Research Paper

Received: 16 Nov 2022
Last revised: 05 Feb 2023
Accepted: 20 Feb 2023

Effect of resistance training and vitamin D with chitosan coating on Semaphorine-a3 and NLRP-1 genes of neural junction in quadriceps muscle of ovariectomized rats

Tahereh Shadpour Alizadeh[1], Mohammad Ali Azarbayjani[1*], Sirvan Atashak[2], Maghsoud Peeri[1], Saleh Rahmati Ahmadabad[3]

1. Department of Exercise Physiology , Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Exercise Physiology , Mahabad Branch, Islamic Azad University, Mahabad, Iran
3. Department of Physical Education, Pardis Branch, Islamic Azad University, Pardis, Iran

*** Corresponding author e-mail: m_azarbayjani@iauctb.ac.ir**

Citation: Shadpour Alizadeh T, Azarbayjani MA, Atashak S, Peeri M, Rahmati Ahmadabad S. Effect of resistance training and vitamin D with chitosan coating on Semaphorine-a3 and NLRP-1 genes of Neural junction in quadriceps muscle of ovariectomized rats. Daneshvar Medicine 2022; 30(6):32-43.
doi: 10.22070/DANESHMED.2023.16937.1289

Abstract

Background and Objective: The menopausal process causes degeneration of motor nerve neurons in fast-twitch fibers. However, the effect of resistance training with vitamin D supplementation on the inhibition of genes involved in atrophy is not well understood. The purpose of this study was to determine the effect of resistance training and vitamin D with chitosan coating on Semaphorine-a3 and NLRP-1genes of neural junction in quadriceps muscle of postmenopausal rats.

Materials and Methods: In this experimental study, 42 femal of wistare rats with ages 8 to 12 weeks with an average weight of 230 to 260 g were randomly divided into 6 groups of 7 numbers; normal control (NC), menopause control (OC), estrogen (E), resistance training (RT),vitamin D white chitosan (Vit D+Ca+2), resistance training+Vitamin D with chitosan (RT+Vit D+Ca+2). Training group performed resistance training five days a week for eight weeks. Vitamin D with chitosan was gavage at a dose of 100 mg/kg before exercise. PCR Real time was used to determine the expression of Semaphorine-a3 and NLRP-1genes.

Results: The gene of Semaphorine-a3 in the resistance training group+vitamin D with chitosan compared to the postmenopausal control group and the training group had a significant decrease (P=0.001) and (P=0.002), respectively. NLRP-1 gene in the resistance training group+vitamin D with chitosan was significantly reduced compared to the training group (P=0.043).

Conclusion: The results showed that resistance training decreased the genes expression of Semaphorine-a3 and NLRP-1. Decreased expression of NLRP-1 gene under the influence of resistance training combined with vitamin D with chitosan coating could possibly improve neuromuscular function in postmenopausal people.

Keywords: Resistance training, Vitamin D with chitosan, Menopause, Semaphorine-a3, NLRP-1

مقاله پژوهشی

تمرین مقاومتی همراه با ویتامین D با پوشش کیتوزان بر بیان ژن‌های Semaphorine-a3 و NLRP-1 پیوستگاه عصبی عضله چهار سر ران رت‌های یائسه

نویسندگان: طاهره شادپور علیزاده[۱]، محمدعلی آذربایجانی[۱*]، سیروان آتشک[۲]، مقصود پیری[۱]، صالح رحمتی‌احمدآباد[۳]

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد مهاباد، دانشگاه آزاد اسلامی، مهاباد، ایران
۳. گروه تربیت‌بدنی، واحد پردیس، دانشگاه آزاد اسلامی، پردیس، ایران

*نویسنده مسئول: محمدعلی آذربایجانی **Email: m_azarbayjani@iauctb.ac.ir**

دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۲۵
آخرین اصلاح‌ها: ۱۴۰۱/۱۱/۱۶
پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۰۱

چکیده

مقدمه و هدف: فرایند یائسگی باعث انحطاط نورون‌های عصب حرکتی تارهای تند انقباض می‌شود. اما اثر تمرین مقاومتی همراه با مکمل ویتامین D ترکیبی بر مهار ژن‌های مؤثر درآتروفی به خوبی مشخص نیست. بر این اساس هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر ۸ هفته تمرین مقاومتی همراه با ویتامین D با پوشش کیتوزان بر بیان ژن‌های Semaphorine-a3 و NLRP-1 پیوستگاه عصبی عضله چهار سر ران رت‌های یائسه بود.

مواد و روش ها: در یک کارآزمایی پیش بالینی، ٤۲ سر موش صحرائی ماده نژاد ویستار ۸ تا ۱۲ هفته‌ای، با میانگین وزن ۲۳۰ تا ۲٦۰ گرم، به طور تصادفی به ٦ گروه ۷ تایی: کنترل سالم (NC)، کنترل یائسه (OC)، استروژن (E)، تمرین مقاومتی (RT)، ویتامینD با کیتوزان (D+Ca+2 Vit)، تمرین مقاومتی+ ویتامینD با کیتوزان (Ca+2+RT+Vit D) تقسیم شدند. پس از اوارکتومی، گروه تمرین مقاومتی ۵ روز در هفته به مدت ۸ هفته تمرین خود را انجام دادند. ویتامین D با کیتوزان در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم قبل از تمرین گاواژ شد. بیان ژن‌های Semaphorin-a3 و NLRP-1 با روش PCR-Real time اندازه‌گیری شد.

نتایج: ژنSemaphorine-a3 در گروه تمرین مقاومتی+ویتامینD با کیتوزان نسبت به گروه کنترل یائسه (P=۰/۰۰۱) و گروه تمرین (P=۰/۰۰۲) کاهش معناداری داشت. ژن NLRP-1 در گروه تمرین مقاومتی+ویتامینD با کیتوزان نسبت به گروه تمرین کاهش معناداری داشت (P=۰/۰٤۳).

نتیجه‌گیری: تمرین مقاومتی باعث کاهش بیان ژن‌های **Semaphorine-a3** و **NLRP-1** شد و ویتامین **D** با پوشش کیتوزان اثر تمرین مقاومتی را بر کاهش بیان ژن **NLRP-1** افزایش داده و احتمالا می‌تواند عملکرد عصبی-عضلانی را در افراد یائسه بهبود دهد.

واژه های کلیدی: تمرین مقاومتی، ویتامینD با کیتوزان، یائسگی، **Semaphorin-a3**، **NLRP-1**

مقدمه

در فرایند یائسگی همراه با کاهش مقدار و فعالیت هورمون‌های جنسی، توانایی عضله در پاسخ به محرک‌های آنابولیک مختل می‌شود (۱). گزارش شده پس از یائسگی سطح مقطع عضلانی حدود ٤٠ درصد کاهش می‌یابد (۲). در شرایط یائسگی، تعداد نورون‌های جدید عصبی کاهش یافته و به دنبال آن عملکرد نوروترانسمیترها و فعالیت گیرنده‌های استروئیدی در تارهای تند انقباض عضله اسکلتی تضعیف می‌گردد (۳). به دلیل کاهش عملکرد استروژن، تغییرات منفی در متابولیسم ویتامین *D* و کلسیم ایجاد می‌شود (٤). بطوریکه در سنین یائسگی انتقال پیام‌های عصبی در عضلات حرکتی مختل می‌شود (۳). قبل از یائسگی، گیرنده‌های استروژنی در تارهای نوع *II* به گیرنده ۱ و ۲۵ دی هیدروکسی ویتامین *D* متصل شده و در ایجاد هایپرتروفی نقش مهمی دارند (۵). در حضور ویتامین *D*، بیان و سنتز پروتئین‌های متصل شونده به کلسیم افزایش می‌یابد که این ترکیبات در جمع آوری و انتقال سریع کلسیم درون سلولی و انتقال سریع پیام‌های عصبی مشارکت دارند (٦). شواهد موجود حاکی از آن است که تخریب نورون‌های حرکتی در تارهای تند انقباض در پاسخ به کمبود هورمون استروژن، در کاهش عصب‌دهی تارهای عضلانی خصوصا تارهای تند تنش موجب نقص در ورود کلسیم به درون تارهای انقباضی شده و توانایی تولید نیروی عضلانی کاهش می‌یابد (۷). به این دلیل کاهش تولید و تضعیف عملکرد استروژن و پروژسترون در تحلیل توده عضله و کاهش قدرت نقش اساسی دارد (۸). لازم به ذکر است سیناپس‌های عصبی- عضلانی در انواع تارها، ظرفیت تغییر پذیری متفاوتی داشته و به عوامل محیطی و متابولیکی مختلف پاسخ‌های متفاوتی نشان می‌دهند (۹). با اینحال در پیوستگاه عصب عضله، برخی نشانگان با عملکرد مهار آکسونی نیز می‌توانند از رهاسازی استیل کولین، جلوگیری کرده و به وسیله تاثیر مهارگر از ورود کلسیم، تولید نیرو و قدرت عضلانی را کاهش دهند (۸). از این مجموع می‌توان به سمافورین‌ها اشاره کرد (۹). این دسته نقش دفع یا جذب‌کنندگی در عملکرد آکسون به بافت هدف را دارند (۱۰). نوع سمافورین *a3* (*Semaphorin-a3*) از اعضاء مهم این خانواده بوده که در محیط ریز سیناپسی تارهای نوع ۲ (*IIb/x*) بیان شده و با راه اندازی نوروپیلین شماره ۱ (*NLRP-1*)[1] و پلکسین *a* (*PLX-a*)[2] از سنتز پروتئین‌های موثر در رشد سلول پیشگیری می‌کند (۱۱). این مورد نیز باعث کاهش سنتز زنجیره سنگین میوزین در تارهای تند انقباض می‌گردد (۱۲). گزارش شده مهارگرهای تولید نیرو بر اتصالات عصبی عضلانی در تارهای تند تنش اثرگذاری بالاتری داشته، زیرا در تارهای نوع *II* پایانه‌های استیل کولین به میزان بیشتری نسبت به تارهای نوع *I* وجود دارد (۱۰) و مهارگرهای آکسونی در پایانه‌های عصب حرکتی تارهای تند تنش به مقدار بیشتری بارگذاری می‌شوند (۷). از طرف دیگر بیان برخی دیگر از کمپلکس‌های چند پروتئینی به نام اینفلاماسام می‌تواند درایجاد التهاب نورون و تخریب آکسون موثر باشد (۱۳). از میان آن‌ها اینفلاماسام نوع ۱ به طور عمده در نورون‌ها وجودداشته و باعث راه‌اندازی مسیرهای التهاب و مهارسیگنال‌دهی پیام‌های آکسون می‌شود (١٤). به این دلیل مهار تولید و عملکرد گیرنده‌های استروژن همراه با فرآیند یائسگی در سیگنالدهی پروتئین‌های مهارگر قدرت موثراست (۱۵). با اینحال طبق مطالعات مختلف، انجام تمرین قدرتی به عنوان مکانیسم محافظتی در راه اندازی گیرنده‌های استروژنی و بهبود عملکرد گیرنده‌های عصب حرکتی در بهبود قدرت موثر است (١٦). اما در اثرگذاری تمرین با توجه به دو فاکتور اساسی شدت، مدت و حجم عضلات درگیر در انقباض، نتایج متفاوت و متناقضی وجود دارد (۱۷). تمرین استقامتی به واسطه فراخوانی بیوژنز میتوکندریایی در راه اندازی مسیر انتقال الکترون در افزایش تولید عامل مرتبط با ژن کالسی تونین در جسم سلولی نورون‌های عضلات فعال، باعث افزایش سرعت انتقال پیام عصبی می‌گردد (۱۸). تمرین مقاومتی باعث برانگیختگی عصب حرکتی در عضلات تند تنش می‌شود و تسهیل بیشتری در اتصال عصبی عضلانی ایجاد می‌کند (١٦). افزایش فشار مکانیکی بر عضلات درگیر در تمرین باعث حرکت یون سدیم و تولید و رهایش یون کلسیم می‌شود و با رهاسازی بیشتر

[1] - Neuropilin-1
[2] - Plexin-a

استیل کولین از پایانه‌های عصبی در انتهای عضلات تند انقباض برانگیختگی عصبی را نسبت به تارهای کند تنش افزایش می‌دهد (۱۰). لذا مسیرهای هایپرپلازی را در ابتدا با افزایش تعداد گیرنده‌های استیل کولین (۱۶) و سپس با تاثیر بر گیرنده‌های استروژنی موجود در این نوع تارها هموار می‌کند (۱۹). با انجام تمرین قدرتی مایواستاتین مهار می‌شود (۱۶). به این دلیل شدت تمرین به عنوان عامل موثر در بهبود بیان ژن با تنظیم رونویسی و ترجمه بیان آن در تعدیل فعالیت آنزیم‌های آنژیوژنین و بهبود سنتز پروتئین اثر گذار است (۱۷). از طرف دیگر تحمل و تکرار اضافه بار مکانیکی باعث آسیب‌های ریز مولکولی در ناحیه اتصال عصب به عضله درگیر در تمرین می‌شود و ایسکمی-ریپرفیوژن موقت باعث تولید پاسخ‌های آندوکراین و راه اندازی سلول‌های ماهواره‌ای در همکاری با گیرنده‌های استروژنی در عضله درگیر در تمرین می‌شود (۲۰). همچنین وجود گیرنده‌های استروژنی بر بافت عضله در حالت استراحت پس از تمرین قدرتی در روند ترمیم عضله درگیر در تمرین کمک می‌کند (۵). همینطور تجمع متابولیت‌هایی مانند آدنوزین دی فسفات (*ADP*) و لاکتات در عضلات فعال، محرک پاسخ‌های درون‌ریز بوده و می‌تواند بیوژنز سلولی را در مسیر پروتئین‌سازی افزایش دهد (۱۸). اما به نظر می‌رسد که، استراحت پس از انجام وهله‌های شدید مقاومتی عامل موثری در تولید نوتروژنین (۲۱) و مهار فاکتورهای آتروژن در پیشگیری از تحلیل توده عضله باشد (۱۶). هرچند حجم عضلات درگیر در انقباض نیز می‌تواند عامل مهم دیگری در بهبود پاسخ‌های عصب حرکتی به تمرین قدرتی باشد (۱۶). به این دلیل، انجام تمرین قدرتی در هفته‌های اول اجرا، می‌تواند سازگاری‌های عصبی بیشتری در ناحیه اتصال صفحه محرکه عضلات فعال ایجاد کند (۲۱). از طرف دیگر مصرف ویتامین *D* بر جلوگیری از کاهش توده عضله و حفظ قدرت عضله موثر است (۲۲). در حضور ویتامین*D*، بیان و سنتز پروتئین‌های متصل شونده به کلسیم افزایش یافته که این ترکیبات در جمع آوری و انتقال سریع کلسیم درون سلولی و بهبود عملکرد عصبی- عضلانی موثر است (۶). همینطورکیتوزان یک پوشش جدید خوراکی با عملکرد آنتی‌اکسیدانی بوده که با ساختمان چندقندی متشکل از واحدهای گلوکزآمین و ان-استیل گلوکز آمین است که موجب راه اندازی مسیر کلسیم درون سیتوزولی و بهبود متابولیسم سلولی می‌شود (۲۳) و همراه با مصرف ویتامین *D* می‌تواند در بهبود عملکرد عضلانی مؤثر باشد (۲۲). تا کنون مطالعه‌ای در خصوص تاثیر تمرین مقاومتی بر بیان ژن در پیوستگاه صفحه محرکه عصبی– عضلانی در فرآیند یائسگی انجام نشده و اغلب مطالعات در این زمینه موارد بالینی را بررسی نموده‌اند، لذا این مطالعه برای اولین بار به بررسی اثرتمرین مقاومتی و ویتامین *D* با پوشش کیتوزان بر ژن‌های *Semaphorine-a3* و*NLRP-1* در پیوستگاه عصبی عضله چهار سر ران رتهای یائسه پرداخت.

مواد و روش‌ها

در یک کارآزمایی پیش بالینی۴۲ سر موش صحرائی ماده نژاد ویستار، سن ۸ تا ۱۲ هفته با وزن حدود ۲۳۰ تا ۲۶۰ کیلوگرم خریداری و به آزمایشگاه حیوانات انتقال داده شد. پس از یک هفته آشنایی با محیط آزمایشگاه به صورت تصادفی در ۶ گروه ۷ تایی شامل: ۱- گروه کنترل سالم (NC) و ۲- گروه کنترل یائسه (OC)، ۳-گروه استروژن (E)، ٤- گروه تمرین مقاومتی (RT)، ۵- گروه ویتامین Dبا کلسیم (Vit D+Ca2+)، ٦- گروه تمرین مقاومتی+ ویتامین D با کلسیم (RT+Vit D+Ca+2) تقسیم شدند. آزمودنی ها در قفس‌های پلی کربنات شفاف ساخت شرکت رازی راد در محیطی با درجه حرارت ۲±۲۳ درجه سانتی‌گراد و چرخه روشنائی-تاریکی ۱۲:۱۲ با دسترسی آزادانه به آب و غذای مخصوص حیوانات (پلت) نگهداری شدند. همه مراحل مطالعه با رعایت اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی، با تائید کد اخلاق به شماره IR.IAU.CTB.REC.1400.120 در کمیته اخلاق پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی مصوب و انجام گردید.

نحوه ایجاد اوارکتومی

برای انجام اوارکتومی، همه حیوانات به صورت داخل صفاقی با مخلوط کتامین-زایلازین ۷/٦ تا ٦۱/٦ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن بیهوش شدند. سپس تخمدان‌ها با یک برش دو طرفه از طریق پوست کمری برداشته و خارج

گردید و محل جراحی پس از انجام ضد عفونی بخیه زده شد (۲٤).

برنامه تمرینی

برای اجرای برنامه تمرین مقاومتی، پس از انجام القاء یائسگی و یک هفته آشنا سازی، آزمودنی‌ها با برنامه تمرین مقاومتی (نردبان با ارتفاع ۱۱۰ سانتی متر، فاصله بین هر پله ۲ سانتی‌متر و شیب نردبان ۸۵ درجه) بدون حمل وزنه به کمک تمرین دهنده ۳ تا ۵ تکرار بالا رفتن از پله ها را انجام دادند. قبل از انجام تمرین مقاومتی فزاینده ابتدا حداکثر یک تکرار بیشینه (RM[1]) آزمودنی ها با افزودن وزنه ای به قسمت بالایی دم به وسیله چسپ لکوپلاست (قبل از تمرین حساسیت دم موش ها به این نوع چسپ بررسی شد) به این صورت انجام شد; تمرین در جلسه اول با افزودن وزنه ای به مقدار ۵۰ درصد وزن بدن به دم آنها آغاز شد، سپس ۳۰ گرم وزنه به هرست اضافه شد و تا زمانی که آزمودنی ها قادر به بالا بردن وزنه نبودند ادامه یافت، بر این اساس آخرین وزنه ای که می توانست حمل کند به عنوان حداکثر یک تکرار بیشینه در نظر گرفته شد (۲۵). پروتکل تمرین مقاومتی به مدت ۸ هفته و ۵ روز در هفته انجام شد و روز ششم در هر هفته جهت سنجش حد اکثر یک تکرار بیشینه آنها برای اضافه شدن تدریجی وزنه برای دفعه بعد در نظر گرفته شد. قبل از اجرای تمرین ابتدا برنامه گرم کردن را در ۳ تکرار بدون حمل وزنه انجام می‌دادند، سپس اجرای تمرین مقاومتی در هفته اول با ۳۰ درصد از وزن بدن رت ها انجام شد و برای جلسات بعدی با ۱۰ درصد آخرین وزنه حمل شده تمرین آغاز می‌گردید، به این ترتیب بار تمرین در هفته اول شامل ۳۰ درصد و هر هفته ۱۰ درصد به وزن وزنه‌ها اضافه می شد و به تدریج طی ۸ هفته به ۱۰۰ درصد وزن بدن آن ها افزایش یافت. تعداد مجموعه ها در هر جلسه ۵ تکرار و در ۳ ست با زمان استراحت بین هر تکرار ۳۰ ثانیه و بین هر ست ۳ دقیقه در نظر گرفته شد (جدول ۱) (۲۵). در این مدت جهت یکسان سازی، گروه کنترل ۵ بار در هفته به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه، در هر جلسه بر روی نردبان قرار داده می‌شدند.

جدول ۱. برنامه تمرین مقاومتی

	RT						
هفته‌های تمرین	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸
مقدار وزنه در هر جلسه	٪۳۰	٪٤۰	٪٥۰	٪٦۰	٪۷۰	٪۸۰	٪۹۰	٪۱۰۰
تعداد ست تمرین در هر جلسه	۳	۳	۳	۳	۳	۳	۳	۳
تعداد تکرار در هر ست تمرین در هر جلسه	٥	٥	٥	٥	٥	٥	٥	٥
زمان استراحت بین هرست (دقیقه)	۳	۳	۳	۳	۳	۳	۳	۳
زمان استراحت بین هر تکرار (ثانیه)	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰

نحوه القای ویتامین D با پوشش کیتوزان

محلول کیتوزان (۱٪ وزنی) پس از حل کردن پودرکیتوزان (اندازه ذرات ۱۰۰ نانومتر، خلوص ۹۹ درصد، ساخت ایران) دراسید استیک گلاسیال (شرکت سیگما آلدریچ، ساخت آمریکا) (۱٪ وزنی در حجم) تهیه شد. با تکان دادن یک شبه دردمای محیط (۲۵ درجه سانتیگراد) با ۵۰ میلی لیتر محلول کیتوزان (CS: Tween 80 1:1.12 w/w) به مدت ۲ ساعت در دمای ٤٥ درجه سانتیگراد به هم زده شد و امولسیون فاز آبی تشکیل شد. ۵ میلی لیتر دی کلرومتان (شرکت مرک، ساخت آلمان)، مقادیر مختلفی از ++Ca و ویتامین D3 اضافه شد تا CS: Ca++ و ویتامین D3 (۱:۰,۲۵، ۱:۰,۵۰، ۱:۰,۷۵، و ۱) به دست آید. فاز روغنی با فاز آبی در ۱٤۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در زیر یک حمام یخ همگن شد تا یک امولسیون o/w بدست آید. به امولسیون ۵۰ میلی لیتری، محلول ۵۰ میلی لیتری تری پلی فسفات سدیم آبی، ساخته شده در چین (۰/٤٪ وزنی بر حجم) تحت ۵۰۰ دور در دقیقه با هم زدن به مدت ٤۰ دقیقه در دمای اتاق و سپس سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه (٤ درجه سانتی گراد) اضافه شد. پس از چندین بار شستشو، با آب دیونیزه شد و در نهایت، سوسپانسیون به دست آمده در دمای ٦٥- درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت در حالت انجماد خشک شد (۲٦). پس از آن به صورت خوراکی با دوز۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم به گروه ویتامین D با کیتوزان و گروه

تمرین+ویتامین D با کیتوزان یک ساعت قبل از تمرین به مدت ۸ هفته گاواژ شد. در هفته هشتم و ٢٤ ساعت پس از آخرین جلسهٔ تمرین و ریکاوری پس از آن، موش‌های صحرایی با روش جا بجا کردن مهره گردن قربانی شدند و عضله چهار سر ران نمونه برداری شد و در فیکساتیو فرمالدهید ۱۰ درصد برای برش‌گیری نگهداری شد. پس از آبگیری بافت در اتانول ۷۰ درصد، ۸۰، ۹٦ و ۱۰۰ درصد، نمونه‌ها در بلوک پارافینی تعبیه و برش‌های ۵ میکرومتری از بافت عضله با استفاده از میکروتوم تهیه گردید.

سنجش بیان ژن‌های Semaphorine- a3، NLRP-1

برای سنجش بیان ژن‌های Semaphorine- a3، NLRP-1 از روش Realtime-PCR با Premix Extaqit و از GAPDH به عنوان ژن کنترل استفاده گردید و اندازه‌گیری مقدار بیان این ژن به صورت توأمان با هر یک از ژن‌ها به وسیله کیت Mir nasy mini 50 kit (qiagene ساخت آلمان) بر اساس دستور العمل انجام شد. برای استخراج RNA مقدار ۵۰ میلی گرم بافت منجمد عضله چهار سر ران موش هموژن کرده و طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت محلول RNA از آن استخراج و به وسیله آنزیم DNaseI از هرگونه آلودگی به DNA و آنزیم‌های تخریب کننده RNA پاکسازی شد. از هرکدام از نمونه‌ها ۲ میکروگرم mRNA برای سنتز اولین رشته cDNA استفاده شد. مقدار نسبی بیان ژن برای ژن‌های مورد مطالعه در عضله چهار سر با کمک پرایمرهای اختصاصی آنها اندازه گیری شد. نسبت جذبی ۲٦۰ تا ۲۸۰ نانوگرمی برای تمام نمونه های استخراج شده ۱/۸ تا ۲ بود. برای بررسی کیفیت RNA استخراج شده از روش الکتروفروز و ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. لازم به ذکر است که قبل از سنجش cDNA برای اطمینان از نبود DNA در نمونه استخراج شده DNAs treatment (thermos scientific , ساخت آلمان) انجام شد. سنتز cDNA به وسیله کیت transe criptor first strand cDNAsinthesis kit (roch, ساخت آلمان) طبق دستورالعمل کیت‌ها انجام شد. برنامه Real time PCR با دستگاه "Rotrogene 6000, corbet) ساخت آلمان انجام شد. این برنامه بر طبق SYBER Green (ampligon, ساخت دانمارک) با دور ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه و بلافاصله ٤۰ چرخه با ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ٦۰ درجه سانتی گراد به مدت ٦۰ ثانیه با پرایمر طراحی شده (ساخت نیکا زیست ژن ایران) انجام شد (جدول ۲).

جدول ۲. توالی پرایمری ژن های مورد مطالعه حاضر

ژن	توالی پرایمر (5′ → 3′)
Semaphorine-a3	
Forward	GGCTCCTGCTTCGTAGTCT
Reserve	CTACTGGACATTTCTTTGGTC
NLRP-1	
Forward	TGGATGGAGAGAATGAAGGTGG
Reserve	TGGTGGAAAGATGATGTAGGTG

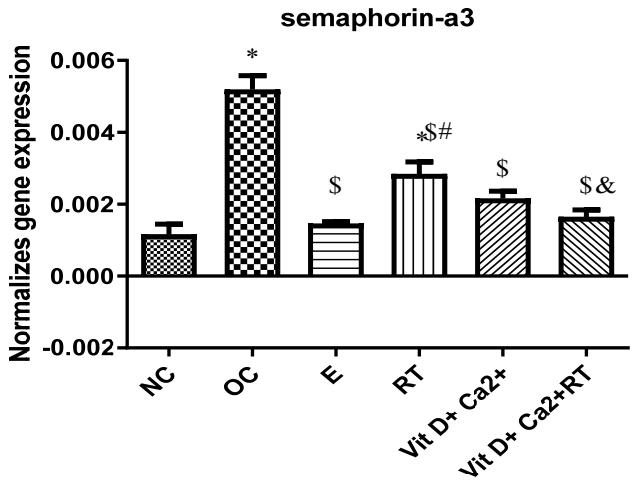
تجزیه و تحلیل آماری

کمی سازی بیان ژن‌های مورد نظر با فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ و مقادیر Threshold cycle: CT ارزیابی شد. نرمال بودن توزیع داده‌ها با آزمون شاپیروویلک مشخص گردید. تعیین اختلاف بین گروهی با آزمون آنووای یک راهه مستقل توسط نرم افزار Graph pad prism نسخه ۸ در سطح معنی‌داری $P\leq$ ۵٪ انجام شد.

نتایج

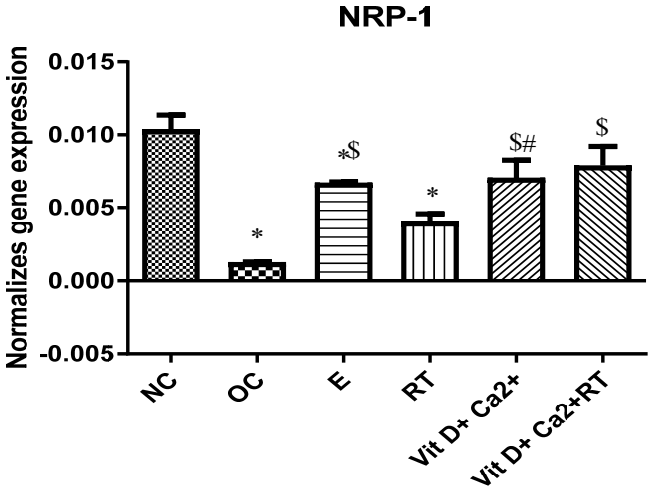
بیان ژن‌های Semaphorine-a3(P=) و NLRP-1(P=) در گروه کنترل سالم نسبت به گروه کنترل یائسه به طور معناداری کمتر بود. بیان ژن Semaphorine-a3 در گروه تمرین مقاومتی+ویتامین D با کیتوزان نسبت به گروه کنترل یائسه و گروه تمرین به ترتیب (P=۰/۰۰۱) و (P=۰/۰۰۲) کاهش معناداری داشت. اما بیان Semaphorine-a3 بین تمرین مقاومتی+ویتامین D با کیتوزان (P=۰/۷٤٤) و تمرین (P=۰/٤۹٦) نسبت به گروه

ویتامین D با کیتوزان تفاوت معناداری مشاهده نشد شکل ۱. تغییرات بیان ژن NLRP-1 در گروه تمرین مقاومتی+ویتامین D با کیتوزان و تمرین نسبت به گروه کنترل یائسه به ترتیب (P=۰/۹۱۷) و (P=۰/۲۸٦) تفاوت معناداری نداشت. اما در گروه تمرین مقاومتی+ویتامین D با کیتوزان نسبت به گروه تمرین NLRP-1 کاهش معناداری مشاهده شد (P=۰/۰٤۳). بین تمرین مقاومتی+ ویتامین D با کیتوزان نسبت به گروه ویتامین D با کیتوزان (P=۰/۹۷۹) و درگروه تمرین نسبت به گروه ویتامین D با کیتوزان درکاهش بیان ژن NLRP-1 تفاوت معناداری مشاهده نشد (P=۰/۱۷۸) شکل ۲. بر این اساس می‌توان چنین اظهار داشت که، مکمل ویتامین D با پوشش کیتوزان تاثیر تمرین را تقویت کرده و باعث مهار عملکرد ژن‌های موثر در آتروژنز شده است.



شکل ۱. نسبت بیان ژن Semaphorine-a3 به میزان GAPDH بر حسب گروه‌ها

*تفاوت با گروه کنترل سالم(**NC**)، $تفاوت با گروه کنترل یائسه(**OC**)،#تفاوت با گروه استروژن(**E**)،&تفاوت با گروه تمرین(**RT**) (معناداری در سطح آلفای۰/۰۵).



شکل ۲. نسبت بیان ژن NLRP-1 به میزان GAPDH بر حسب گروه‌ها

*تفاوت با گروه کنترل سالم(**NC**)، $تفاوت با گروه کنترل یائسه،(**O**)&تفاوت با گروه تمرین(**RT**) (معناداری در سطح آلفای۰/۰۵).

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد در شرایط یائسگی بیان ژن‌های آتروژن Semaphorine-a3 و NLRP-1 به طور معناداری افزایش یافت. اما در گروه تمرین مقاومتی+ ویتامین D با کلسیم، گروه تمرین و گروه ویتامین D با کلسیم بیان ژن Semaphorine-a3 کاهش معناداری داشت و ژن NLRP-1 در گروه تمرین مقاومتی+ ویتامین D با کلسیم نسبت به گروه‌های تمرین و ویتامین D با کلسیم کاهش بیشتری مشاهده شد و ویتامین D و تمرین توانستند از این اثر افزایش ناشی از یائسگی بکاهند.

با توجه به مطالعات انجام شده در حوزه مذکور، کاهش قدرت به دلیل ایجاد اختلال در عملکرد عصبی- عضلانی همراه با فرآیند یائسگی تائید می‌شود (۲۷). از طرف دیگر ایجاد اختلال در متابولیسم سلولی به دلیل سنتز پروتئین‌های آتروژنی عملکرد پایانه عصب حرکتی در انتهای عضله را مختل کرده و تولید نیرو را کاهش می‌دهد (۸). بر این اساس هدف دوم فرآیند یائسگی پس از ایجاد اختلالات عصبی (۲۷)، کاهش در قدرت عضلانی می‌باشد (۲۸). در نظریه دیگر نقص در عملکرد اوتوفاژی موجب عدم فراخوانی واحدهای عصب حرکتی در پایانه آکسون در انتهای تارهای تند انقباض می‌گردد که خود عامل مهمی در ایجاد آتروفی عضله است (۲۹). با این‌حال طبق مطالعات مختلف انجام تمرین منظم که از شدت مناسبی برخوردار باشد می‌تواند در بهبود عملکرد عصبی-عضلانی موثرباشد (۱۶). لازم به ذکر است که بکارگیری حجم مناسب عضلات در اجرای تمرین نیز در تنظیم متابولیسم سلول (۲۱) و بهبود پاسخ‌های عصب حرکتی اثر گذار است (۳۰). در این راستا مشخص شده است که تمرین مقاومتی با اثر بخشی بر روی اعصاب محیطی و صفحه محرکه عصبی-عضلانی از طریق راه اندازی محرک‌های عوامل رشدی از جمله IGF-1 (۳۱) و افزایش تولید PGC-1α,β می‌تواند در افزایش انتقال پیام‌های آکسون تارها در عضلات فعال در انقباض موثر باشد (۱۸). همچنین همراستا با سازگاری‌های عصب حرکتی، فاکتور رشد عصبی مشتق شده از سلول‌های گلیال نیز پس از یک دوره تمرین با شدت مناسب افزایش می‌یابد(۳ ۲). از طرفی نیز به اثرضد التهابی تمرین در کاهش بیان پروتئازوم‌های آتروژن‌گر از جمله Murf-1 و MAF-bx توجه شده است (۳۳). بکارگیری حجم عضلات بیشتر در انجام تمرین شدید نیز از مسیر افزایش انتقال یون‌های +Na و +Ca در همکاری با رهایش بیشتر استیل کولین و انقباض نیرومندتر عضله باعث سازگاری عصبی-عضلانی بالاتری می‌گردد (۱۵). در این خصوص عنوان شده، بکارگرفتن توده عضلانی بزرگ در اجرای تمرین، هزینه متابولیکی بالاتری نسبت به حجم عضلانی کوچکتر ایجاد می‌کند و به دلیل آسیب‌های ریز مولکولی در تحمل فشارهای مکانیکی و پدیده ایسکمی-ریپرفیوژن در عضلات منقبض شده، پاسخ‌های التهابی بیشتری در حین اجرای تمرین به همراه دارد (۱۷). همینطور در بکارگیری تارهای تند انقباض و راه اندازی گیرنده‌های استروژنی در زمان استراحت پس از تمرین محرک مسیرهای آنتی اکسیدانی بهبود هومئوستاز سلولی-مولکولی می‌باشد (۵). با فعال‌سازی پروتئین‌های تیروزین کیناز بتا از جمله AKT از طریق فسفوریلاسیون پروتئین اینوزیتول فسفوکیناز ۳ PI3K در پیشگیری از کاهش تحلیل توده عضله موثر است (۲۱). شفر و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه خود به این نتیجه رسیدند که ۱۲ هفته تمرین مقاومتی با شدت ۷۰ تا ۸۰ درصد یک تکرار بیشینه نسبت به تمرین استقامتی و ترکیبی، تفاوتی در کاهش بیان ژن مایواستاتین رت‌های مسن ایجاد نمی‌کند (۳٤). صارمی و همکاران در مطالعه‌ای به بررسی تعیین اثرات ۸ هفته تمرین مقاومتی با و بدون مکمل‌سازی ویتامین D بر ترکیب بدنی زنان یائسه کم‌تحرک پرداختند. یافته‌های آن‌ها نشان داد که مکمل‌سازی با ویتامین D ، سطوح سرمی ۲۵- هیدروکسی ویتامین D را به‌طور معنی‌داری افزایش داد. تمرین مقاومتی موجب افزایش معنی‌دار سطوح سرمی فاکتور رشد شبه انسولین نوع یک IGF-1، توده و قدرت عضلانی شد (۳۵). درحالیکه نتایج مطالعه دیگری در خصوص تاثیر مصرف ویتامینD با انجام ۸ هفته تمرین قدرتی تفاوتی در بیان پروتئین فاکتور FGF-23 در عضله چهار سر ران موش مبتلا به بیماری مزمن کلیوی ایجاد نکرد (۳٦). از دلایل تناقض در نتایج بدست آمده با نتایج مطالعه حاضر می‌توان به نوع، شدت و مدت تمرین (۳۳) و سطح سلامت آزمودنی‌ها و نحوه مصرف مکمل اشاره کرد (۳٦). با توجه

به نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر مصرف مکمل ویتامین D با پوشش کیتوزان در بهبود متابولیسم سلولی و تنظیم بیان ژن در ناحیه صفحه محرکه عصبی در عضله چهار سر ران رت‌های یائسه اثر تمرین را تقویت کرد. در رابطه با مکانیسم اثر شدت تمرین در بهبود عملکرد عصبی عضلانی و نیز بهبود قدرت به موارد زیر اشاره می‌شود: ۱-سیستم عصبی با توجه به اصل اندازه ابتدا واحدهای حرکتی کوچک‌تر را فعال می‌کند (۳۷)، ۲-با افزایش بار کار، نیروی عضلانی بیشتری از راه برانگیختگی واحدهای حرکتی بزرگتر فعال می‌شود و با متابولیسم سلولی بالاتر در تنظیم بیان ژن موثر است (۲۱)، ۳- در حین اجرای تمرین قدرتی با ایسکمی–ریپرفیوژن موقتی، محرک مسیرهای التهاب‌زا می‌باشد اما در زمان استراحت آنژیوژنز را در مسیر اوتوفاژی تنظیم می‌کند (۳۸). به این دلیل تمرین قدرتی با ایجاد استرس سلولی بالاتر محرک مسیرهای آندروژنی است (۳۳) و به وسیله فراخوانی واحدهای حرکتی متناسب با شدت تمرین بیان ژن را در صفحه محرک عصبی بهبود می‌بخشد (۱۵). مصرف ویتامین D سنتز پروتئین‌های متصل شونده به کلسیم است که این ترکیبات در جمع آوری و انتقال سریع کلسیم درون سلولی مؤثر بوده و مسیر سنتز پروتئین را در راه اندازی گیرنده‌های کلسیتریول افزایش می‌دهد (٦). اثر احتمالی کیتوزان نیز بر بهبود متابولیسم سلول و تقویت اثر تمرین می‌تواند به دلیل ترکیب گلوکز آمین در راه اندازی سیگنالینگ پروتئین‌های وابسته به مسیرکلسیم باشد (۲۳). اما هنوز مطالعه‌ای در زمینه تاثیر تعاملی تمرین قدرتی همراه با مصرف مکمل ویتامین D با پوشش کیتوزان بر بهبود عملکرد عصبی-عضلانی در مدل‌های یائسه انجام نشده و به مطالعات بیشتری در این زمینه نیاز است تا نتایج گسترده‌تری بدست آید. از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به عدم استفاده از آزمودنی‌های انسانی اشاره کرد. از دیگر محدودیت‌ها عدم استفاده از الکترومایوگرافی در تعیین میزان عملکرد عضله می‌باشد.

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان دادکه، تمرین مقاومتی باعث کاهش بیان ژن Semaphorine-a3 و NLRP-1 شد و کاهش بیان ژن NLRP-1 تحت تاثیر تمرین مقاومتی همراه با ویتامین D با پوشش کیتوزان احتمالا می تواند عملکرد عصبی- عضلانی را در افراد یائسه بهبود بخشد. بر این اساس پیشنهاد می گردد در شرایط یائسگی به طور همزمان از تمرین مقاومتی و ویتامین D با پوشش کیتوزان استفاده گردد.

به منظور کاهش میزان بروز اختلالات، انجام اقدامات اصلاحی هر چه سریعتر در آینده نزدیک ضروری به نظر می رسد پیشنهاد می گردد در مطالعات آتی برنامه تمرینات اصلاحی و مداخلات ارگونومیکی متناسب با اختلالات اسکلتی عضلانی طراحی گردد.

ملاحظات اخلاقی

همه مراحل مطالعه با رعایت اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی، با تائید کد اخلاق به شماره IR.IAU.CTB.REC.1400.120 در کمیته اخلاق پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی مصوب و انجام گردید.

تشکر و قدردانی

با توجه به اینکه مقاله حاضر بخشی از رساله مقطع دکتری دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی می باشد، بدین‌وسیله از حمایت‌های معنوی معاونت پژوهش و فناوری واحد دانشگاهی مذکور قدردانی می شود.

تعارض و منافع

نویسندگان مقاله اعلام می دارند که هیچ گونه تضادی در منافع وجود ندارد.

منابع

1. Douchi T, Iemura A, Matsuo T, Kuwahata T, Oki T, Yoshimitsu N, et al. Relationship of head lean mass to regional bone mineral density in elderly postmenopausal women. Maturitas 2003;46(3):225-30.
2. Rosado MdL, Tomás MT, Correia SC, Gonçalves CR, Abreu MHd, Cardoso SF. Resistance training for muscle strength and lean mass in adults older than 60 years: a systematic review. Indian Journal of Medical Research and Pharmaceutical Sciences 2016;3(9):16-27.
3. Saravia F, Beauquis J, Pietranera L, De Nicola AF. Neuroprotective effects of estradiol in hippocampal neurons and glia of middle age mice. Psychoneuroendocrinology 2007;32(5):480-92.
4. Bolland MJ, Grey A, Gamble GD, Reid IR. Calcium and vitamin D supplements and health outcomes: a reanalysis of the Women's Health Initiative (WHI) limited-access data set. The American Journal of Clinical Nutrition 2011;94(4):1144-9.
5. Kupr B, Schnyder S, Handschin C. Role of nuclear receptors in exercise-induced muscle adaptations. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine 2017;7(6):a029835.
6. Airaksinen MS, Eilers J, Garaschuk O, Thoenen H, Konnerth A, Meyer M. Ataxia and altered dendritic calcium signaling in mice carrying a targeted null mutation of the calbindin D28k gene. Proceedings of the National Academy of Sciences 1997;94(4):1488-93.
7. Rowan SL, Rygiel K, Purves-Smith FM, Solbak NM, Turnbull DM, Hepple RT. Denervation causes fiber atrophy and myosin heavy chain co-expression in senescent skeletal muscle. PloS One 2012;7(1):e29082.
8. Deschenes MR, Roby MA, Eason MK, Harris MB. Remodeling of the neuromuscular junction precedes sarcopenia related alterations in myofibers. Experimental Gerontology 2010;45(5):389-93.
9. De Winter F, Vo T, Stam FJ, Wisman LA, Bär PR, Niclou SP, et al. The expression of the chemorepellent Semaphorin 3A is selectively induced in terminal Schwann cells of a subset of neuromuscular synapses that display limited anatomical plasticity and enhanced vulnerability in motor neuron disease. Molecular and Cellular Neuroscience 2006;32(1-2):102-17.
10. Svensson A, Libelius R, Tågerud S. Semaphorin 6C expression in innervated and denervated skeletal muscle. Journal of Molecular Histology 2008;39(1):5-13.
11. Vo TT. Studies on semaphorin 3A in the neuromuscular junction and in perineuronal nets: Vrije Universiteit 2011.
12. Karakelides H, Nair KS. Sarcopenia of aging and its metabolic impact. Current Topics in Developmental Biology 2005;68:123-48.
13. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-β. Molecular Cell 2002;10(2):417-26.
14. de Rivero Vaccari JP, Dietrich WD, Keane RW. Activation and regulation of cellular inflammasomes: gaps in our knowledge for central nervous system injury. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism 2014;34(3):369-75.
15. Uchitel O, Protti D, Sanchez V, Cherksey B, Sugimori M, Llinas R. P-type voltage-dependent calcium channel mediates presynaptic calcium influx and transmitter release in mammalian synapses. Proceedings of the National Academy of Sciences 1992;89(8):3330-3.
16. Jubeau M, Zory R, Gondin J, Martin A, Maffiuletti NA. Late neural adaptations to electrostimulation resistance training of the plantar flexor muscles. European Journal of Applied Physiology 2006;98(2):202-11.
17. Little JP, Safdar A, Bishop D, Tarnopolsky MA, Gibala MJ. An acute bout of high-intensity interval training increases the nuclear abundance of PGC-1α and activates mitochondrial

biogenesis in human skeletal muscle. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 2011;300(6)R1303-10.
18. Gharakhanlou R, Chadan S, Gardiner P. Increased activity in the form of endurance trainig increases calcitonin gene-related peptide content in lumbar motoneuron cell bodies in the rat. Neuroscience 1999;89(4):1229-39.
19. Glouzon BJ, Barsalani R, Lagacé J, Dionne I. Muscle mass and insulin sensitivity in postmenopausal women after 6-month exercise training. Climacteric 2015;18(6):846-51.
20. Gharakhanlou R, Chadan S, Gardiner P. Increased activity in the form of endurance training increases calcitonin gene-related peptide content in lumbar motoneuron cell bodies and in sciatic nerve in the rat. Neuroscience 1999;89(4):1229-39.
21. Maffiuletti NA, Zory R, Miotti D, Pellegrino MA, Jubeau M, Bottinelli R. Neuromuscular adaptations to electrostimulation resistance training. American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation 2006;85(2):167-75.
22. Silva Neto LS, Karnikowiski MG, Tavares AB, Lima RM. Associação entre sarcopenia, obesidade sarcopênica e força muscular com variáveis relacionadas de qualidade de vida em idosas. Brazilian Journal of Physical Therapy 2012;16:360-7.
23. Bautista-Baños S, Hernandez-Lauzardo AN, Velazquez-Del Valle MG, Hernández-López M, Barka EA, Bosquez-Molina E, et al. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. Crop Protection 2006;25(2):108-18.
24. Chen C, Noland KA, Kalu DN. Modulation of intestinal vitamin D receptor by ovariectomy, estrogen and growth hormone. Mechanisms of Ageing and Development 1997;99(2):109-22.
25. Prestes J, Leite R, Pereira G, Shiguemoto G, Bernardes C, Asano R, et al. Resistance training and glycogen content in ovariectomized rats. International Journal of Sports Medicine 2012;33(07):550-4.
26. Shetta A, Kegere J, Mamdouh W. Comparative study of encapsulated peppermint and green tea essential oils in chitosan nanoparticles: Encapsulation, thermal stability, in-vitro release, antioxidant and antibacterial activities. International Journal of Biological Macromolecules 2019;126:731-42.
27. Kraemer WJ, Ratamess NA, French DN. Resistance training for health and performance. Current Sports Medicine Reports 2002;1(3):165-71.
28. Mejías-Peña Y, Rodriguez-Miguelez P, Fernandez-Gonzalo R, Martínez-Flórez S, Almar M, de Paz JA, et al. Effects of aerobic training on markers of autophagy in the elderly. Age 2016;38(2):1-12.
29. Beauchamp EM, Platanias LC. The evolution of the TOR pathway and its role in cancer. Oncogene 2013;32(34):3923-32.
30. Lenhare L, Crisol BM, Silva VR, Katashima CK, Cordeiro AV, Pereira KD, et al. Physical exercise increases Sestrin 2 protein levels and induces autophagy in the skeletal muscle of old mice. Experimental Gerontology 2017;97:17-21.
31. Forbes SC, Little JP, Candow DG. Exercise and nutritional interventions for improving aging muscle health. Endocrine 2012;42(1):29-38.
32. Gyorkos AM, Spitsbergen JM. GDNF content and NMJ morphology are altered in recruited muscles following high-speed and resistance wheel training. Physiological Reports 2014;2(2):e00235.
33. Li Y-P, Chen Y, John J, Moylan J, Jin B, Mann DL, et al. TNF-α acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. The FASEB Journal 2005;19(3):362-70.
34. Schiffer T, Geisler S, Sperlich B, Strüder H. MSTN mRNA after varying exercise modalities in humans. International Journal of Sports Medicine 2011;32(09):683-7.
35. Mahdavian S, Ghazalian F, ebrahim k, Abed Natanzi H. The Effect of Resistance Training and Vitamin D Supplementation on Fibroblast Growth Factor 23 and Klotho Protein in Male

Rats with Renal Failure. The Scientific Journal of Rehabilitation Medicine 2022.116428.2925.

36. Abbas Saremi, Nader Shavandi, Hajar Vafapour. Eight-week resistance training with vitamin D supplementation in postmenopausal women: Effects on skeletal muscle. Pajoohande 2013;18(2):57-63.
37. Gyorkos AM, McCullough MJ, Spitsbergen JM. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) expression and NMJ plasticity in skeletal muscle following endurance exercise. Neuroscience 2014;257:111-8.
38. Ercan E, Han JM, Di Nardo A, Winden K, Han MJ, Hoyo L, et al. Neuronal CTGF/CCN2 negatively regulates myelination in a mouse model of tuberous sclerosis complex. Journal of Experimental Medicine 2017;214(3):681-697 .