پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره هجدهم شماره ۶۴ خرداد و تیر سال ۱۳۸۷ (۲۱-۱۱)

اثر L-آرژینین بر انتقال عصبی- عضلانی عضله دوبطنی 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-آرژینین به سیترولین 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- آرژینین در برخوردگاه عصبی- عضلانی عضله دو بطنی گردنی جوجه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها : عضله دوبطنی 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 تیرود 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، نیتریت و نیترات در هموژنات عضله دوبطنی گردنی جوجه اندازه‌گیری گردید. غلظت نیتریت تام (نیتریت+ نیترات)، پس از تبدیل کامل نیترات به نیتریت با گرانول‌های کادمیوم اشباع شده با مس، توسط یک طیف سنج در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها : ال- آرژینین 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- آرژینین درغلظت ۱۰۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر منجر به چرخش به راست برجسته همراه با کاهش سقف اثر برای منحنی‌های وابسته به میزان استیل کولین یا کرباکول شد. اثر مهاری ال- آرژینین بر پاسخ حرکت کششی توسط کافئین (۲۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر) مسدود گردید. سطح نیتریک اکساید نیز به طور معنی‌داری در غلظت های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر ال-آرژینین درمقایسه با گروه شاهد افزایش یافت.

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

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

+ **مولف 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 هئیت علمی انستیتو پاستور ایران

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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-19]

www.SID.ir

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 می‌کند(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(۲تا۴).

نیتریک اکساید از اکسیداسیون گروه گوانیدین ال-آرژنین منشا می‌گیرد. ال-آرژنین یکی از بیست اسید آمینه موثر در ساخت پروتئین‌ها می‌باشد. این اسید آمینه نقش مهمی در واکنش‌های فیزیولوژیک و متابولیکی در بدن دارد. ال-آرژنین در ترشح انسولین، گلوکاگن، هورمون رشد و پرولاکتین نقش دارد. علاوه بر این، ال-آرژنین واجد اثرات آنتی اکسیدانتی و تقویت‌کنندگی سیستم ایمنی می‌باشد(۵). ال-آرژنین 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- آرژنین سوبسترای آنزیم نیتریک اکساید سنتاز می‌باشد و توسط این آنزیم به سیترولین و نیتریک اکساید تبدیل می‌شود. نیتریک اکساید سنتاز در غشا سیتوپلاسمایی، سیتوپلاسم، هسته، شبکه آندوپلاسمیک خشن و میتوکندری‌ها یافت می‌شود. نیتریک اکساید سنتاز سه ایزوفرم 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 می‌شود) و نوع ۳ یا eNOS (نیتریک اکساید سنتاز سلول‌های اندوتلیالی) دارد(۷). هر سه ایزوفرم نیتریک اکساید سنتاز در عضله اسکلتی یافت می‌شوند. مهم‌ترین نیتریک اکساید سنتاز موجود در عضلات اسکلتی، nNOS می‌باشد. این ایزوفرم در تمام عضلات اسکلتی پستانداران به ویژه در صفحه انتهایی عضله وجود دارد. میزان و محل استقرار ایزوفرم 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 ایزوفرم‌های متعدد نیتریک اکساید سنتاز در بافت عضلات اسکلتی، نقش بسیار مهم نیتریک اکساید در تنظیم متابولیسم و کارایی عضله را نشان می‌دهد. در حقیقت، نیتریک اکساید می‌تواند 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، N (G)-نیترو-ال-آرژنین متیل استر (NAME ، مهارکننده نیتریک اکساید سنتاز) می‌تواند فعالیت آزادسازی کلسیم در هموژنات عضله اسکلتی را افزایش و S-نیتروزو-N-استیل پنی سیلامین (SNAP، دهنده نیتریک اکساید) می‌تواند آزاد سازی کلسیم در حفرات (Vesicle) مجرای رتیکولوم سارکوپلاسمیک را کاهش دهد(۹،۱۰). چنین مطالعاتی برای ال-آرژنین موجود نیست ولی پیش بینی می‌شود که ال-آرژنین نیز بتواند عملکرد انقباضی عضله اسکلتی را تغییر دهد. این مطالعه به منظور بررسی اثر ال-آرژنین بر عملکرد انقباضی عضله اسکلتی طراحی و اجرا شده است. بررسی اثر ال- آرژنین بر انتقال عصبی- عضلانی عضله دوبطنی گردنی جوجه می تواند درک بهتری از نقش فیزیولوژیک نیتریک اکساید در عضلات اسکلتی ارائه دهد. عضله دوبطنی گردنی

Archive of SID

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-19]

www.SID.ir

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 می‌آید) و تحریک فیبرهای آهسته منقبض شونده با استیل کولین خارجی (Exogen) پاسخ انقباضی (Contracture) ؛ مانند پاسخ انقباضی آهسته در عضله اسکلتی قورباغه ایجاد می‌کند(۱۱). این دو پاسخ می‌تواند 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)، نیتریت سدیم (Merck,Germany)، سولفونیل آمید(Cayman Chemicals, USA) ، نفتیل اتیلن دی‌آمین دی هیدروکلراید(Cayman Chemicals, USA)، سولفات روی (Merck,Germany)، استات مس (Merck, Germany)، گرانول کادمیوم (Aldrich,USA)، کلرید سدیم (Merck, Germany)، کلرید پتاسیم (Merck,Germany) ، سولفات منیزیوم (Merck,Germany)، سدیم دی هیدروژن فسفات (Merck,Germany) ، گلوکز (Merck,Germany) ، بی‌کربنات سدیم (Merck,Germany)، کلرید کلسیم (Merck, Germany).

محلول تیرود:

برای تهیه ۱۰ لیتر محلول تیرود، مواد زیر به ترتیب در آب مقطر حل و به حجم می‌رسید:

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

معرف‌ها ومحلول‌های لازم برای تعیین طیف سنجی NO:

محلول نیتریت 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 هیدروکلراید ۰/۱ درصد وزنی/ حجمی در آب)، محلول ZnSO4 (۷۵ mM)، محلول NaOH (۵۵mM)، بافر گلیسین- NaoH (pH ۹/۷) ، بافر فسفات (pH ۷/۴) ، محلول استات مس ۵ درصد، گرانول‌های کادمیوم (۱۰۰ مش و یا ۰/۲ گرم). معرف A، معرف B و محلول نیتریت در درجه حرارت ۴ درجه سانتیگراد و دیگر مواد در درجه حرارت اتاق قابل نگهداری می‌باشند.

عضله دو بطنی گردنی جوجه:

عضله دوبطنی 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 می‌شد(۱۱). جهت حفظ سلامتی عضله و برقراری شرایط فیزیولوژیک، محلول تیرود ۳۷ درجه سانتی‌گراد به همراه اکسیژن وارد ظرف حاوی عضله می‌گردید. 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 می‌شد. پاسخ حرکت کششی حاصل توسط دستگاه

Archive of SID

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-19]

www.SID.ir

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

اندازه گیری نیتریک اکساید به روش رنگ سنجی:

روش‌های ساده و مستقیم سنجش نیتریک اکساید در تحقیقات فیزیولوژیک و داروشناختی رایج‌تر و مقبول‌تر هستند. اساس بیش‌تر این روش‌ها، اندازه‌گیری کمی غلظت تام NO^{2-}/NO^{3-} در نمونه می‌باشد. این غلظت می‌تواند به‌عنوان شاخصی در تعیین سطح نیتریک اکساید مورد استفاده قرار گیرد. در روش حاضر، اندازه‌گیری تولید نیتریک اکساید براساس روش اصلاح شده Griess صورت گرفت. در این روش، ابتدا تمامی نیترات موجود در نمونه به نیتریت احیاء و سپس میزان نیتریت با استفاده از تکنیک رنگ سنجی مربوط به معرف‌های 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 نیترات به نیتریت در آن ۱۵ دقیقه می‌باشد(۱۲).

الف- منحنی استاندارد نیتریت:

۲۴ لوله سانتریفوژ یک و نیم میلی‌لیتری در سه ستون ۸ ردیفه چیده شد. به سه لوله ردیف اول (ردیف A) ۱۰۰۰ µl از محلول نیتریت ۱۰۰ µM اضافه شد. از ردیف دوم تا آخرین ردیف (B- H)، به سه لوله از هر ردیف ۵۰۰ µl بافر فسفات افزوده شد. برای عمل ترقیق، از لوله‌های ردیف A ۵۰۰ µl محلول برداشته وارد لوله‌های ردیف دوم شد تا حجم آن ۱۰۰۰ µl شود. سپس از این لوله‌ها نیز ۵۰۰ µl برداشته و به لوله‌های ردیف سوم اضافه شد. این عمل تا لوله‌های ردیف یکی مانده به آخر (ردیف G) تکرار شد. در این راستا، ۵۰۰ µl محلول آخر که در پیپت موجود بود، دور ریخته می‌شد. بدین ترتیب، غلظت نیتریت در لوله های ردیف A تا G برابر با ۱۰۰ µM و ۵۰ µM و ۲۵ µM و ۱۲/۵ µM و ۶/۲۵ µM و ۳/۱۲۵ µM و ۱/۵۶ µM می‌گردید. سه لوله ردیف H که حاوی ۵۰۰ µl بافر بود، به عنوان خالی (Blank) در نظر گرفته می‌شد. پس از این مراحل، ۲۵۰ µl محلول سولفونیل آمید به همه لوله‌ها اضافه و محلول‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در حرارت اتاق نگهداری می‌شدند. پس از ۱۰ دقیقه، ۲۵۰ µl 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 سنجی در طول موج ۵۴۰ نانومتر ثبت می‌گردید. برای محاسبه معادله خط از میانگین سه جذب استفاده شد.

ب- آماده سازی نمونه مورد آزمایش:

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

Archive of SID

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-19]

www.SID.ir

حاصل می‌شد که ۲۱۰ µl از آن با ۷۰ µl بافر گلیسین در لوله‌های سانتریفوژ یک و نیم میلی‌لیتری مخلوط می‌گردید (فاکتور ترقیق ۱ =n).

ج- فعال سازی گرانول های کادمیوم:

تعداد گرانول‌های مورد استفاده برای هر نمونه ۳ عدد بود. این گرانول ها در یک لوله سانتریفوژ ۵۰ میلی‌لیتری سه بار با ۵۰ میلی لیتر آب مقطر شسته شده و آب مربوطه با پیپت از لوله خارج می گردید. سپس، گرانول‌ها با ۵۰ 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. زمانی‌که گرانول‌های کادمیوم از مس اشباع می‌شد، مس اضافه از طریق شست و شو با ۲۵ 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 ۳۰ 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 پرورانده می‌شد. پس از این مرحله، ۵۰۰ µl نمونه پروتئین زدایی شده با ۲۵۰ میکرولیتر محلول سولفونیل آمید (۱ درصد وزنی/ حجمی در اسید کلریدریک ۳ نرمال) مخلوط می گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق نگهداری می‌شد. پس از ۱۰ دقیقه، ۲۵۰ µl 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 ۵۴۰ نانومتر ثبت می گردید. برای تعیین غلظت نیتریک اکساید (µ M) از فرمول زیر استفاده می‌شد:

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

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-آرژنین بر انتقال عصبی-عضلانی عضلهٔ دو بطنی گردنی جوجه:

در ظرف (Vessel) عضلهٔ دو بطنی گردنی جوجه غلظت‌های تجمعی ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میکروگرم/ میلی لیتر ال-آرژنین ایجاد گردید تا اثر آن بر روی حرکت کششی (Twitch) ناشی از تحریک الکتریکی غیرمستقیم و انقباض(Contracture) ناشی‌از استیل‌کولین خارجی(Exogen) موردبررسی قرارگیرد. دراین شرایط، ال-آرژنین پاسخ حرکت کششی را به میزان ۲۰ درصد و پاسخ انقباضی را به میزان ۴۵ درصد مهارکرد (شکل‌ها نشان داده نشده است). ال-آرژنین پاسخ انقباضی ناشی از استیل کولین خارجی را به طور برجسته‌تری نسبت به پاسخ حرکت کششی مهار کرد. در این راستا، غلظت

Archive of SID

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-19]

www.SID.ir

۵۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر ال-آرژنین پاسخ انقباضی را به میزان ۵۰ درصد وغلظت۱۰۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر ال-آرژنین پاسخ انقباضی را به میزان ۵۵ درصد کاهش داد. اثرمهاری ال-آرژنین (۵۰۰ میکرو گرم/ میلی لیتر ال-آرژنین) بر پاسخ حرکت کششی ناشی از تحریک الکتریکی غیرمستقیم در غلظت ۲۰۰ میکروگرم/میلی لیتر کافئین مقابله شد ولی اثر مهاری ال-آرژنین (۵۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر ال-آرژنین) بر انقباض ناشی از استیل کولین خارجی تحت تاثیر کافئین (۲۰۰ میکرو گرم/ میلی لیتر) قرارنگرفت (شکل شماره۱).

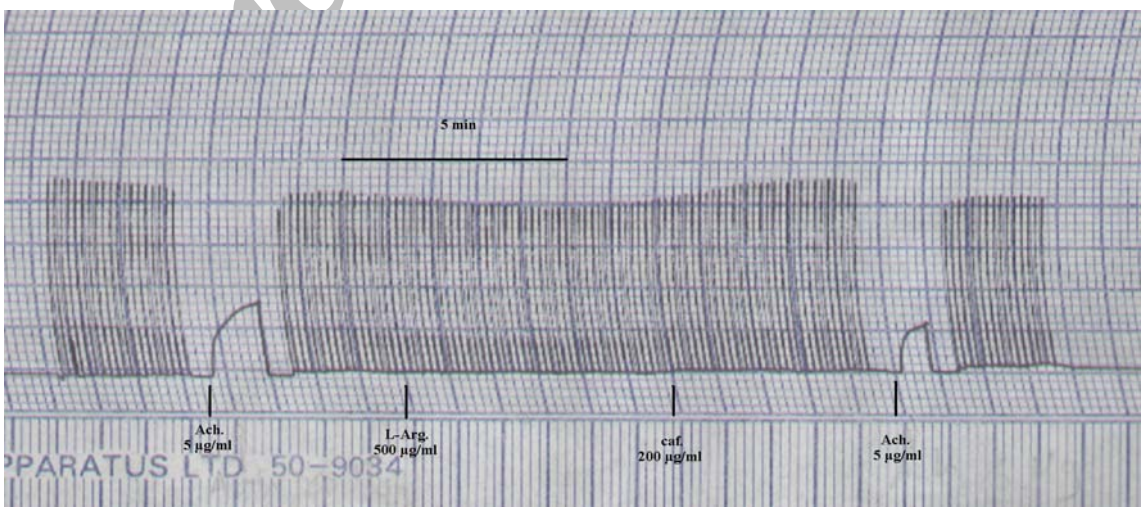
پاسخ وابسته به میزان استیل کولین و کرباکول در حضور ال-آرژنین:

منحنی پاسخ وابسته به میزان استیل‌کولین درحضور غلظت ۵۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر ال- آرژنین، بدون تغییرمعنی‌دارسقف اثر به‌سمت راست تغییر پیدا نمود. در غلظت بالاتر (۱۰۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر)، ال-آرژنین منحنی پاسخ وابسته به میزان استیل کولین را با کاهش سقف اثر به سمت راست منتقل کرد (شکل شماره ۲).

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

ال-آرژنین و غلظت نیتریت موجود در هموژنات عضله دوبطنی گردنی جوجه:

معادله خط منحنی استاندارد نیتریت 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 نیتریت موجود در هموژنات عضله دوبطنی گردنی جوجه، به‌طور وابسته به غلظت در حضور ال- آرژنین افزایش یافت ($P<۰/۰۰۱$). در این راستا، غلظت ۱۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر ال-آرژنین بی‌اثر و غلظت ۵۰۰ و۱۰۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر ال-آرژنین، به طور معنی‌دار سطح نیتریت موجود در هموژنات عضله دو بطنی گردنی جوجه را افزایش دادند(شکل شماره۴ وجدول شماره۱).



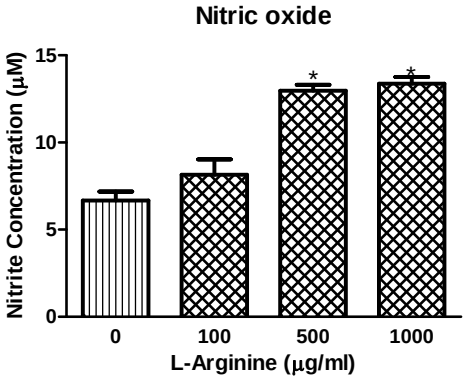
شکل شماره ۱: اثر L – آرژنین (500 µg/ml) و کافئین (200 µg/ml) بر حرکت کششی حاصل از تحریک غیر مستقیم الکتریکی و انقباض حاصل از استیل کولین اگزوژن(5 µg/ml).

www.SID.ir
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-19]

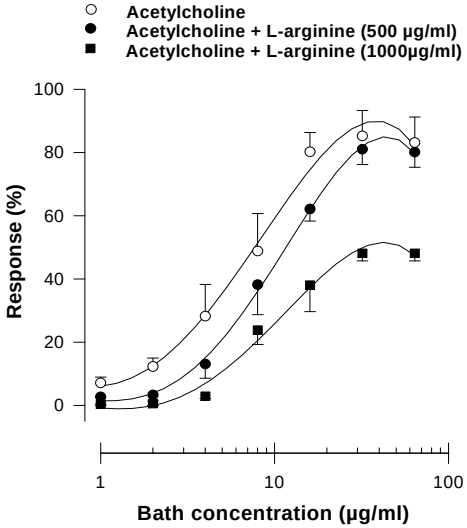
جدول شماره ۱ : غلظت نیتریت موجود در هموژنات عضله دوبطنی گردنی در حضور غلظت های مختلف ال-آرژینین.

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

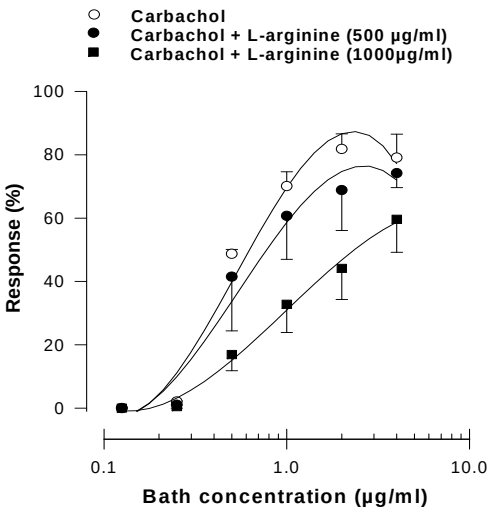
* تفاوت از کنترل را نشان می دهد. $P < ۰/۰۰۱$



شکل شماره ۴ : غلظت نیتریت هموژنات عضله دوبطنی گردنی جوجه در حضور غلظت های مختلف ال- آرژینین. نتایج مربوط به میانگین± خطای معیارسه جذب می‌باشد(معنی‌دار بودن P<۰/۰۰۱).



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



شکل شماره ۳ : منحنی پاسخ وابسته به میزان کرباکول در حضور ال- آرژینین. نتایج (میانگین ± 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 هرتز، ولتاژ ۵ الی ۱۰ ولت و مدت زمان تحریک ۰/۵ میلی‌ثانیه، حرکت کششی (twitch) ایجاد می‌کند که ناشی از آزاد شدن استیل کولین از پایانه‌های اعصاب حرکتی و تحریک گیرنده‌های نیکوتینی عضله اسکلتی است(۱۳).

ال- آرژینین در محدودهٔ غلظتی ۵۰ الی ۱۰۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر حرکت کششی ناشی از تحریک الکتریکی غیرمستقیم را به صورت گذرا مهار کرد. اثر مهاری ال-آرژینین بر پاسخ انقباضی (Contracture)

Archive of SID

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-19]

www.SID.ir

برجسته‌تر بود. تکنیک طیف‌سنجی رنگ نیتریک‌اکساید نشان داد که عملکرد مهاری ال-آرژینین در غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم/میلی لیتر به تولید نیتریک اکساید وابسته است. این یافته ها، دخالت مکانیسم‌های پس‌سیناپسی، ثانویه به تولید نیتریک اکساید در عملکرد مهاری ال- آرزینین را نشان می‌دهد. در مطالعه حاضر، غلظت ۵۰۰ میکرولیتر/ میلی‌لیتر ال-آرژینین، منحنی‌های پاسخ وابسته به میزان استیل کولین و کرباکول را بدون کاهش سقف اثر، به سمت راست منتقل کرد، که پیشنهاد کننده نوعی ضدیت رقابتی می‌باشد. علاوه بر این، منحنی‌های پاسخ وابسته به میزان استیل کولین وکرباکول در حضور غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر 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 براین، مشخص شده است که مهارکننده‌های نیتریک اکساید سنتاز یا دهنده‌های نیتریک اکساید می‌توانند به ترتیب فعالیت آزاد سازی کلسیم در هموژنات عضله اسکلتی یا حفرات جدا شده رتیکولوم سارکوپلاسمیک را افزایش یا کاهش دهند(۱۰،۹). نتایج مطالعات Kobzik (۱۹۹۴) و Reid (۱۹۹۸) نیزنشان داده است‌که دهنده‌های نیتریک اکساید و گوانوزین مونو فسفات حلقوی (cGMP) می‌توانند عملکرد انقباضی عضله اسکلتی را تضعیف کنند در صورتی‌که مهار نیتریک اکساید سنتاز، شلاتاسیون نیتریک اکساید خارج سلولی و مهار گوانیلیل سیکلاز عملکرد انقباضی عضله اسکلتی را افزایش می‌دهند(۱۵،۱۴). Gath و همکاران (۱۹۹۶) نیزگزارش کرده‌اندکه نیتریک اکساید تولیدشده توسط نیتریک اکساید سنتاز می‌تواند 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 می‌یابد (۱۶). این نتایج در مطالعات Kobzik (۱۹۹۴) و Balon (۱۹۹۴) نیز تائید شده است؛ به طوری که نشان داده‌اند تحریکات الکتریکی مکرر عضله اسکلتی تولید نیتریک اکساید را افزایش می‌دهد(۱۷،۱۴).

نتایج مطالعات فوق، بیانگر نقش مهاری نیتریک اکساید بر اانتقال عصبی- عضلانی و تولید نیرو در عضلات اسکلتی، ثانویه به تغییر جفت سازی تحریک- انقباض‌می‌باشد. این نتایج با نتایج مطالعه حاضرهمخوانی دارد. مکانیسم‌های 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 می‌دهد. علاوه بر این، نیتریک اکساید غلظت داخل سلولی کلسیم را تنظیم کرده و آزاد شدن کلسیم از رتیکولوم سارکوپلاسمیک را تعدیل می‌کند(۱۷،۱۶).

اثر مهاری نیتریک اکساید بر کانال‌های کلسیمی (۸تا۱۰،۱۶،۱۷)، پیش‌بینی‌کننده اثر مقابله‌ای کافئین بر عملکرد مهاری ال-آرژینین می‌باشد. در ارزیابی صحت این فرضیه، اثر کافئین بر عملکرد مهاری ال-آرژینین در عضله دو بطنی گردنی جوجه مورد بررسی قرار گرفت. کافئین یک متیل گزانتین است که از طریق آزادسازی یون‌های کلسیم از کانال‌های کلسیمی رتیکولوم سارکوپلاسمیک، سطح کلسیم سیتوزولی را برای انقباض عضله اسکلتی افزایش می‌دهد(۱۸). در مطالعه حاضر، اثر مهاری ال-آرژینین بر عملکرد انقباضی عضلهٔ دو بطنی گردنی جوجه در حضور کافئین مقابله شد. این یافته پیشنهاد کننده دخالت مکانیسم‌های مرتبط با

Archive of SID

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-19]

www.SID.ir

کانال‌های کلسیمی در اثر مهاری ال-آرژینین 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- پنی‌سیلامین (یک دهنده نیتریک اکساید) می‌تواند اثر القایی کافئین در آزادسازی کلسیم از حفرات رتیکولوم 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).

به‌طور طبیعی، درعضلات 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 فونکسیونی فعالیت اکسیداتیو nNOS و eNOS را در فیبرهای غنی از میتوکندری نشان می دهد(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 صحرایی، تظاهر می‌یابد، ولی این اثر توسط کافئین مهارمی‌گردد. این یافته، نقش مهم nNOS و eNOS را درفیزیولوژی 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 متغییری در عضلات اسکلتی دارد(۲۱). مطالعه ایمنی- سلولی- شیمیایی Stamler و Meissner (۲۰۰۱) ، هیچ نشانی از iNOS در عضلات اسکلتی موش صحرایی 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 خوکچه 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 به‌طور 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 برگشت‌پذیر می‌باشد(۱۹). نتایج مطالعات فوق، با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد؛ به طوری که کافئین اثر مهاری ال-آرژینین بر پاسخ حرکت کششی ناشی از تحریک الکتریکی فیبرهای عضلانی سریع منقبض شونده را خنثی کرد، ولی اثر مهاری ال-آرژینین بر پاسخ انقباضی فیبرهای آهسته منقبض شونده را تحت تاثیر قرار نداد. اهمیت فیزیولوژیک این یافته به

Archive of SID

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-19]

www.SID.ir

خوبی مشخص نیست. ولی می‌توان استنتاج نمود که مصرف کافئین برخلاف مصرف فرآورده‌های حاوی ال-آرژینین، می‌تواند از طریق مهار نیتریک اکساید سنتاز، تنفس عضلانی را بهبود و نیروی عضله را افزایش دهد. به عبارت دیگر، مهار نیتریک اکساید سنتاز می‌تواند به عنوان یکی از مکانیسم‌های اثر کافئین در افزایش قابلیت ورزشی تلقی شود و به قسمی، نقش فریبنده (Duping) کافئین(۲۳) در فعالیت ورزشی را توضیح می‌دهد.

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.

Archive of SID

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-19]

www.SID.ir

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.

Archive of SID

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-07-19]

www.SID.ir