

Research Paper

Effects of Resistance Aerobic Training on the Expression of SEMA3A and NCAM Genes and Proteins in the Soleus Muscle of Male Rats in Different Age Groups



Mohammad Mahdi Bagherpour Tabalvandani<sup>1</sup> , \*Mohammad Reza Fadaei Chafy<sup>1</sup> , Alireza Elmieh<sup>1</sup>

1. Department of Physical Education and Sport Science, Faculty of Humanities, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.



**Citation** Bagherpour Tabalvandani MM, Fadaei Chafy MR, Elmieh A. [Effects of Resistance Aerobic Training on the Expression of SEMA3A and NCAM Genes and Proteins in the Soleus Muscle of Male Rats in Different Age Groups (Persian)]. *Journal of Guilan University of Medical Sciences*. 2022; 31(3):192-205. <https://doi.org/10.32598/JGUMS.31.3.1846.1>

<https://doi.org/10.32598/JGUMS.31.3.1846.1>



Received: 04 Oct 2021

Accepted: 01 May 2022

Available Online: 01 Oct 2022

**Keywords:**

Resistance exercise, Semaphorin-3A, Neural cell adhesion molecule, Neuromuscular junction

**ABSTRACT**

**Background** Exercise and physical activity improve damage and destructive changes in the peripheral nervous system.

**Objective** This study aims to investigate the effects of resistance aerobic training on the expression of SEMA3A and NCAM genes and proteins of soleus muscle in male rats of different age groups.

**Methods** A total of 30 male Wistar rats in three groups of 2-week-old (infant) (n=10), 6-week-old (young) (n=10), and 96-week-old (elderly) (n=10) were divided into two groups of training and control. The training program included 6 days of resistance and aerobic training one day in between. The rats were euthanized and the soleus muscle was extracted 48 h after the last training session. A fluorescent microscope was used to measure SEMA3A and NCAM proteins in muscle fibers. Gene expressions were measured by real-time polymerase chain reaction.

**Results** The results showed that SEMA3A gene expression was not significantly different between exercise and control groups in all three age groups; however, SEMA3A protein expression was significantly reduced in infant and young exercise groups ( $P \leq 0.001$ ). Also, NCAM gene expression was not significantly different between training and control groups in all three age groups; while there was a significant decrease in NCAM protein expression in young and old training groups compared to the control group ( $P \leq 0.001$ ).

**Conclusion** The results showed that resistance aerobic training can inhibit the process of peripheral nerve damage in infant and young rats, as well as the growth and strength of the neuromuscular junction in young and elderly rats.

**\* Corresponding Author:**

Mohammad Reza Fadaei Chafy

Address: Department of Physical Education and Sport Science, Faculty of Humanities, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

Tel: +98 (911) 2346956

E-Mail: mfadaei2000@yahoo.com

## Extended Abstract

### Introduction

**R**egular physical exercise causes extensive molecular, cellular, and tissue adaptations in the human body, especially in the musculoskeletal system and the nerve-to-muscle junction. Studies have shown that the nerve-to-muscle junction has the ability and capacity for morphological changes as a result of muscle activity [1]. Exercise and physical activity prohibit damage and destructive changes in the peripheral nervous system [2, 3]. In this regard, it was found that in the axonal terminals, the expression of a group of axonal conduction syndromes, called Semaphorins can affect neuromuscular connections [4, 5]. SEMA3A is a type of Semaphorin that is expressed in muscle fibers and can cause axons to be expelled from the target tissue [5, 6]. Deschenes et al. (2011) investigated the effect of aging on the adaptation of neuromuscular junction (NMJ) to endurance training. The results showed that NMJ changes and nerve damage in muscle fibers occur before their atrophy. Exercise, on the other hand, delays nerve damage as we age [7]. Ghadiri et al. (2017) investigated the effects of a high-intensity exercise period on SEMA3A (semaphorin-3A) gene expression in the muscles of elderly mice. It was shown that with increasing age, SEMA3A gene expression in the long extensor muscle of the toes increases; however, exercise reduced its expression in both adult and elderly groups [8]. Another important factor involved in axonal growth is the neural adhesion molecules called NCAM. These molecules belong to the large family of immunoglobulins and are expressed only in nerve cells [9]. Recent evidence suggests that NCAM expression in muscle fibers increases following exercise [10]. Caldwell et al. reported a significant increase in NCAM expression by examining early myogenic responses to exercise after 12 weeks of resistance exercise in young men [10]. Considering that, to date, the role of axonal conduction proteins, especially SEMA3A and NCAM as a stimulating factor in neurodevelopment in NMJ following sports adaptations at different ages has not been determined. Therefore, the present study aims to investigate the effects of 6 weeks of resistance aerobics training on the expression of SEMA3A and NCAM genes and proteins in the soleus muscle of male rats in three age groups.

### Methods

This was an experimental study. A total of 30 male Wistar rats in three age groups of 2 weeks (100-150 g), 6 weeks (220-250 g), and 96 weeks (28-320 g) were kept

in an environment with a temperature of  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , the humidity of 45% to 55%, and a 12 h dark cycle. During the research, standard food, pellets, and water were provided to the rats with no limits. After being adopted to the laboratory environment, the animals were divided into 3 groups of infants, young, and elderly in terms of age group, and then randomly divided into 2 groups (control and exercise) in terms of intervention.

### Resistance training

The exercises included 3 training sessions per week (Saturday, Monday, and Wednesday) for 6 weeks, which included 3 sessions and each session included 4 times climbing a special ladder to a height of 1 m with 26 steps of 4 cm. There was a 30 s break for the rats between each exercise session. After attaching the weight to their tails, the rats were forced to climb the ladder. In the first week, the weight attached to the rats' tails was 30% of their body weight, and gradually from the second week it increased to 70%, and in the third week, the weight was 100% of their body weight. In the fourth week, the weight was increased to 120% of their body weight [11].

### Aerobic exercise

At first, the rats were subjected to a program of familiarization with how to work on the turntable for 3 days. Exercises were performed for 3 sessions per week (Sunday, Tuesday, and Thursday) and 3 days of resistance exercises on alternating days for 6 weeks. The intensity of the training in the first week was equal to 25% of the maximum speed of the subjects, and then it reached 50% of the maximum speed in the sixth week [12]. The rats were euthanized in a completely sterile environment 48 h after the last training session. Using a surgical razor, an incision was made in the back of their legs, and the soleus muscle was extracted, and immediately frozen in liquid nitrogen. This was applied to evaluate the expression of genes and proteins. A light microscope was used to measure SEMA3A and NCAM proteins in the muscle fibers. The quantitative polymerase chain reaction (QPCR) method was used to evaluate the expression of SEMA3A and NCAM genes. Meanwhile,  $\beta$ -actin was used as a control gene. One-way analysis of variance (ANOVA) and the Tukey post hoc test were used to determine the significance of the differences between the groups. All statistical studies were performed using the Prism 5 software (Table 1).

**Table 1.** Sequence of Primers

Variables	Sequence of Primers
SEMA3A	F: GGCTCCTGCTTCGTAGTCT R: CTA CTGGACATTTCTTTGGTC
NCAM	F: GCTCATGTGCATCGCTGTTAACC R: CTGTCAGTGGTGGTCTCGTTG

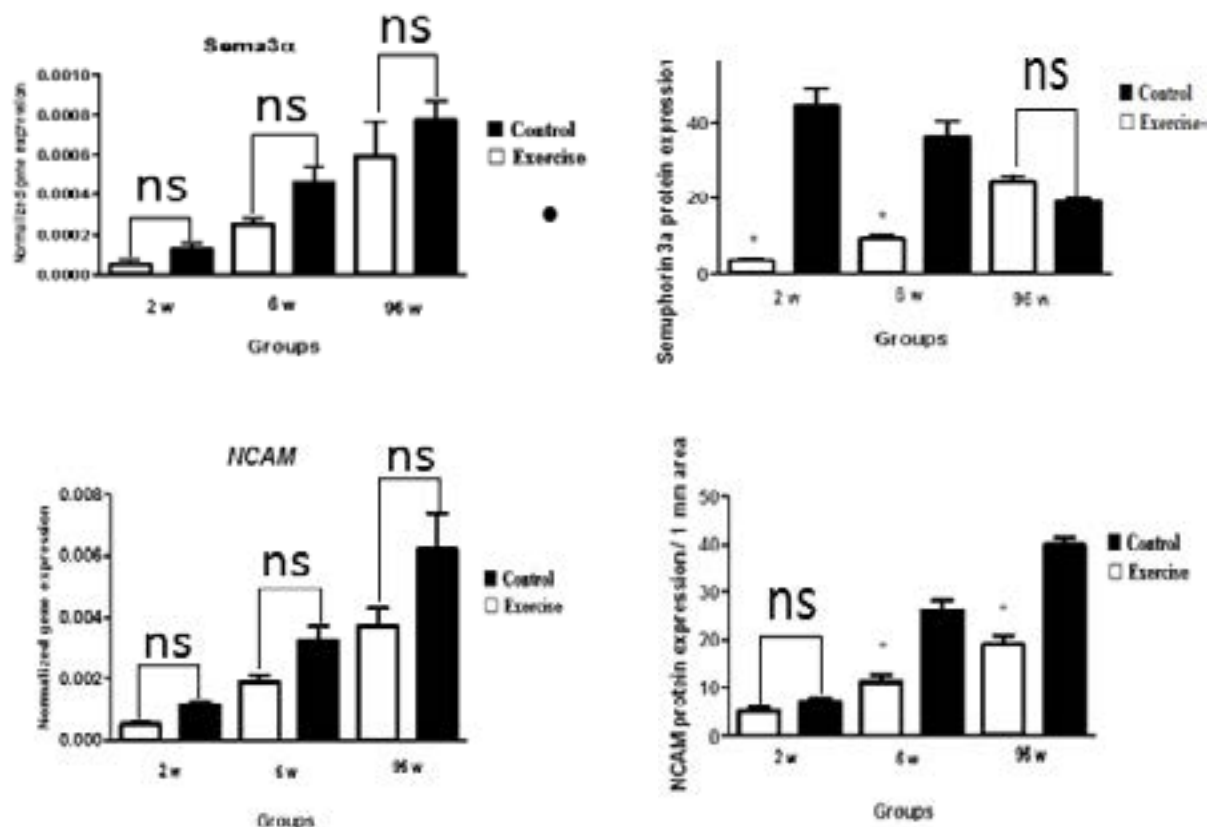
Journal of  
Guilan University of Medical Sciences

## Results

The results of this study showed that the expression of the SEMA3A gene was lower in the training groups compared to the control group in all three age groups; however, this difference was not significant. The results also showed a significant decrease in SEMA3A protein in young and mid-age exercise groups compared to the control group ( $P < 0.001$ ). In the elderly group, the exercise showed a significant increase compared to the control. Regarding NCAM gene expression, the results showed a significant decrease in all three age groups after the exercise. NCAM protein expression was significantly reduced in the exercise groups of mid ( $P < 0.001$ ) and elderly ( $P < 0.001$ ); however, in the young group, this decrease was not significant (Figure 1).

## Discussion

The present study investigated the effects of resistance aerobic training on the expression of SEMA3A and NCAM genes and proteins as two effective factors in altering the nerve fiber supply at NMJ in different age groups. SEMA3A as a repellent protein in various conditions, such as destructive diseases of the central and peripheral nerves and the aging process, destroys motor neurons, especially in the fast-twitch fibers [4]. Therefore, the results of the present study showed that although there was an insignificant decrease in SEMA3A gene expression in all three age groups, its protein levels were significantly reduced in both young and mid-age groups. A significant increase in the expression of this protein was shown in the elderly group. However, Ghadiri



Journal of  
Guilan University of Medical Sciences

**Figure 1.** Comparing the effects of exercise on the expression levels of SEMA3A and NCAM genes

et al. (2017) reported a significant decrease in SEMA3A expression in the long extensor muscle of the fingers in older male rats after 4 weeks of intense intermittent exercise. The reason for this inconsistency may be explained by the type of exercise and the type of studied muscles, as it has been reported that different sports exercises cause different adaptations and results in the soleus muscle [8]. Accordingly, based on the findings, it can be stated that the expression of SEMA3A protein is related to the amount of neuromuscular activity. Following resistance aerobic training, the expression of this protein decreased significantly in the young and mid-age groups. One of the significant findings of the present study was the lack of change in NCAM gene expression in all three age groups and also a significant decrease in its protein expression in both mid-age and elderly groups. In the study of Taybi et al. (2019), which examined the effects of intense intermittent training on the cross-sectional area of muscle fibers and the expression of muscle-destroying genes in the plantaris muscle of elderly rats, they found that aging significantly reduces NCAM, and exercise increased the muscle cross-section and NCAM, which contradicts the findings of the present study [13].

The results of the present study showed that the expression of nerve repellent and healing proteins because of exercise is different at different ages. The expression of SEMA3A in the soleus muscle of infant and young group rats decreased and no significant difference was observed in the elderly. Exercise also decreased NCAM expression in the soleus muscle of young and elderly group rats, but these changes were not significant in the infant group rats.

## Ethical Considerations

### Compliance with ethical guidelines

All the ethical principles of the present study were approved in accordance with the principles of working with laboratory animals, approved by the Ethics Committee of the [Rasht Branch, Islamic Azad University](#), with the Ethics Code IR.IAU.RASHT.REC.1399.029.

### Funding

This research did not receive any grant from funding agencies in the public, commercial, or non-profit sectors.

### Authors' contributions

Study concept and design: Mohammad Mahdi Bagherpour Tabalvandani, Mohammad Reza Fadaei Chafy, Alireza Elmieh; Data acquisition, analysis, or interpretation: Mohammad Mahdi Bagherpour Tabalvandani,

Mohammad Reza Fadaei Chafy, Alireza Elmieh; Drafting of the manuscript: Mohammad Mahdi Bagherpour Tabalvandani; Critical revision of the manuscript for important intellectual content: Mohammad Reza Fadaei Chafy; Statistical analysis: Mohammad Mahdi Bagherpour Tabalvandani, Mohammad Reza Fadaei Chafy, Alireza Elmieh; Study supervision: Mohammad Reza Fadaei Chafy, Alireza Elmieh.

### Conflicts of interest

The authors of this article had no conflict of interest.

### Acknowledgements

The authors of this article consider it necessary to express their sincere thanks and appreciation to the management and staff of the Pasargad Institute of Tissue and Genetics Knowledge-Based Institute.

This Page Intentionally Left Blank

مقاله پژوهشی

تأثیر تمرینات مقاومتی هوازی بر بیان ژن‌ها و پروتئین‌های NCAM و Sema3a در عضله نعلی موش‌های صحرایی نر رده‌های سنی مختلف

محمد مهدی باقرپور طبالوندانی<sup>۱</sup>، \*محمد رضا فدائی چافی<sup>۱</sup>، علیرضا علمیه<sup>۱</sup>

۱. گروه تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.

Use your device to scan and read the article online



**Citation** Bagherpour Tabalvandani MM, Fadaei Chafy MR, Elmieh A. [Effects of Resistance Aerobic Training on the Expression of SEMA3A and NCAM Genes and Proteins in the Soleus Muscle of Male Rats in Different Age Groups (Persian)]. *Journal of Guilan University of Medical Sciences*. 2022; 31(3):192-205. <https://doi.org/10.32598/JGUMS.31.3.1846.1>

<https://doi.org/10.32598/JGUMS.31.3.1846.1>

چکیده

تاریخ دریافت: ۱۲ مهر ۱۴۰۰

تاریخ پذیرش: ۱۱ اردیبهشت ۱۴۰۱

تاریخ انتشار: ۰۹ مهر ۱۴۰۱

**زمینه و روش‌ها:** ورزش و فعالیت بدنی باعث بهبود آسیب و تغییرات تخریبی در سیستم عصبی محیطی می‌شود.

**هدف:** هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر تمرین مقاومتی هوازی بر بیان ژن‌ها و پروتئین‌های سَمافورین ۳ و مولکول‌های چسبان عصبی عضله نعلی موش‌های صحرایی نر رده‌های سنی مختلف بود.

**مواد و روش‌ها:** ۳۰ سر موش صحرایی نر ویستار در ۳ گروه کودک ۲ هفته‌ای (n=۱۰)، جوان ۶ هفته‌ای (n=۱۰) و سالمند ۹۶ هفته‌ای (n=۱۰) در ۲ گروه آزمایش و کنترل قرار گرفتند. برنامه تمرینی شامل ۶ روز تمرینات مقاومتی و هوازی به صورت یک روز در میان بود. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، موش‌ها قربانی و عضله نعلی استخراج شد و بیان ژن و پروتئین‌های سَمافورین ۳ و مولکول‌های چسبان عصبی به ترتیب با روش‌های Real Time PCR و هیستوشیمی اندازه‌گیری شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد بیان ژنی سَمافورین ۳ بین گروه‌های آزمایش و کنترل در هر ۳ رده سنی تفاوت معنی‌داری نداشت، اما بیان پروتئین سَمافورین ۳ در گروه‌های آزمایش کودک و جوان ( $P \leq 0.001$ ) به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود. همچنین بیان ژنی مولکول‌های چسبان عصبی بین گروه‌های آزمایش و کنترل در هر ۳ رده سنی تفاوت معنی‌داری نداشت، در حالی که بیان پروتئین مولکول‌های چسبان عصبی در گروه‌های آزمایش جوان و سالمند ( $P \leq 0.001$ ) به طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود.

**نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد تمرین مقاومتی هوازی می‌تواند موجب مهار فرایند تخریب اعصاب محیطی موش‌های کودک و جوان و همچنین رشد و استحکام پیوندگاه عصبی-عضلانی موش‌های جوان و سالمند شود.

کلیدواژه‌ها:

تمرین مقاومتی، semaphorin-3A، Neural Cell Adhesion Molecule، پیوندگاه عصبی-عضلانی

\* نویسنده مسئول:

محمد رضا فدائی چافی

نشانی: رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت، دانشکده علوم انسانی، گروه تربیت‌بدنی و علوم ورزشی.

تلفن: ۲۳۴۶۹۵۶ (۹۱۱) ۰۹۸+

رایانامه: mfadaei2000@yahoo.com

## مقدمه

عوامل مهم درگیر در رشد آکسونی، مولکول‌های چسبان عصبی<sup>۳</sup> هستند. این مولکول‌ها از خانواده بزرگ ایمونوگلوبین‌ها بوده و تنها در سلول‌های عصبی بیان می‌شوند. پروتئین‌های مولکول‌های چسبان عصبی در سیستم عصبی مرکزی و محیطی یافت شده و در اتصال سلول به سلول در دوران جنینی نقش مهمی ایفا می‌کنند [۱۲]. به نظر می‌رسد یکی از فاکتورهای دخیل در نارسایی‌های عصبی‌عضلانی کاهش مولکول‌های چسبان عصبی باشد. شواهد اخیر حاکی از آن است که بیان مولکول‌های چسبان عصبی در فیبرهای عضلانی، متعاقب فعالیت‌های ورزشی افزایش می‌یابد [۱۳].

تمرین استقامتی می‌تواند باعث افزایش قابل توجه پایانه عصبی و همچنین حفظ صفحه انتهایی اتصال عصبی‌عضلانی شود [۱۴]. همچنین گزارش شده است که ورزش تغییرات مورفولوژیک و تخریب اعصاب عضلات اسکلتی در موش‌های سالمند را کاهش می‌دهد. بنابراین چنین استنباط می‌شود که تمرین استقامتی در موش‌های سالمند تا حدودی تغییرات مرتبط با سن در پیوندگاه عصبی‌عضلانی را معکوس می‌کند [۱۵]. کالدو و همکاران با بررسی پاسخ‌های میوژنیک اولیه به ورزش پس از ۱۲ هفته ورزش مقاومتی در مردان جوان، افزایش معنی‌دار در بیان مولکول‌های چسبان عصبی را گزارش کردند [۱۳].

در پژوهشی دیگر که طیبه و همکاران (۲۰۱۹) با هدف بررسی تأثیر تمرین تناوبی شدید بر سطح مقطع تارهای عضلانی و بیان ژن تخریب‌کننده عضلات در عضله پلانتاریس موش‌های سالمند انجام دادند، نشان دادند افزایش سن، مولکول‌های چسبان عصبی را به میزان قابل توجهی کاهش داده و تمرین ورزشی به افزایش سطح مقطع عضلانی و افزایش غیر معنی‌دار مولکول‌های چسبان عصبی منجر شد [۱۶]. با توجه به اینکه تا به امروز نقش پروتئین‌های هدایت آکسونی به‌ویژه مولکول‌های چسبان عصبی و سمافورین ۳ به‌عنوان فاکتور محرک توسعه عصبی در پیوندگاه عصبی‌عضلانی متعاقب سازگاری‌های ورزشی در سنین مختلف مشخص نشده است، پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر ۶ هفته تمرین مقاومتی هوازی بر بیان ژن‌ها و پروتئین‌های سمافورین ۳ و مولکول‌های چسبان عصبی در عضله نعلی موش‌های صحرائی نر در ۳ رده سنی کودک، جوان و سالمند انجام شده است.

## روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربی بود. ۳۰ سر موش صحرائی نر نژاد ویستار در ۳ رده سنی ۲ هفته‌ای (۱۰۰ تا ۱۵۰ گرم)، ۶ هفته‌ای (۲۲۰ تا ۲۵۰ گرم) و ۹۶ هفته‌ای (۲۸۰ تا ۳۲۰ گرم) در محیطی با دمای  $23 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۴۵ تا ۵۵ درصد و چرخه تاریکی به روشنایی ۱۲:۱۲ ساعته نگهداری شدند [۱۷]. در طی پژوهش غذای استاندارد پلت و آب به‌صورت آزاد

فعالیت بدنی منظم و تمرینات ورزشی باعث بروز سازگاری‌های مولکولی، سلولی و بافتی گسترده‌ای در بدن انسان به‌ویژه سیستم عصبی‌عضلانی و محل اتصال عصب به عضله می‌شود. از جمله آثار فعالیت بدنی منظم می‌توان به هایپرتروفی محل اتصال عصب به عضله<sup>۱</sup> و بهبود آسیب‌های اعصاب محیطی اشاره کرد. از سوی دیگر کاهش و یا عدم فعالیت بدنی می‌تواند باعث تغییرات تخریبی در محل اتصال عصب به عضله شود. مطالعات نشان داده است اتصال عصب به عضله در اثر فعالیت عضلانی قابلیت و ظرفیت تغییرات مورفولوژیکی دارد [۱]. ورزش و فعالیت بدنی باعث بهبود آسیب و تغییرات تخریبی در سیستم عصبی محیطی می‌شود [۲، ۳]. رشد و ترمیم نرون‌ها به بیان فاکتورهای رشد و هدایت عصبی وابسته است. اولین آکسون با افزایش بیان فاکتورهای رشد و هدایت آکسونی، شروع به جوانه زدن کرده و از میان ماتریکس خارج سلولی عبور می‌کند. آکسون‌های بعدی از این مسیر باز شده جهت عبور از میان ماتریکس خارج سلولی نیز استفاده می‌کنند [۴]. در همین راستا مشخص شد که در پایانه‌های آکسونی، بیان دسته‌ای از نشانگان هدایت آکسونی به نام سمافورین‌ها می‌توانند بر اتصالات عصبی‌عضلانی اثر بگذارند [۵، ۶].

سمافورین‌ها در سیستم عصبی، ایمنی و قلبی‌عروقی پستانداران مختلف بیان می‌شوند که می‌توانند نقش دفع و یا جذب‌کننده آکسون‌ها به بافت هدف را ایفا کنند. سمافورین ۳ یکی از انواع سمافورین‌هاست که در تارهای عضلانی بیان می‌شود و می‌تواند موجب دفع آکسون از بافت هدف شود [۶، ۷]. نشان داده شده است که فعالیت ورزشی با ایجاد یک مکانیسم غیرتهاجمی می‌تواند در برابر بیماری‌ها و ناتوانی‌های عصبی‌عضلانی محافظت کند. همچنین فعالیت ورزشی برای حفظ عملکرد و ساختار سیناپس و به‌ویژه بازسازی نرون‌های آسیب‌دیده از اهمیت بسزایی برخوردار است [۸، ۹]. در تحقیق دیشن و همکاران (۲۰۱۱) با هدف بررسی اثر پیری بر سازگاری اتصال عصب به عضله، با تمرینات استقامتی نشان داده شده است که تغییرات اتصال عصب به عضله و تخریب عصب در تارهای عضلانی، قبل از اتروپی آنها اتفاق می‌افتد. این در حالی است که فعالیت ورزشی باعث به تأخیر افتادن تخریب عصب در پی افزایش سن می‌شود [۱۰]. در تحقیق قدیری و همکاران (۱۳۹۶) با هدف بررسی تأثیر یک دوره تمرین ورزشی با شدت بالا بر بیان ژن سمافورین ۳ در عضلات موش‌های سالمند، نشان داده شد با افزایش سن بیان ژن سمافورین ۳ در عضله بازکننده طولی انگشتان پا افزایش می‌یابد. با این حال تمرین موجب کاهش بیان آن در هر دو گروه بالغ و سالمند شد [۱۱]. یکی دیگر از

1. Neuromuscular Junction (NMJ)
2. Semaphorin 3a (Sema3a)

3. Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM)

جدول ۱. توالی پرایمرها

متغیر	توالی پرایمر
Sema3a	F: GGCTCCTGCTTCGTAGTCT R: CTACTGGACATTTCTTTGGTC
NCAM	F: GCTCATGTGCATCGCTGTTAACC R: CTGTCAGTGGTGTGGTCTCGTTG

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان

بودند در پارافین قالب‌گیری و به قطعاتی با ضخامت ۵ میکرومتر برش داده شدند. سپس با هماتوکسیلین<sup>۴</sup> و ائوزین<sup>۵</sup> رنگ‌آمیزی شدند. عکس‌های فتومیوگرافی با استفاده از میکروسکوپ نوری طیف عادی Olympus DP72 با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر با دوربین دیجیتال (Olympus, Tokyo, Japan) گرفته شد. پس از عکس‌برداری، اندازه‌گیری سطح مقطع تار عضلانی با استفاده از ورژن 4.1.1.0 نرم‌افزار دی جی مایزر<sup>۶</sup> انجام شد. به‌طور میانگین ۱۵۰ تا ۲۰۰ تار عضلانی از هر عضله برای مشخص کردن اندازه سطح مقطع عرضی، تجزیه و تحلیل شد.

به‌منظور بررسی بیان ژن مولکول‌های چسبان عصبی و سمافورین a3 از روش<sup>۷</sup> QPCR و از ژن رفرنس بتا actin به‌عنوان ژن کنترل استفاده شد. در تکنیک Real-Time PCR پرایمرها به روش SYBER Green I طراحی شدند. به‌منظور انجام این تکنیک ابتدا طراحی پرایمر (جدول شماره ۱) ساخت شرکت سیناکلون ایران انجام شد و سپس<sup>۸</sup> RNA<sup>۹</sup> کل از بافت‌ها استخراج و به cDNA<sup>۱۰</sup> تبدیل شد. غلظت و خلوص RNA استخراج‌شده با اسپکتروفوتومتر نانودراپ تعیین شد. برای ساخت cDNA از کیت سنتز cDNA مدل k1622 ساخت شرکت Thermo Scientific کشور آمریکا استفاده شد. سپس cDNA به روش PCR تکثیر شد و از نظر بیان ژن‌های ذکر شده بررسی شد. نسبت بیان ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه با روش مقایسه‌ای چرخه آستانه<sup>۱۰</sup> ارزیابی شد.

جهت تعیین معنی‌دار بودن تفاوت بین گروه‌ها از تحلیل واریانس یک‌طرفه (آنووا) و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. مقادیر  $P \leq 0.05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد. کلیه بررسی‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار Prism 5 Graph Pad انجام شد.

در اختیار آن‌ها قرار گرفت. حیوانات پس از آشناسازی با محیط آزمایشگاهی از لحاظ رده سنی به ۳ گروه کودک، جوان و پیر و از لحاظ مداخله به ۲ گروه کنترل و آزمایش به‌صورت تصادفی تقسیم شدند.

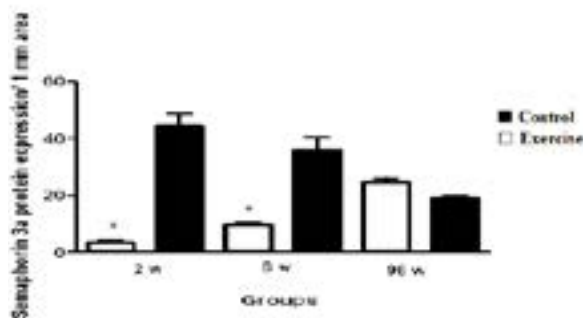
تمرین مقاومتی: تمرین مقاومتی شامل ۳ جلسه تمرین در هفته (شنبه، دوشنبه و چهارشنبه) به مدت ۶ هفته بود که شامل ۳ نوبت و هر نوبت ۴ بار بالا رفتن از نردبان مخصوص به ارتفاع یک متر دارای ۲۶ پله با فاصله ۴ سانتی‌متر از هم بود. بین هر نوبت تمرین ۳۰ ثانیه استراحت برای حیوانات در نظر گرفته شد. پس از بستن وزنه به دم حیوانات، آن‌ها وادار به صعود از نردبان شدند. در هفته اول میزان وزنه بسته‌شده به دم حیوان ۳۰ درصد وزن بدن آن‌ها بود و به‌تدریج از هفته دوم ۷۰ درصد هفته سوم ۱۰۰ درصد و هفته چهارم ۱۲۰ درصد وزن بدن آن‌ها بود و تا پایان هفته ششم این بار تمرینی حفظ شد [۱۸].

تمرین هوازی: در ابتدا نمونه‌ها ۳ روز تحت برنامه آشنایی با نحوه فعالیت روی نوار گردان قرار گرفتند. سپس موش‌ها جهت انجام تست واماندگی با سرعت ۲ متر بر دقیقه شروع به دویدن کردند و هر ۲ دقیقه ۲ متر بر دقیقه بر سرعت ترمیم افزوده شد. این روند افزایش سرعت تا جایی ادامه پیدا کرد که موش‌ها دیگر قادر به ادامه حرکت روی تردمیل نبودند و وامانده شدند. سپس بلافاصله لاکتات خون هر یک از آزمودنی‌ها اندازه‌گیری و به همراه سرعت پیشینه آن‌ها ثبت شد. در نهایت میانگین مقادیر به‌دست‌آمده سرعت در هر رده سنی به‌عنوان حداکثر شدت فعالیت ورزشی ثبت شد. پس از ۴۸ ساعت تمرینات برای ۳ جلسه در هفته (یکشنبه، سه‌شنبه و پنجشنبه) و در روزهای متناوب با تمرینات مقاومتی و به مدت ۶ هفته انجام شد. شدت تمرین در هفته اول معادل ۲۵ درصد حداکثر سرعت آزمودنی‌ها بود که به ۵۰ درصد حداکثر سرعت در هفته ششم رسید [۱۹].

۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، موش‌ها قربانی شدند و در محیط کاملاً استریل با استفاده از تیغ جراحی و ایجاد برش در قسمت خلفی ساق پای آن‌ها، عضلات نعلی استخراج شد و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد و جهت انجام آزمایش‌ها و بررسی بیان ژن‌ها و پروتئین‌ها استفاده شدند. به‌منظور اندازه‌گیری پروتئین‌های مولکول‌های چسبان عصبی و سمافورین a3 تارهای عضلانی نمونه‌های عضلانی که در فرمالین ۱۰ درصد فیکس شده

4. Hematoxylin
5. Eosin
6. Digimizer v. 4.1.1.0, Medcalc Software
7. Quantitative Polymerase Chain Reaction
8. Ribonucleic acid
9. Complementary Deoxyribonucleic acid
10. Threshold Cycle (CT)





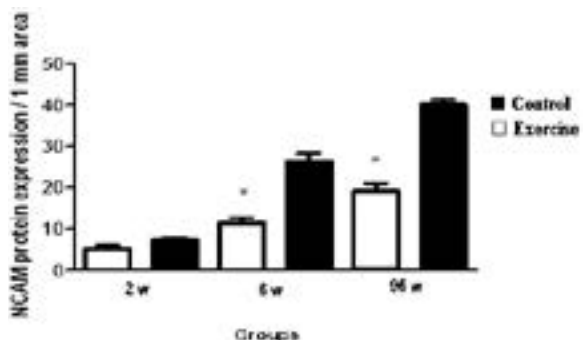
**تصویر ۲.** بیان پروتئین سمافورین a3 در گروه‌های پژوهش  
\* تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل ( $P \leq 0.05$ )  
W: هفته، Exercise: گروه آزمایش، Control: گروه کنترل

بیشتر از جمله بافت‌های تمرین کرده این میزان از پروتئین کاهش یافت، اما حضور این پروتئین در سیتوپلاسم سلول‌های عضلانی و در لایه‌های بافتی عضله در گروه‌های با فعالیت بیشتر کمتر بود (تصویر شماره ۱).

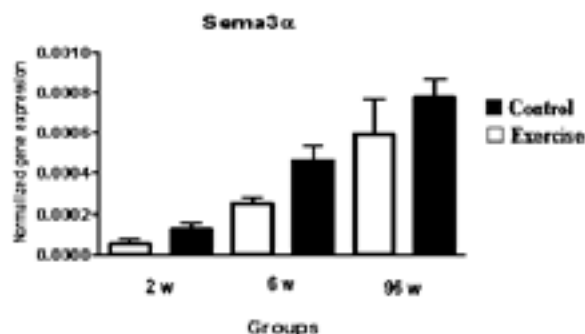
در خصوص بیان ژنی مولکول‌های چسبان عصبی نتایج نشان داد هر ۳ رده سنی بین گروه‌های آزمایش و کنترل تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (تصویر شماره ۳).

همان‌طور که در تصویر شماره شماره ۴ نشان داده شده است، بیان پروتئین مولکول‌های چسبان عصبی در گروه‌های جوان آزمایش نسبت به کنترل ( $26/45 \pm 2/335$ ) در برابر ( $40/11 \pm 2/318$ ) و سالمند ( $11/54 \pm 2/001$ ) ( $P \leq 0.001$ ) و سالمند ( $19/35 \pm 2/781$ ) ( $P \leq 0.01$ ) به‌طور معنی‌داری کمتر بود، اما در گروه کودک آزمایش نسبت به کنترل تفاوت معنی‌دار نبود.

میزان بیان پروتئین مولکول‌های چسبان عصبی در بافت عضله با رنگ سبز که به دلیل واکنش آنتی‌ژن با آنتی‌بادی مربوطه بوده ارزیابی شد. در این بخش از مطالعه مشخص شد که در بافت‌های با فعالیت بیشتر، از جمله در بافت ورزش کرده این میزان از پروتئین کمتر بود (تصویر شماره ۲).



**تصویر ۴.** بیان پروتئین مولکول‌های چسبان عصبی در گروه‌های پژوهش  
\* معنی‌داری نسبت به گروه کنترل ( $P \leq 0.05$ )  
W: هفته، Exercise: گروه آزمایش، Control: گروه کنترل



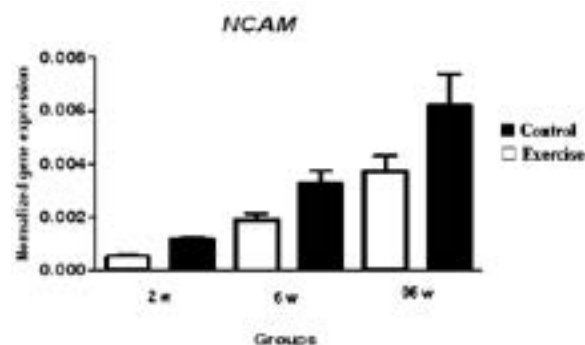
**تصویر ۱.** بیان ژن سمافورین a3 در گروه‌های پژوهش  
W: هفته، Exercise: گروه آزمایش، Control: گروه کنترل

## یافته‌ها

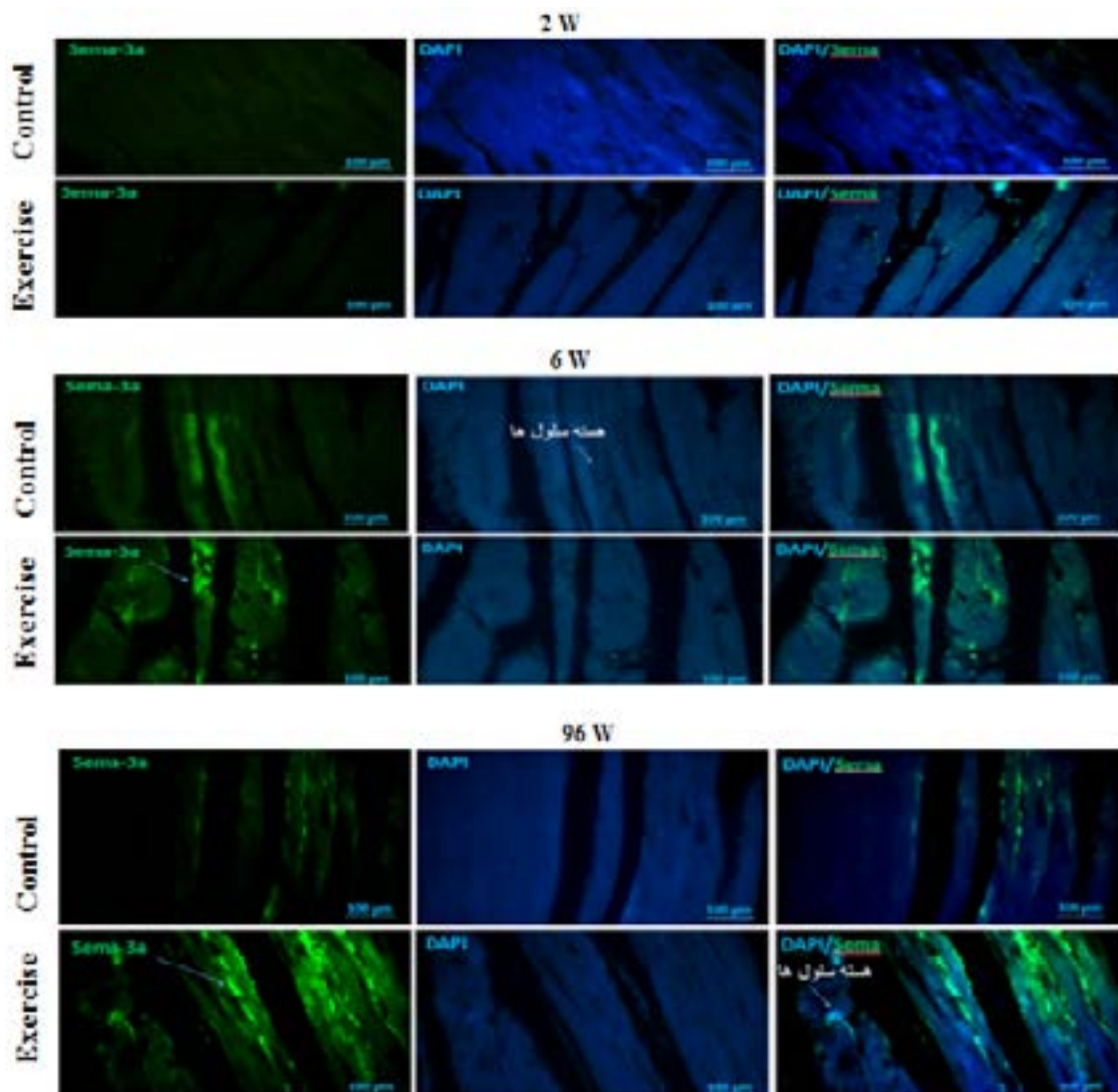
وزن آزمودنی‌های گروه آزمایش کودک در هفته اول  $30/4 \pm 1/6$  گرم بود و در هفته ششم به  $179/6 \pm 24/4$  گرم رسید. وزن گروه جوان هفته اول  $152/2 \pm 5/7$  گرم بود و در هفته ششم به  $249/2 \pm 22/8$  گرم رسید و گروه سالمند در هفته اول و هفته ششم به ترتیب  $324 \pm 16/7$  گرم و  $336 \pm 118/7$  گرم بود. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که بیان ژن سمافورین a3 در گروه‌های آزمایش نسبت به گروه‌های کنترل در هر ۳ رده سنی کمتر بود، اما این تفاوت معنی‌دار نبود (تصویر شماره ۱).

بیان پروتئین سمافورین a3 در تصویر شماره ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد بیان این پروتئین در گروه‌های کودک آزمایش نسبت به کنترل ( $44/54 \pm 7/499$ ) در برابر ( $3/333 \pm 1/528$ ) و جوان ( $36/04 \pm 7/996$ ) در برابر ( $9/667 \pm 1/528$ ) به‌طور معنی‌داری کمتر بود ( $P \leq 0.001$ ). اما در گروه سالمند آزمایش نسبت به کنترل، تفاوت معنی‌دار نبود.

میزان بیان پروتئین سمافورین a3 در بافت با رنگ سبز که به دلیلی واکنش آنتی‌ژن با آنتی‌بادی مربوطه بود، ارزیابی شد. در این بخش از مطالعه مشخص شد که در بافت‌های با فعالیت



**تصویر ۳.** بیان ژن مولکول‌های چسبان عصبی گروه‌های پژوهش  
W: هفته، Exercise: گروه آزمایش، Control: گروه کنترل



تصویر ۵. بیان پروتئین سمافورین a3 در عضله نعلی  
W: هفته Exercise: گروه آزمایش Control: گروه کنترل

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان

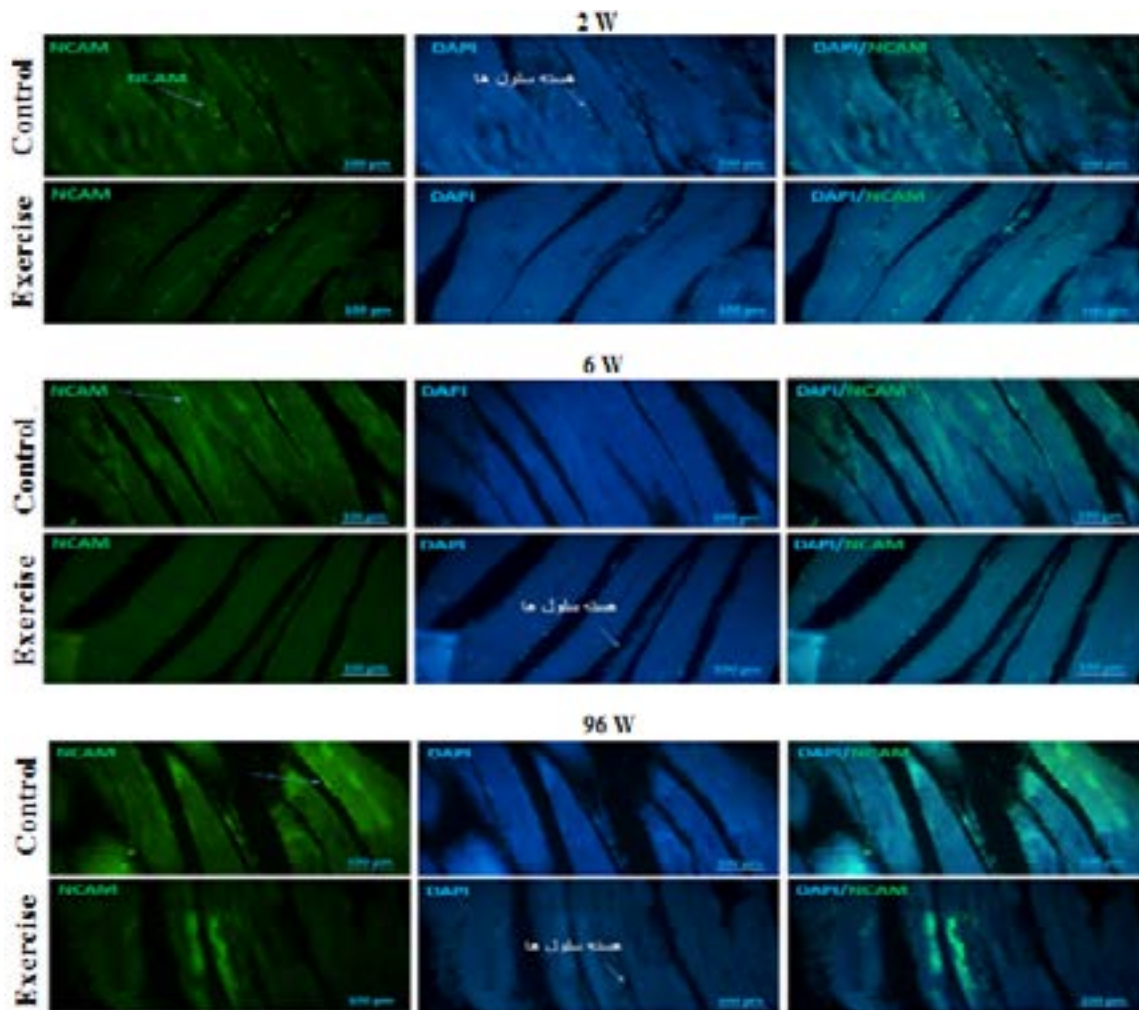
در هر ۳ رده سنی گروه آزمایش به طور معنی داری کمتر بود، اما مقادیر پروتئین آن‌ها در گروه آزمایش در مقایسه با گروه کنترل در ۲ رده سنی کودک و جوان به طور معنی داری کمتر بود.

این در حالی است که قدیری و همکاران (۱۳۹۶) در عضله بازکننده طویل انگشتان در موش‌های صحرایی نر پیر متعاقب ۴ هفته تمرین تناوبی شدید، کاهش معنی دار بیان سمافورین a3 را گزارش کرده‌اند. علت این ناهمسو بودن را شاید بتوان در نوع تمرین ورزشی و نوع عضله مورد پژوهش جست‌وجو کرد. چراکه گزارش شده است تمرینات مختلف ورزشی موجب ایجاد سازگاری‌ها و نتایج مختلفی در عضله نعلی می‌شود [۲۰]. براساس یافته‌های به دست آمده در این خصوص می‌توان چنین اظهار کرد که بیان پروتئین سمافورین a3 با میزان فعالیت‌های عصبی-عضلانی مرتبط است. به طوری که در پی تمرینات

در تصویر شماره ۵ و ۶ به ترتیب بیان پروتئین سمافورین a3 در عضله نعلی و بیان پروتئین مولکول‌های چسبان عصبی در عضله نعلی نشان داده شده است.

### بحث و نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر اثر تمرین مقاومتی هوازی بر بیان ژن‌ها و پروتئین‌های سمافورین a3 و مولکول‌های چسبان عصبی را به عنوان ۲ عامل مؤثر در تغییر عصب‌رسانی تارهای عضلانی در محل اتصال عصب به عضله در رده‌های سنی مختلف بررسی کرده است. سمافورین a3 به عنوان پروتئین دفع کننده در شرایط مختلف، از قبیل بیماری‌های مخرب اعصاب مرکزی و اعصاب محیطی و همچنین فرایند پیری موجب تخریب نرون‌های حرکتی به خصوص در تارهای تند انقباض می‌شود [۵]. نتایج پژوهش حاضر نشان داد با وجود اینکه بیان ژنی سمافورین a3



مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان

تصویر ۶. بیان پروتئین مولکول‌های چسبان عصبی در عضله نعلی ۶ هفته: Exercise: گروه آزمایش Control: گروه کنترل

در تضاد با یافته‌های پژوهش حاضر می‌توان به مطالعاتی اشاره کرد که فعالیت‌های ورزشی عمدتاً باعث هایپر تروفی اتصال عصب به عضله عضلات نعلی در موش‌های صحرائی شده و همچنین موجب افزایش شاخه‌های سیناپسی در انتهای اعصاب شده است [۱۰]. طیبی و همکاران (۲۰۱۹) با هدف بررسی تأثیر تمرین تناوبی شدید بر سطح مقطع تارهای عضلانی و بیان ژن تخریب‌کننده عضلات در عضله پلاتناریس موش‌های سالمند، نشان دادند که افزایش سن، مولکول‌های چسبان عصبی را به میزان قابل توجهی کاهش داد و تمرین ورزشی به افزایش سطح مقطع عضلات و افزایش مولکول‌های چسبان عصبی هرچند غیرمعنی‌دار منجر شد که با یافته‌های پژوهش حاضر مغایرت دارد [۱۶]. همچنین ترابی‌مهر و همکاران (۱۳۹۹) نشان دادند که ورزش موجب افزایش بیان پروتئین مولکول‌های چسبان عصبی در محل اتصال عصب به عضله در عضلات نعلی شد [۲۴]. از سوی دیگر با توجه به اینکه ورزش‌های مختلف موجب سازگاری‌های متفاوتی در عضله نعلی می‌شود، شاید بتوان دلیل کاهش بیان

مقاومتی‌هاواری بیان این پروتئین در رده‌های سنی کودک و جوان به‌طور چشمگیری کمتر بود. مطالعات همسو با این یافته نشان داده‌اند که شاخه‌زایی پایانه‌های عصبی در نرون‌های حرکتی تارهای کندانقباض اتفاق می‌افتد [۲۱].

نرون‌های حرکتی تارهای کندانقباض برخلاف نرون‌های حرکتی تارهای تندانقباض، فعالیت بیشتری در طی روز از خود نشان می‌دهند و در نتیجه انتقال عصبی عضلانی این تارها بیشتر است [۲۲، ۲۳]. از طرف دیگر مطالعات نشان داده‌اند که بیان ژن سمافورین a3 در اتصال عصب به عضله تارهای عضلانی کندانقباض بسیار کمتر است [۵]. بنابراین با توجه به کندانقباض بودن بیشتر تارها در عضله نعلی، این احتمال وجود دارد که کاهش غیر معنی‌دار در بیان ژنی سمافورین a3 بر اثر تمرین ورزشی در هر ۳ رده سنی موش‌های پژوهش حاضر باشد. از یافته‌های قابل توجه پژوهش حاضر عدم تغییر بیان ژنی مولکول‌های چسبان عصبی در هر ۳ رده سنی و نیز کاهش چشمگیری و معنی‌دار بیان پروتئین آن در ۲ رده جوان و سالمند بود.

پروتئین مولکول‌های چسبان عصبی را در نوع تمرین اعمال شده در پژوهش حاضر دانست. همچنین در تحقیقات گذشته مطرح شده است که تمرینات اجباری تقاضا برای جذب مواد غذایی و تولید متابولیت را افزایش می‌دهد که احتمالاً باعث اثرات معکوس بر بیان پروتئین مولکول‌های چسبان عصبی می‌شود [۲۰].

به‌طور کلی نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بیان پروتئین‌های دفع‌کننده و بهبوددهنده عصب تحت تأثیر تمرین ورزشی در سنین مختلف متفاوت است. به‌طوری‌که بیان سماغورین a3 عضله نعلی موش‌های کودک و جوان کمتر بود و در رده سنی سالمند تفاوت چشمگیری مشاهده نشد. همچنین تمرین ورزشی موجب کاهش بیان مولکول‌های چسبان عصبی در عضله نعلی موش‌های جوان و سالمند شد، ولی این تغییرات در رده سنی کودک قابل توجه نبود.

## ملاحظات اخلاقی

### پیروی از اصول اخلاق پژوهش

کلید اصول اخلاقی پژوهش حاضر مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت با کد اخلاق IR.IAU.RASHT.REC.1399.029 تأیید شد.

### حامی مالی

این مقاله برگرفته از رساله دکتری آقای محمدمهدی باقرپور در دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت، دانشکده علوم انسانی، گروه تربیت‌بدنی است و حامی مالی نداشت.

### مشارکت‌نویسندگان

مفهوم‌سازی و طراحی مطالعه: محمدمهدی باقرپور طبالوندانی، محمدرضا فدائی چافی، علیرضا علمیه؛ تحلیل و تفسیر داده‌ها: محمدمهدی باقرپور طبالوندانی، محمدرضا فدائی چافی؛ تهیه پیش‌نویس دست‌نوشته: محمدمهدی باقرپور طبالوندانی؛ بازبینی نقادانه دست‌نوشته برای محتوای فکری مهم: محمدرضا فدائی چافی، علیرضا علمیه؛ تحلیل آماری: محمدمهدی باقرپور طبالوندانی، محمدرضا فدائی چافی.

### تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند از مدیریت و پرسنل محترم مؤسسه دانش‌بنیان بافت و ژنتیک پاسارگاد صمیمانه تشکر و قدردانی کنند.

## References

- [1] Deschenes MR, Kressin KA, Garratt RN, Leathrum CM, Shafrey EC. Effects of exercise training on neuromuscular junction morphology and pre-to post-synaptic coupling in young and aged rats. *Neuroscience*. 2016; 316:167-77. [DOI:10.1016/j.neuroscience.2015.12.004] [PMID] [PMCID]
- [2] Nishimune H, Stanford JA, Mori Y. Role of exercise in maintaining the integrity of the neuromuscular junction. *Muscle & Nerve*. 2014; 49(3):315-24. [DOI:10.1002/mus.24095] [PMID] [PMCID]
- [3] Li Y, Thompson WJ. Nerve terminal growth remodels neuromuscular synapses in mice following regeneration of the postsynaptic muscle fiber. *The Journal of Neuroscience*. 2011; 31(37):13191-203. [DOI:10.1523/JNEUROSCI.2953-11.2011] [PMID] [PMCID]
- [4] Raper J, Mason C. Cellular strategies of axonal pathfinding. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2010; 2(9):a001933. [DOI:10.1101/cshperspect.a001933] [PMID] [PMCID]
- [5] 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. [DOI:10.1016/j.mcn.2006.03.002] [PMID]
- [6] Venkova K, Christov A, Kamaluddin Z, Kobalka P, Siddiqui S, Hensley K. Semaphorin 3A signaling through neuropilin-1 is an early trigger for distal axonopathy in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuro-pathology & Experimental Neurology*. 2014; 73(7):702-13. [DOI:10.1097/NEN.000000000000086] [PMID] [PMCID]
- [7] Vo TT. Studies on semaphorin 3A in the neuromuscular junction and in perineuronal nets [PhD dissertation]. Amsterdam: Vrije Universiteit; 2011. [Link]
- [8] 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. [DOI:10.1016/j.neuroscience.2013.10.068] [PMID] [PMCID]
- [9] Smith MB, Mulligan N. Peripheral neuropathies and exercise. *Topics in Geriatric Rehabilitation*. 2014; 30(2):131-47. [DOI:10.1097/TGR.000000000000013] [PMID]
- [10] Deschenes MR, Roby MA, Glass EK. Aging influences adaptations of the neuromuscular junction to endurance training. *Neuroscience*. 2011; 190:56-66. [DOI:10.1016/j.neuroscience.2011.05.070] [PMID] [PMCID]
- [11] Ghadiri Hormati L, Aminaei M, Dakhili AB. [The effect of high-intensity exercise training on gene expression of semaphorin 3A in extensor digitorum longus muscles of aged C57bl/6 mice (Persian)]. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 2017; 25(1):92-102. [DOI:10.29252/sjimu.25.1.92]
- [12] Franz CK, Rutishauser U, Rafuse VF. Intrinsic neuronal properties control selective targeting of regenerating motoneurons. *Brain*. 2008; 131(6):1492-505. [DOI:10.1093/brain/awn039] [PMID]
- [13] Caldow MK, Thomas EE, Dale MJ, Tomkinson GR, Buckley JD, Cameron-Smith D. Early myogenic responses to acute exercise before and after resistance training in young men. *Physiological Reports*. 2015; 3(9):e12511. [DOI:10.14814/phy2.12511] [PMID] [PMCID]
- [14] Deschenes M, Tenny K, Wilson M. Increased and decreased activity elicits specific morphological adaptations of the neuromuscular junction. *Neuroscience*. 2006; 137(4):1277-83. [DOI:10.1016/j.neuroscience.2005.10.042] [PMID]
- [15] Valdez G, Tapia JC, Kang H, Clemenson GD, Gage F, Lichtman JW, et al. Attenuation of age-related changes in mouse neuromuscular synapses by caloric restriction and exercise. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010; 107(33):14863-8. [DOI:10.1073/pnas.1002220107] [PMID] [PMCID]
- [16] Tayebi SM, Siahkhouian M, Keshavarz M, Yousefi M. The effects of high-intensity interval training on skeletal muscle morphological changes and denervation gene expression of aged rats. *Montenegrin Journal of Sports Science and Medicine*. 2019; 8(2):39-45. [DOI:10.26773/mjssm.190906]
- [17] Sengupta P. A scientific review of age determination for a laboratory rat: How old is it in comparison with human age. *Biomed International*. 2011; 2(2):81-9. [Link]
- [18] Kim H-J, So B, Son JS, Song HS, Oh SL, Seong JK, et al. Resistance training inhibits the elevation of skeletal muscle derived-BDNF level concomitant with improvement of muscle strength in Zucker diabetic rat. *Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry*. 2015; 19(4):281-8. [DOI:10.5717/jenb.2015.15112402] [PMID] [PMCID]
- [19] Tsumiyama W, Oki S, Tamaru M, Ono T, Shimizu ME, Otsuka A. Evaluation of the lactate threshold of rats using external jugular vein catheterization. *Journal of Physical Therapy Science*. 2012; 24(11):1107-9. [DOI:10.1589/jpts.24.1107]
- [20] Deschenes MR, Judelson DA, Kraemer WJ, Meskaitis VJ, Volek JS, Nindl BC, et al. Effects of resistance training on neuromuscular junction morphology. *Muscle & Nerve*. 2000; 23(10):1576-81. [DOI:10.1002/1097-4598(200010)23:103.0.CO;2-J]
- [21] Aagaard P, Suetta C, Caserotti P, Magnusson SP, Kjær M. Role of the nervous system in sarcopenia and muscle atrophy with aging: Strength training as a countermeasure. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. 2010; 20(1):49-64. [DOI:10.1111/j.1600-0838.2009.01084.x] [PMID]
- [22] Eken T, Elder GC, Lømo T. Development of tonic firing behavior in rat soleus muscle. *Journal of Neurophysiology*. 2008; 99(4):1899-905. [DOI:10.1152/jn.00834.2007] [PMID]
- [23] Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiological Reviews*. 2011; 91(4):1447-531. [DOI:10.1152/physrev.00031.2010] [PMID]
- [24] Torabimehr F, Kordi MR, Nouri R, Ai J, Bakhtiari Moghadam B, Shirian S. [The effect of voluntary and forced exercise on the expression level of NCAM-PSA protein in the neuromuscular junction of soleus muscle in a mice experimental autoimmune encephalomyelitis model (Persian)]. *The Neuroscience Journal of Shefaye Khatam*. 2020; 8(2):39-46. [DOI:10.29252/shefa.8.2.39]

This Page Intentionally Left Blank