبی-عضلانی عضله دوطبطنی گردنی جوجه

داوود فرزین (Ph.D.)⁺ سکینه اسدزاده وسطی کلائی (Ph.D.)^{**}
مسعود تشفام (Ph.D.)^{***} بهزاد اسفندیاری (Ph.D.)^{****}

چکیده

سابقه و هدف: نیتریک اکساید (NO) مولکول گازی کوتاه اثر است که از تجزیه ال-آرژنین به سیترویلین تحت فعالیت آنزیم نیتریک اکساید سنتاز (NOS) وابسته به کلسیم/کالمودولین تولید می‌شود. بیان ایزوفرم‌های متعدد نیتریک اکساید سنتاز در عضله اسکلتی، پیشنهادکننده نقش بسیار مهم نیتریک اکساید در تنظیم متابولیسم و عملکرد عضلانی است. در این مطالعه، اثر ال-آرژنین در برخوردگاه عصبی-عضلانی عضله دو طبطنی گردنی جوجه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: عضله دوطبطنی گردنی از جوجه‌های به سن ۳ هفته تهیه و در دستگاه حمام عضو کار گذاشته می‌شد. حمام عضو دارای یک ظرف با حجم ۷۰ میلی‌لیتر حاوی محلول تیروید هوادهی شده با اکسیژن با درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد بود. غلظت نیتریک اکساید نیز با استفاده از روش طیف سنجی رنگ و ردیابی مستقیم نیتریک اکساید، نیتريت و نیترات در هموژنات عضله دوطبطنی گردنی جوجه اندازه‌گیری گردید. غلظت نیتريت تام (نیتريت+ نیترات)، پس از تبدیل کامل نیترات به نیتريت با گرانول‌های کادمیوم اشباع شده با مس، توسط یک طیف سنج در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: ال-آرژنین در غلظت ۵۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر، پاسخ حرکت کششی (Twitch) ناشی از تحریک الکتریکی را کاهش داد و منحنی‌های وابسته به میزان (Dose-Response) استیل کولین یا کرباکول را به سمت راست منتقل کرد. ال-آرژنین در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر منجر به چرخش به راست برجسته همراه با کاهش سقف اثر برای منحنی‌های وابسته به میزان استیل کولین یا کرباکول شد. اثر مهار ال-آرژنین بر پاسخ حرکت کششی توسط کافئین (۲۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر) مسدود گردید. سطح نیتریک اکساید نیز به طور معنی‌داری در غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر ال-آرژنین در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت.

استنتاج: این یافته‌ها نقش احتمالی سطوح افزایش یافته نیتریک اکساید به دنبال اثر تضعیفی ال-آرژنین بر روی پاسخ حرکت کششی را نشان می‌دهد. علاوه بر این، نتایج نشان می‌دهد که اثر آنتاگونیستی پس سیناپسی ال-آرژنین احتمالاً ناشی از مختل شدن آزادسازی یون‌های کلسیم از رتیکولوم سارکوپلاسمیک است.

واژه‌های کلیدی: L-آرژنین، نیتریک اکساید، عضله اسکلتی، جوجه

⁺ مؤلف مسئول: داوود فرزین - ساری، کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، دانشکده پزشکی

* دکترای فارماکولوژی، دانشیار مرکز تحقیقات روانپزشکی و علوم رفتاری دانشگاه علوم پزشکی مازندران

** دکترای فیزیولوژی دامپزشکی، واحد علوم تحقیقات تهران، عضو هیأت علمی دانشگاه آزاد واحد قائم شهر

*** دکترای فیزیولوژی دامپزشکی، دانشیار دانشگاه آزاد واحد تهران

**** عضو هیئت علمی انستیتو پاستور ایران

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۲/۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۸۷/۲/۱۱ تاریخ تصویب: ۸۷/۳/۲۲

مقدمه

نیتریک اکساید (NO) از نظر ظاهری گاز بی رنگ و از نظر ساختمان مولکولی به صورت خطی می باشد. حضور الکترون جفت نشده، رادیکال نیتریک اکساید را به یک ترکیب بسیار واکنش دهنده با نیمه عمر چند ثانیه‌ای تبدیل می کند (۱). نیتریک اکساید به عنوان یک مولکول پیام رسان، نقش مهمی در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی مانند اتساع عروق، کاهش چسبندگی لکوسیت‌ها، حساسیت به انسولین، مهار تجمع پلاکتی، تنظیم جریان خون عضله اسکلتی، تمایز میوسیتی، تنفس سلولی، هموستاز گلوکز و تولید نیرو در عضله دارد (۲ تا ۴).

نیتریک اکساید از اکسیداسیون گروه گوآنیدین ال-آرژنینین مشتق می گیرد. ال-آرژنینین یکی از بیست اسید آمینه موثر در ساخت پروتئین‌ها می باشد. این اسید آمینه نقش مهمی در واکنش‌های فیزیولوژیک و متابولیکی در بدن دارد. ال-آرژنینین در ترشح انسولین، گلوکاگن، هورمون رشد و پرولاکتین نقش دارد. علاوه بر این، ال-آرژنینین واجد اثرات آنتی اکسیدانتهی و تقویت کنندگی سیستم ایمنی می باشد (۵). ال-آرژنینین در خروج اسپرم و مایع منی، تحریک و افزایش زمان نعوظ، ترمیم پوست و دیگر بافت‌های پیوندی نیز نقش دارد (۶).

از نظر متابولیکی، ال-آرژنینین سوبسترای آنزیم نیتریک اکساید سنتاز می باشد و توسط این آنزیم به سیتروولین و نیتریک اکساید تبدیل می شود. نیتریک اکساید سنتاز در غشا سیتوپلاسمایی، سیتوپلاسم، هسته، شبکه آندوپلاسمیک خشن و میتوکندری‌ها یافت می شود. نیتریک اکساید سنتاز سه ایزوform نوع ۱ یا nNOS (نیتریک اکساید سنتاز بافت‌های عصبی)، نوع ۲ یا iNOS (نیتریک اکساید سنتاز القایی که تحت شرایط خاص در ماکروفاژها و هپاتوسیت‌ها تولید می شود) و نوع ۳ یا eNOS (نیتریک اکساید سنتاز سلول‌های

اندوتلیالی) دارد (۷). هر سه ایزوform نیتریک اکساید سنتاز در عضله اسکلتی یافت می شوند. مهم‌ترین نیتریک اکساید سنتاز موجود در عضلات اسکلتی، nNOS می باشد. این ایزوform در تمام عضلات اسکلتی پستانداران به ویژه در صفحه انتهایی عضله وجود دارد. میزان و محل استقرار ایزوform nNOS در عضلات اسکلتی به سن، مرحله رشد، میزان عصب‌دهی، فعالیت، مدت زمان تماس با سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد و نوع فیبر عضلانی وابسته است (۷). وجود ایزوform‌های متعدد نیتریک اکساید سنتاز در بافت عضلات اسکلتی، نقش بسیار مهم نیتریک اکساید در تنظیم متابولیسم و کارایی عضله را نشان می دهد. در حقیقت، نیتریک اکساید می تواند جفت سازی (coupling) تحریک-انقباض عضله اسکلتی، انتقال سیگنال مربوط به گیرنده، فعالیت کانال کلسیمی نوع L، آزاد شدن کلسیم از رتیکولوم سارکوپلاسمیک و تنفس میتوکندریایی را تحت تاثیر قرار دهد (۸). علاوه بر این، G-N (نیترو-ال-آرژنینین متیل استر (NAME)، مهارکننده نیتریک اکساید سنتاز) می تواند فعالیت آزادسازی کلسیم در هموژنات عضله اسکلتی را افزایش و S-نیترو-و-N-استیل پنی سیلامین (SNAP)، دهنده نیتریک اکساید می تواند آزاد سازی کلسیم در حفرات (Vesicle) مجرای رتیکولوم سارکوپلاسمیک را کاهش دهد (۹، ۱۰). چنین مطالعاتی برای ال-آرژنینین موجود نیست ولی پیش بینی می شود که ال-آرژنینین نیز بتواند عملکرد انقباضی عضله اسکلتی را تغییر دهد. این مطالعه به منظور بررسی اثر ال-آرژنینین بر عملکرد انقباضی عضله اسکلتی طراحی و اجرا شده است. بررسی اثر ال-آرژنینین بر انتقال عصبی-عضلانی عضله دوطبقی گردنی جوجه می تواند درک بهتری از نقش فیزیولوژیک نیتریک اکساید در عضلات اسکلتی ارائه دهد. عضله دوطبقی گردنی

۲۰ NaCl ۸۰ گرم، محلول KCl ۱۰ درصد ۲۰ میلی لیتر، محلول MgSO₄ ۱۰ درصد ۲۶ میلی لیتر، محلول NaH₂PO₄ ۵ درصد ۱۳ میلی لیتر، گلوکز ۱۰ گرم، NaHCO₃ ۱۰ گرم، محلول CaCl₂ مولار ۱۸ میلی لیتر.

معرف ها و محلول های لازم برای تعیین طیف سنجی NO:

محلول نیتريت سدیم (۱۰۰ mM)، معرف A (محلول سولفونیل آمید ۱ درصد وزنی / حجمی در اسید کلریدریک ۳ نرمال)، معرف B (محلول نفتیل اتیلن دی آمین دی هیدرو کلراید ۰/۱ درصد وزنی / حجمی در آب)، محلول ZnSO₄ (۷۵ mM)، محلول NaOH (۹/۷ pH)، بافر فسفات (۵۵ mM)، بافر گلیسین - NaOH (۹/۷ pH)، بافر فسفات (۷/۴ pH)، محلول استات مس ۵ درصد، گرانول های کادمیوم (۱۰۰ مش و یا ۰/۲ گرم). معرف A، معرف B و محلول نیتريت در درجه حرارت ۴ درجه سانتیگراد و دیگر مواد در درجه حرارت اتاق قابل نگهداری می باشند.

عضله دو بطنی گردنی جوجه:

عضله دوطبطنی طبق روش Perry (۱۹۷۱) از گردن جوجه (با سن ۳ هفته) جدا و سپس به قلاب ظرف (vessel) دستگاه حمام عضو (هاروارد، انگلستان) و مبدل (Transducer) دستگاه فیزیوگراف (هاروارد، انگلستان) متصل می شد (۱۱). جهت حفظ سلامتی عضله و برقراری شرایط فیزیولوژیک، محلول تیروید ۳۷ درجه سانتی گراد به همراه اکسیژن وارد ظرف حاوی عضله می گردید. پس از کنترل نهایی، با استفاده از یک دستگاه محرک (هاروارد، انگلستان) عضله دو بطنی گردنی جوجه در فرکانس ۰/۱ هرتز، ولتاژ ۵ الی ۱۰ ولت و مدت زمان تحریک ۰/۵ میلی ثانیه تحریک می شد. پاسخ حرکت کششی حاصل توسط دستگاه

جوجه دو نوع فیبر دارد: فیبرهای سریع منقبض شونده (focally innervated) و فیبرهای آهسته منقبض شونده (multiply innervated) تحریک الکتریکی فیبرهای سریع منقبض شونده، پاسخ حرکت کششی (دقیقاً شبیه آنچه که از انقباض دیافراگم پستانداران به دست می آید) و تحریک فیبرهای آهسته منقبض شونده با استیل کولین خارجی (Exogen) پاسخ انقباضی (Contracture)؛ مانند پاسخ انقباضی آهسته در عضله اسکلتی قورباغه ایجاد می کند (۱۱). این دو پاسخ می تواند در توضیح اثر ال- آرژینین بر عضله اسکلتی سودمند باشد.

مواد و روش ها

داروها و مواد مورد مصرف:

استیل کولین کلراید (Sigma, USA)، کرباکول (Sigma, USA)، کافئین (ICN, UK)، ال-آرژینین (Merck, Germany)، نیتريت سدیم (Merck, Germany)، سولفونیل آمید (Cayman Chemicals, USA)، نفتیل اتیلن دی آمین دی هیدرو کلراید (Cayman Chemicals, USA)، سولفات روی (Merck, Germany)، استات مس (Merck, Germany)، گرانول کادمیوم (Aldrich, USA)، کلرید سدیم (Merck, Germany)، کلرید پتاسیم (Merck, Germany)، سولفات منیزیم (Merck, Germany)، سدیم دی هیدروژن فسفات (Merck, Germany)، گلوکز (Merck, Germany)، بی کربنات سدیم (Merck, Germany)، کلرید کلسیم (Merck, Germany).

محلول تیروید:

برای تهیه ۱۰ لیتر محلول تیروید، مواد زیر به ترتیب در آب مقطر حل و به حجم می رسد:

فیزیوگراف بر روی کاغذ مدرج شده ثبت می گردید. برای ایجاد پاسخ انقباضی نیز از استیل کولین خارجی (Exogen) استفاده می شد (۱۱).

اندازه گیری نیتریک اکساید به روش رنگ سنجی:

روش های ساده و مستقیم سنجش نیتریک اکساید در تحقیقات فیزیولوژیک و داروشناختی رایج تر و مقبول تر هستند. اساس بیش تر این روش ها، اندازه گیری کمی غلظت تام NO^{2-}/NO^{3-} در نمونه می باشد. این غلظت می تواند به عنوان شاخصی در تعیین سطح نیتریک اکساید مورد استفاده قرار گیرد. در روش حاضر، اندازه گیری تولید نیتریک اکساید براساس روش اصلاح شده Griess صورت گرفت. در این روش، ابتدا تمامی نترات موجود در نمونه به نیتريت احیاء و سپس میزان نیتريت با استفاده از تکنیک رنگ سنجی مربوط به معرف های سولفونیل آمید و نفتیل اتیلن دی آمین هیدروکلراید در طول موج ۵۴۰ نانومتر تعیین گردید. این روش ساده بوده و زمان لازم برای اجرای آن در حدود ۴۰ دقیقه است. حساسیت تشخیصی این روش در محدوده ۰/۱ تا ۵۰ میکرومولار و زمان لازم برای احیاء نترات به نیتريت در آن ۱۵ دقیقه می باشد (۱۲).

الف- منحنی استاندارد نیتريت:

۲۴ لوله سانتریفوژ یک و نیم میلی لیتری در سه ستون ۸ ردیفه چیده شد. به سه لوله ردیف اول (ردیف A) ۱۰۰۰ μ l از محلول نیتريت ۱۰۰ μ M اضافه شد. از ردیف دوم تا آخرین ردیف (B-H)، به سه لوله از هر ردیف ۵۰۰ μ l بافر فسفات افزوده شد. برای عمل ترقیق، از لوله های ردیف A ۵۰۰ μ l محلول برداشته وارد لوله های ردیف دوم شد تا حجم آن ۱۰۰۰ μ l شود. سپس از این لوله ها نیز ۵۰۰ μ l برداشته و به لوله های ردیف سوم اضافه شد. این عمل تا لوله های ردیف یکی مانده به آخر (ردیف G) تکرار شد. در این راستا،

۵۰۰ μ l محلول آخر که در پیپت موجود بود، دور ریخته می شد. بدین ترتیب، غلظت نیتريت در لوله های ردیف A تا G برابر با ۱۰۰ μ M و ۵۰ μ M و ۲۵ μ M و ۱۲/۵ μ M و ۶/۲۵ μ M و ۳/۱۲۵ μ M و ۱/۵۶ μ M می گردید. سه لوله ردیف H که حاوی ۵۰۰ μ l بافر بود، به عنوان خالی (Blank) در نظر گرفته می شد. پس از این مراحل، ۲۵۰ μ l محلول سولفونیل آمید به همه لوله ها اضافه و محلول ها به مدت ۱۰ دقیقه در حرارت اتاق نگهداری می شدند. پس از ۱۰ دقیقه، ۲۵۰ μ l محلول نفتیل اتیلن دی آمین دی هیدروکلراید به همه لوله ها اضافه می شد تا رنگ قرمز ارغوانی ایجاد شود. پس از گذشت ۱۰ دقیقه، محلول ها به داخل Cuvet ریخته شده و جذب آن با استفاده از یک دستگاه طیف سنجی در طول موج ۵۴۰ نانومتر ثبت می گردید. برای محاسبه معادله خط از میانگین سه جذب استفاده شد.

ب- آماده سازی نمونه مورد آزمایش:

هموژنات عضله دوطبطنی گردنی جوجه (۱ گرم بافت عضله دوطبطنی گردنی جوجه در ۵۰ میلی لیتر بافر فسفات با pH ۷/۴، در حضور یا عدم حضور غلظت های ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم/میلی لیتر ال-آرژینین در حجم نهایی ۵۰ میلی لیتر که با استفاده از یک دستگاه هموژنایزر به یک مخلوط هموژن مبدل می گردید) در درجه حرارت محیط به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰g سانتریفوژ می گردید تا سلول ها و ذرات درشت آن جدا شود. سپس، ۱۰۰ μ l محلول رویی با ۸۰ μ l محلول سولفات روی ۷۵ mM در لوله سانتریفوژ ۱/۵ میلی لیتری مخلوط می شد. در هنگام اختلاط، اگر رسوبی رخ می داد، مجدداً عمل سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه تکرار می شد. پس از این مرحله، محلول رویی به یک لوله حاوی ۱۲۰ μ l محلول سودسوزآور (NaOH) ۵۵ mM منتقل می شد تا بدین وسیله عمل پروتئین زدایی کامل شود (فاکتور ترقیق ۳ = n). در این حالت محلول شفاف

حاصل می‌شد که $210 \mu\text{l}$ از آن با $70 \mu\text{l}$ بافر گلیسین در لوله‌های سانتریفوژ یک و نیم میلی‌لیتری مخلوط می‌گردید (فاکتور ترقیق $n=1$).

ج- فعال سازی گرانول های کادمیوم:

تعداد گرانول‌های مورد استفاده برای هر نمونه ۳ عدد بود. این گرانول‌ها در یک لوله سانتریفوژ $50 \mu\text{l}$ میلی‌لیتری سه بار با $50 \mu\text{l}$ میلی‌لیتر آب مقطر شسته شده و آب مربوطه با پیست از لوله خارج می‌گردید. سپس، گرانول‌ها با $50 \mu\text{l}$ میلی‌لیتر استات مس ۵ درصد شسته می‌شد، تا بدین وسیله پوششی از مس بر روی گرانول‌ها تشکیل شود. عمل شست و شو با محلول استات مس دو الی سه بار صورت می‌گرفت تا محلول بالای گرانول‌های کادمیوم آبی رنگ شود در این حالت اطمینان حاصل می‌شد که گرانول‌های کادمیوم از مس اشباع شده است. زمانی که گرانول‌های کادمیوم از مس اشباع می‌شد، مس اضافه از طریق شست و شو با $25 \mu\text{l}$ میلی‌لیتر آب خارج می‌گردید. مدت زمان پایداری گرانول‌های کادمیوم فعال شده ۲۰ دقیقه بود. بنابراین گرانول‌های حاصل در مدت ۲۰ دقیقه مورد استفاده قرار می‌گرفت. در صورت نگهداری طولانی مدت آن، گرانول‌های کادمیوم فعال شده ابتدا با $30 \mu\text{l}$ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال شست و شو و سپس در اسید کلریدریک نگهداری می‌شد (۱۲).

د- احیاء نیترات و اضافه کردن معرف ها :

گرانول‌های کادمیوم فعال شده ابتدا با کاغذ صافی خشک و سپس سه عدد از آن به هر نمونه مورد آزمایش اضافه می‌شد. بلافاصله، لوله‌ها تکان داده شده و در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه پروراندن می‌شد. پس از این مرحله، $500 \mu\text{l}$ نمونه پروتئین زدایی شده با $250 \mu\text{l}$ میکرولیتر محلول سولفونیل آمید (۱ درصد وزنی) حجمی در اسید کلریدریک ۳ نرمال) مخلوط می‌گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق نگهداری

می‌شد. پس از ۱۰ دقیقه، $250 \mu\text{l}$ محلول نفتیل اتیلن دی آمین دی هیدروکلراید به همه لوله‌ها اضافه می‌شد تا رنگ قرمز ارغوانی ایجاد شود. پس از گذشت ۱۰ دقیقه، محلول‌ها به داخل Cuvet ریخته شده و جذب آن با استفاده از یک دستگاه طیف سنج (Apel Spectrophotometer PD-303S, Japan) در طول موج 540 nm نانومتر ثبت می‌گردید. برای تعیین غلظت نیتریک اکساید (μM) از فرمول زیر استفاده می‌شد:

$$\text{فاکتور ترقیق (x n)} = \frac{\text{جذب بلانک} - \text{جذب در نمونه}}{\text{شیب منحنی استاندارد}} = \text{غلظت نیتریک اکساید}$$

تجزیه و تحلیل آماری:

داده‌ها توسط نرم‌افزار کامپیوتری RAPHPAD ($V2.01^+$) و با استفاده از آزمون‌های آنالیز واریانس (ANOVA) و Student-Newman-Keuls پردازش شد. تفاوت با ارزش $p < 0.05$ در هر نقطه از نظر آماری معنی‌دار تلقی گردید.

یافته ها

اثر ال-آرژینین بر انتقال عصبی-عضلانی عضله دو بطنی گردنی جوجه:

در ظرف (Vessel) عضله دو بطنی گردنی جوجه غلظت‌های تجمعی $50, 200, 150, 100$ و 250 میکروگرم/میلی لیتر ال-آرژینین ایجاد گردید تا اثر آن بر روی حرکت کششی (Twitch) ناشی از تحریک الکتریکی غیرمستقیم و انقباض (Contracture) ناشی از استیل کولین خارجی (Exogen) مورد بررسی قرار گیرد. در این شرایط، ال-آرژینین پاسخ حرکت کششی را به میزان ۲۰ درصد و پاسخ انقباضی را به میزان ۴۵ درصد مهار کرد (شکل‌ها نشان داده نشده است). ال-آرژینین پاسخ انقباضی ناشی از استیل کولین خارجی را به طور برجسته‌تری نسبت به پاسخ حرکت کششی مهار کرد. در این راستا، غلظت

منحنی پاسخ وابسته به میزان کرباکول در حضور غلظت ۵۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر ال-آرژینین به سمت راست تغییر پیدا نمود. در غلظت بالاتر (1000 میکروگرم/ میلی لیتر)، ال-آرژینین به طور برجسته‌ای منحنی پاسخ وابسته به میزان کرباکول را با کاهش سقف اثر به سمت راست منتقل کرد (شکل شماره ۳).

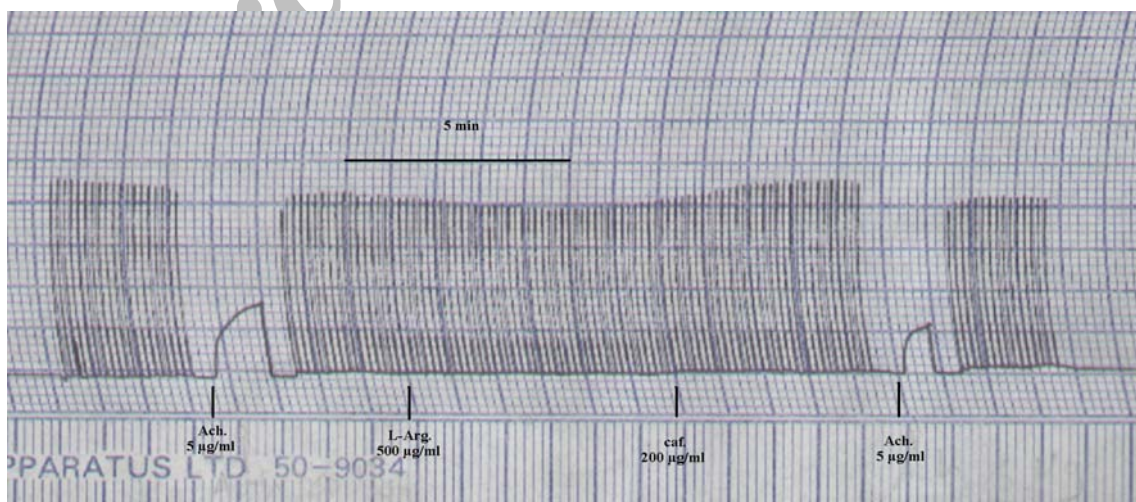
ال-آرژینین و غلظت نیتريت موجود در هموژنات عضله دوبطنی گردنی جوجه:

معادله خط منحنی استاندارد نیتريت که حاصل از میانگین ۳ جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر است، به صورت $Y = 0.0231 + 0.029X$ $R^2 = 0.9986$ محاسبه گردید. بر طبق معادله خط مذکور، سطح نیتريت موجود در هموژنات عضله دوبطنی گردنی جوجه، به طور وابسته به غلظت در حضور ال-آرژینین افزایش یافت ($P < 0.001$). در این راستا، غلظت ۱۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر ال-آرژینین بی اثر و غلظت ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر ال-آرژینین، به طور معنی دار سطح نیتريت موجود در هموژنات عضله دو بطنی گردنی جوجه را افزایش دادند (شکل شماره ۴ و جدول شماره ۱).

۵۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر ال-آرژینین پاسخ انقباضی را به میزان ۵۰ درصد و غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر ال-آرژینین پاسخ انقباضی را به میزان ۵۵ درصد کاهش داد. اثر مهاری ال-آرژینین (۵۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر ال-آرژینین) بر پاسخ حرکت کششی ناشی از تحریک الکتریکی غیرمستقیم در غلظت ۲۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر کافئین مقابله شد ولی اثر مهاری ال-آرژینین (۵۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر ال-آرژینین) بر انقباض ناشی از استیل کولین خارجی تحت تاثیر کافئین (۲۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر) قرار نگرفت (شکل شماره ۱).

پاسخ وابسته به میزان استیل کولین و کرباکول در حضور ال-آرژینین:

منحنی پاسخ وابسته به میزان استیل کولین در حضور غلظت ۵۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر ال-آرژینین، بدون تغییر معنی دار سقف اثر به سمت راست تغییر پیدا نمود. در غلظت بالاتر (۱۰۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر)، ال-آرژینین منحنی پاسخ وابسته به میزان استیل کولین را با کاهش سقف اثر به سمت راست منتقل کرد (شکل شماره ۲).

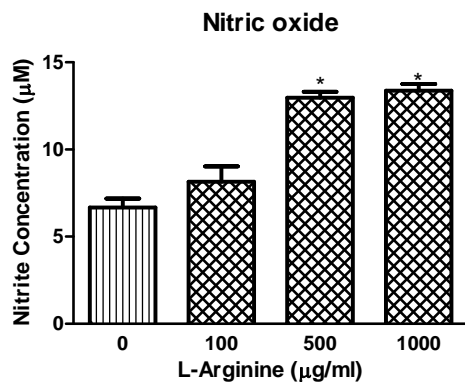


شکل شماره ۱: اثر L-آرژینین (500 µg/ml) و کافئین (200 µg/ml) بر حرکت کششی حاصل از تحریک غیر مستقیم الکتریکی و انقباض حاصل از استیل کولین آگروژن (5 µg/ml).

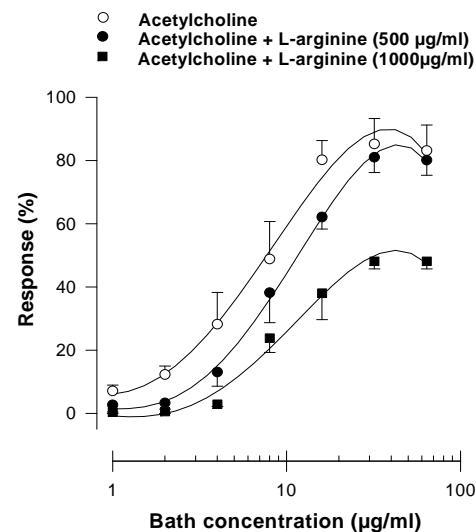
جدول شماره ۱: غلظت نیتريت موجود در هموژنات عضله دوبطنی گردنی در حضور غلظت های مختلف ال-آرژینین.

ال-آرژینین ($\mu\text{g/ml}$)	لوله سانتریفوژ	جذب (۵۴۰ نانومتر)	میانگین غلظت نیتريت \pm خطای معیار (μM)
۰	A4, A5, A6	۰/۲۱۵، ۰/۲۴۵، ۰/۱۹۱	۰/۵ \pm ۶/۷
۱۰۰	B4, B5, B6	۰/۳۱، ۰/۲۴۱، ۰/۲۲۷	۰/۹ \pm ۸/۱۴
۵۰۰	C4, C5, C6	۰/۴۱، ۰/۳۸۱، ۰/۴۰۱	* ۰/۳۳ \pm ۱۲/۹۷
۱۰۰۰	D4, D5, D6	۰/۴۲۱، ۰/۴۲۳، ۰/۳۹	* ۰/۳۸ \pm ۱۳/۴

$P < 0.001$ * تفاوت از کنترل را نشان می دهد.



شکل شماره ۴: غلظت نیتريت هموژنات عضله دوبطنی گردنی جوجه در حضور غلظت های مختلف ال-آرژینین. نتایج مربوط به میانگین \pm خطای معیار سه جذب می باشد (معنی دار بودن $P < 0.001$).

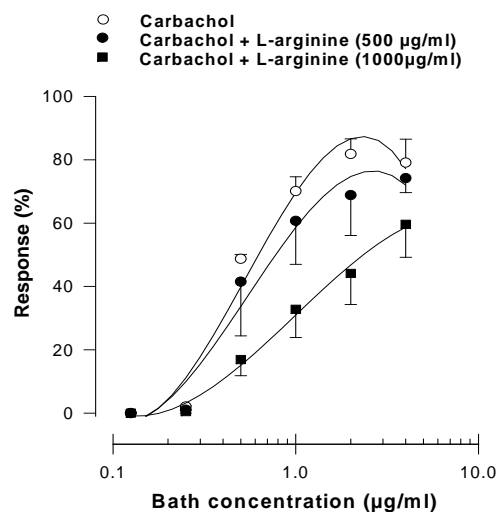


شکل شماره ۲: منحنی پاسخ وابسته به میزان استیل کولین در حضور ال-آرژینین. نتایج (میانگین \pm خطای معیار) از ۴ عضله دو بطنی گردنی جوجه به دست آمده است.

بحث

در این مطالعه، اثر ال-آرژینین بر انتقال عصبی-عضلانی عضله دو بطنی گردنی جوجه مورد بررسی قرار گرفت. تحریکات الکتریکی غیر مستقیم با مشخصات فرکانسی ۰/۱ هرترتز، ولتاژ ۵ الی ۱۰ ولت و مدت زمان تحریک ۰/۵ میلی ثانیه، حرکت کششی (twitch) ایجاد می کند که ناشی از آزاد شدن استیل کولین از پایانه های اعصاب حرکتی و تحریک گیرنده های نیکوتینی عضله اسکلتی است (۱۳).

ال-آرژینین در محدوده غلظتی ۵۰ الی ۱۰۰۰ میکروگرم/میلی لیتر حرکت کششی ناشی از تحریک الکتریکی غیر مستقیم را به صورت گذرا مهار کرد. اثر مهاری ال-آرژینین بر پاسخ انقباضی (Contracture)



شکل شماره ۳: منحنی پاسخ وابسته به میزان کرباکول در حضور ال-آرژینین. نتایج (میانگین \pm خطای معیار) از ۴ عضله دو بطنی گردنی جوجه به دست آمده است.

برجسته تر بود. تکنیک طیف سنجی رنگ نیتریک اکساید نشان داد که عملکرد مهاری ال-آرژنین در غلظت های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم/میلی لیتر به تولید نیتریک اکساید وابسته است. این یافته ها، دخالت مکانیسم های پس سیناپسی، ثانویه به تولید نیتریک اکساید در عملکرد مهاری ال-آرژنین را نشان می دهد. در مطالعه حاضر، غلظت ۵۰۰ میکرولیتر/ میلی لیتر ال-آرژنین، منحنی های پاسخ وابسته به میزان استیل کولین و کرباکول را بدون کاهش سقف اثر، به سمت راست منتقل کرد، که پیشنهاد کننده نوعی ضدیت رقابتی می باشد. علاوه بر این، منحنی های پاسخ وابسته به میزان استیل کولین و کرباکول در حضور غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم/میلی لیتر نیز به سمت راست منتقل گردید ولی این انتقال با کاهش سقف اثر همراه بود. این یافته پیشنهاد کننده نوعی ضدیت غیر رقابتی است.

مطالعات صورت گرفته نشان داده است که نیتریک اکساید در جفت سازی (coupling) تحریک- انقباض عضله اسکلتی مانند انتقال سیگنال گیرنده، فعالیت کانال کلسیمی نوع L، آزاد شدن کلسیم از رتیکولوم سارکوپلاسمیک و تنفس میتوکندریایی نقش دارد (۸). علاوه بر این، مشخص شده است که مهارکننده های نیتریک اکساید سنتاز یا دهنده های نیتریک اکساید می توانند به ترتیب فعالیت آزاد سازی کلسیم در هموژنات عضله اسکلتی یا حفرات جدا شده رتیکولوم سارکوپلاسمیک را افزایش یا کاهش دهند (۹، ۱۰). نتایج مطالعات Kobzik (۱۹۹۴) و Reid (۱۹۹۸) نیز نشان داده است که دهنده های نیتریک اکساید و گوانوزین مونو فسفات حلقوی (cGMP) می توانند عملکرد انقباضی عضله اسکلتی را تضعیف کنند در صورتی که مهار نیتریک اکساید سنتاز، شلاتاسیون نیتریک اکساید خارج سلولی و مهار گوانیل لیل سیکلاز عملکرد انقباضی عضله اسکلتی را افزایش می دهند (۱۴، ۱۵). Gath و همکاران

(۱۹۹۶) نیز گزارش کرده اند که نیتریک اکساید تولید شده توسط نیتریک اکساید سنتاز می تواند پاسخ انقباضی عضله اسکلتی را تعدیل کند. علاوه بر این، نیروی انقباضی عضله با ظهور (expression) نیتریک اکساید سنتاز کاهش و با مهار فعالیت نیتریک اکساید سنتاز افزایش می یابد (۱۶). این نتایج در مطالعات Kobzik (۱۹۹۴) و Balon (۱۹۹۴) نیز تأیید شده است؛ به طوری که نشان داده اند تحریکات الکتریکی مکرر عضله اسکلتی تولید نیتریک اکساید را افزایش می دهد (۱۴، ۱۷). نتایج مطالعات فوق، بیانگر نقش مهاری نیتریک اکساید بر انتقال عصبی- عضلانی و تولید نیرو در عضلات اسکلتی، ثانویه به تغییر جفت سازی تحریک- انقباض می باشد. این نتایج با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد. مکانیسم های مختلفی برای توصیف عملکرد نیتریک اکساید سنتاز در عضلات اسکلتی پیشنهاد شده است. به طور مثال، نیتریک اکساید سنتاز متابولیسم عضله اسکلتی را با افزایش انتقال گلوکز افزایش می دهد. علاوه بر این، نیتریک اکساید غلظت داخل سلولی کلسیم را تنظیم کرده و آزاد شدن کلسیم از رتیکولوم سارکوپلاسمیک را تعدیل می کند (۱۶، ۱۷).

اثر مهاری نیتریک اکساید بر کانال های کلسیمی (۱۰، ۱۶، ۱۷)، پیش بینی کننده اثر مقابله ای کافئین بر عملکرد مهاری ال-آرژنین می باشد. در ارزیابی صحت این فرضیه، اثر کافئین بر عملکرد مهاری ال-آرژنین در عضله دو بطنی گردنی جوجه مورد بررسی قرار گرفت. کافئین یک متیل گزانتین است که از طریق آزادسازی یون های کلسیم از کانال های کلسیمی رتیکولوم سارکوپلاسمیک، سطح کلسیم سیتوزولی را برای انقباض عضله اسکلتی افزایش می دهد (۱۸). در مطالعه حاضر، اثر مهاری ال-آرژنین بر عملکرد انقباضی عضله دو بطنی گردنی جوجه در حضور کافئین مقابله شد. این یافته پیشنهاد کننده دخالت مکانیسم های مرتبط با

کانال‌های کلسیمی در اثر مهارى ال-آرژنین می‌باشد. نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعات مختلف همخوانی دارد. به طور مثال، مشخص شده است که تجویز مقدار واحد کافئین می‌تواند ظهور (expression) نیتریک اکساید سنتاز را مهار و نیروی انقباضی عضله را افزایش دهد (۱۹). Meszaros و همکاران (۱۹۹۶) نشان داده‌اند که S- نیتروزو-N- استیل - پنی سیلامین (یک دهنده نیتریک اکساید) می‌تواند اثر القایی کافئین در آزادسازی کلسیم از حفرات رتیكولوم سارکوپلاسمیک جدا شده عضلات اسکلتی را کاهش دهد (۹). مطالعه Corsett و همکاران (۲۰۰۷) نیز نشان داده است، که تجویز مقدار واحد کافئین می‌تواند ظهور (expression) نیتریک اکساید سنتاز را مهار و نیروی انقباضی عضله اسکلتی را از طریق تعدیل تولید نیتریک اکساید افزایش دهد (۱۹). در این راستا، مشخص شده است که نیتریک اکساید سنتاز تنفس میتوکندریایی عضله اسکلتی را مهار می‌کند و این اثر توسط کافئین مقابله می‌شود (۲۰).

به طور طبیعی، در عضلات اسکلتی ظهور (expression) نیتریک اکساید سنتاز نوع nNOS و eNOS وجود دارد. (۷،۴). مطالعات قبلی نشان داده است که سطوح nNOS و eNOS با فعالیت اکسیداتیو فیبرهای عضلانی همراه است. این آنزیم‌ها به همراه نشانگرهای میتوکندریایی در مجموعه‌ای از فیبرهای عضلانی موضع می‌گیرند که غنی از میتوکندری هستند. این مطلب نقش فونکسیون فعالیت اکسیداتیو nNOS و eNOS را در فیبرهای غنی از میتوکندری نشان می‌دهد (۲۰، ۱۹). مطالعه Corsett و همکاران (۲۰۰۷) نشان داده است که eNOS و nNOS به طور ذاتی در فیبرهای سریع منقبض شونده عضله چهار سر موش و موش صحرائی، تظاهر می‌یابد، ولی این اثر توسط کافئین مهار می‌گردد. این یافته، نقش مهم nNOS و eNOS را در فیزیولوژی فیبرهای عضلانی

پستانداران نشان می‌دهد (۱۹). یافته‌های مربوط به iNOS کمی متفاوت است. در حقیقت، iNOS یک آنزیم غیر وابسته به کلسیم است و فعالیت متغیری در عضلات اسکلتی دارد (۲۱). مطالعه ایمنی - سلولی - شیمیایی Stamler و Meissner (۲۰۰۱)، هیچ نشانی از iNOS در عضلات اسکلتی موش صحرائی نشان نداده است (۷). در صورتی که Thompson و همکاران (۱۹۹۶) نشان داده‌اند که در عضله اسکلتی تحت تنش، تولید iNOS القاء می‌شود (۲۲). Gath و همکاران (۱۹۹۶) نیز نشان داده‌اند که iNOS می‌تواند در عضله ساق پا کوچک هندی تظاهر یابد ولی تولید آن در فیبرهای عضلانی نوع I تحریک نمی‌شود. نیتریک اکساید حاصل از فعالیت iNOS می‌تواند پاسخ انقباضی را تعدیل کند. بنابراین، افزایش ظهور آنزیم iNOS موجب کاهش نیروی انقباضی عضله و کاهش فعالیت iNOS موجب افزایش نیروی انقباضی عضله می‌شود (۱۶). iNOS به طور متغیری در سارکوپلاسم بعضی از فیبرهای عضلانی خصوصاً فیبرهای آهسته منقبض شونده توزیع شده است و ظهور آن به طور موقت و زودگذر توسط کافئین مهار می‌شود. بنابراین نحوه پاسخ دهی فیبرهای عضلانی به کافئین، تا حدی به تنوع ایزوفرم‌های نیتریک اکساید سنتاز عضله بستگی دارد. در این راستا، نتایج مطالعه Corsetti و همکاران (۲۰۰۷) نشان داده است که در عضلات اسکلتی، مهار نیتریک اکساید سنتاز عصبی و اندوتلیالی (nNOS و eNOS) القاء شده با کافئین بسیار سریع و برگشت پذیر می‌باشد (۱۹). نتایج مطالعات فوق، با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد؛ به طوری که کافئین اثر مهارى ال-آرژنین بر پاسخ حرکت کششی ناشی از تحریک الکتریکی فیبرهای عضلانی سریع منقبض شونده را خنثی کرد، ولی اثر مهارى ال-آرژنین بر پاسخ انقباضی فیبرهای آهسته منقبض شونده را تحت تاثیر قرار نداد. اهمیت فیزیولوژیک این یافته به

سنتاز می تواند به عنوان یکی از مکانیسم های اثر کافئین در افزایش قابلیت ورزشی تلقی شود و به قسمی، نقش فرینده (Duping) کافئین (۲۳) در فعالیت ورزشی را توضیح می دهد.

خوبی مشخص نیست. ولی می توان استنتاج نمود که مصرف کافئین برخلاف مصرف فرآورده های حاوی ال-آرژینین، می تواند از طریق مهار نیتریک اکساید سنتاز، تنفس عضلانی را بهبود و نیروی عضله را افزایش دهد. به عبارت دیگر، مهار نیتریک اکساید

References

1. Khanna A, Prudence A. Nitric oxide and skeletal muscle reperfusion injury. *J Surg Res* 2005; 128: 98-107.
2. Moncada S, Palmer R.M.J, Higgs E.A. Nitric oxide physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-142.
3. Pollock J.S, Forstermann U, Tracey W.R, Nakane M. Nitric oxide synthase isozymes antibodies. *Histochem J* 1995; 27: 738-744.
4. Maréchal G, Gailly P. Effects of nitric oxide on the contraction of skeletal muscle. *Cell Mol Life Sci (CMLF)* 1999; 55: 1088-1102.
5. Park K.G.M, Hayes P.D, Garlick P.J. Stimulation of lymphocyte natural cytotoxicity by L-arginine. *Lancet* 1991; 337: 645-646.
6. Chen J, Wollman Y, Chernichovsky T. Effect of oral administration of high-dose nitric oxide donor L-arginine in men with organic erectile dysfunction: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *B J U Int* 1999; 83: 269-273.
7. Stamler J.S, Meissner G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol Res* 2001; 81: 209-237.
8. Hare J.M. Nitric oxide and excitation-contraction coupling. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35: 719-729.
9. Meszaros L.G, Minarovic I, Zahradnikova A. Inhibition of the skeletal muscle ryanodine receptor calcium release channel by nitric oxide. *FEBS Lett* 1996; 380: 49-52.
10. Zahradnikova A, Minarovic I, Venema R, Meszaros J.G. Inactivation of the cardiac ryanodine receptor calcium release channel by nitric oxide. *Cell Calcium* 1998; 21: 447-454.
11. Perry W.L.M. *Pharmacological experiments on isolated preparations*. Edinburgh Great Britain. E & S Livingstone, 1971: 54-56.
12. Ridnour L.A, Sim J.E, Hayward M.A, Wink D.A, Martin S.M, Buettner G.R, Spitz D.R. A Spectrophotometric method for the direct detection and quantitation of nitric oxide, nitrite, and nitrate. *Anal Biochem* 2000; 281: 223-229.

13. Ginsborg B.L. Some properties of avian skeletal muscle fibers with multiple neuromuscular junction. *J Physiol* 1960; 154: 581-598.
14. Kobzik L, Reid M.B, Bredt D.S, Stamler J.S. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* 1994; 372: 546-548.
15. Reid M.B. Role of nitric oxide in skeletal muscle: synthesis, distribution and functional importance. *Acta Physiol Scand* 1998; 162: 401-409.
16. Gath I, Closs E.I, Godtel-Armbrust U, Schmitt S.M, Nakane M, Wessler, I. Inducible NO synthase II and neuronal NO synthase I are constitutively expressed in different structures of guinea pig skeletal muscle: implications for contractile function. *FASEB* 1996; 10: 1614-1620.
17. Balon T.W, Nadler J.L. Nitric oxide release is present from incubated skeletal muscle preparation. *J Appl Physiol* 1994; 77: 2519-2521.
18. Katz A.M, Repke D.I, Hasselbach W. Dependence of ionophore- and caffeine-induced calcium release from sarcoplasmic reticulum vesicles on external and internal calcium ion concentrations. *J Biol Chem* 1977; 252: 1938-1949.
19. Corsetti G, Pasini E, Assanelli D, Saligari E, Adobati M, Bianchi R. Acute caffeine administration decreased NOS and Bcl2 expression in rat skeletal muscles. *Pharmacol Res* 2007; 55: 96-103.
20. Kobzik L, Stinger B, Balligand J.L, Reid M.B, Stamler J.S. Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibres: mitochondrial relationship. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 211:375-381.
21. Forstermann U, Gath I, Schwartz P, Closs E.L, Kleinert H. Isoforms of nitric oxide synthase-properties, distribution and expressional control. *Biochem Pharmacol* 1995; 50: 1321-1332.
22. Thompson M, Becker L, Bryant D, Williams G, Levin D, Margraf L. Expression of the inducible nitric oxide synthase gene in diaphragm and skeletal muscle. *J Appl Physiol* 1996; 81: 2415-2420.
23. Doherty M, Smith P.M. Effects of caffeine ingestion on rating of perceived exertion during and after exercise: a meta-analysis. *Scand J Med Sci Sports* 2005; 15: 69-78.