فصلنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال پانزدهم، شماره ۳، صفحه ۱۸۲ - ۱۷۱ (پاییز ۱۳۹۱)

اثر ۸ هفته تمرین استقامتی بر بیان ژن نسفاتین و غلظت آن در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی نر

عباس قنبری‌نیاکی[1*]، فاطمه حسین‌پور[1]، رزیتا فتحی[1]، علیرضا صفایی‌کناری[1]

۱ گروه بیوشیمی، دانشکده‌ی تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه مازندران

چکیده

زمینه: هیپوتالاموس مرکز اصلی تنظیم اشتها و تعادل انرژی است. فعالیت بدنی و ورزش قادر است تعادل انرژی را در جهت منفی شدن برهم زند. نسفاتین-۱ ازجمله نوروپپتیدهای تنظیم کننده‌ی اشتها است که توسط هیپوتالاموس تولید شده و نقش مهمی در برقراری تعادل انرژی ایفا می‌کند. هدف تحقیق حاضر بررسی اثر ۸ هفته تمرین استقامتی بر بیان ژن نسفاتین و غلظت آن در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی نر بوده است.

مواد و روش‌ها: ۱۱ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار (۱۰-۸ هفته،۱۳۰-۱۴۵ گرم) به گروه تمرین و شاهد تقسیم شدند. گروه تمرین با شدت ۲۰ متر در دقیقه، ۶۰ دقیقه، ۵ روز در هفته و در مجموع به‌مدت ۸ هفته روی نوارگردان دویدند. موش‌ها ۷۲ ساعت پس از آخرین جلسه‌ی تمرین کشته شده و بافت هیپوتالاموس جهت تعیین بیان ژن و غلظت نسفاتین-۱ به‌روش‌های RT-PCR و الایزا (ELISA) جدا گردید. غذا نه آب ۴ ساعت قبل از آزمایش از قفس برداشته شد. داده‌ها با استفاده از تی- غیروابسته تحلیل گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان می‌دهد که میزان بیان و غلظت نسفاتین-۱، ATP و گلیکوژن هیپوتالاموس در گروه تمرین به‌طور غیر معنی‌داری پایین‌تر از گروه شاهد بود.

نتیجه‌گیری: پژوهش حاضر برای نخستین بار نشان داد که تمرین با شدت کم، موجب کاهش بیان نسفاتین-۱ و غلظت آن در هیپوتالاموس گشته که با کاهش غیر معنی‌داری در منابع انرژی همراه گردید. به‌نظر می‌رسد که در شرایط پژوهشی حاضر، احتمالاً تمرین اثری شبه ناشتایی **و گرسنگی، بر بیان و غلظت نسفاتین-۱ در هیپوتالاموس داشته است.**

واژگان کلیدی: نسفاتین-۱، نوکلئوبایندین-۲، پروتئین ضداشتها، بیان ژن، موش‌های صحرایی نر

دریافت مقاله: ۸۹/۱۰/۲۱- پذیرش مقاله: ۹۰/۳/۲۲

* بابلسر، دانشگاه مازندران، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزش، گروه بیوشیمی ورزشی

E-mail: ghanbara@umz.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-28]

مقدمه

موضوع تنظیم وزن، اشتها و تعادل انرژی همواره از مباحث اساسی و مورد بحث در فیزیولوژی ورزش است که مبنای آن‌ها را معادله انرژی تشکیل می‌دهد. معادله انرژی بیان می‌کند که همواره باید تعادلی بین دریافت و هزینه‌کرد انرژی وجود داشته باشد تا وزن طی یک دوره زمانی نسبتا طولانی ثابت باقی بماند. در غیر این‌صورت این موازنه به‌هم خورده، اضافه یا کاهش وزن رخ خواهد داد. مطالعات متعدد در حیوانات آزمایشگاهی مشخص کرده است که هیپوتالاموس مرکز اصلی غذا خوردن، سیری و هوموستاز انرژی است (۱).

هیپوتالاموس دارای مجموعه‌های نورونی است و نوروپپتیدهای ویژه‌ای را تولید می‌کند که برروی رفتار دریافت غذا، تنظیم و تعادل انرژی، کنترل وزن و اشتها اثرگذار است. این عمل از طریق نوروپپتیدهای اشتهاآور (از جمله MCH[1]، AGRP[2]، NPY[3]) و ضداشتها (از قبیل Nesfatin-1، CART[4]،POMC[5]) انجام می‌پذیرد (۱).

نسفاتین-۱ ترکیبی از یک پایانه سیگنالی ۲۴ اسید آمینه‌ای و ساختار پروتئینی حاوی ۳۹۶ اسید آمینه است (۲) که در سال ۲۰۰۶ توسط اوه (Oh) و همکاران کشف گردید (۳). این پروتئین از نوکلئوبایندین-۲ (NUCB2)[6] مشتق شده و در سلول‌های کنترل‌کننده اشتها در هیپوتالاموس و دیگر نواحی مغز موش‌های صحرایی بیان گردیده است (۳و۴). اوه (۳) بخش‌های مشتق شده از NUCB2 را به نسفاتین-۱، ۲ و ۳ تقسیم کرده‌اند. در این بین تنها نسفاتین-۱ بر دریافت غذا و افزایش وزن اثرگذار است (۵ و ۶). نسفاتین-۱، علاوه بر مهار تحریک ایجاد شده توسط گرلین[7] و کاهش بافت چربی، در اعمال دیگری از قبیل فعالیت دستگاه گوارش (۷)، و تخلیه معده (۸) دخیل است.

همچنین اظهار شده است که غلظت پلاسمایی و بافتی نسفاتین-۱ تحت تأثیر عواملی چون ناشتایی (۹)، تغذیه مجدد (۱۰)، دیابت (۱۱)، قند بالا (۱۲) و فعالیت بدنی (۱۳) قرار می‌گیرد.

در خصوص غلظت بافتی این هورمون و فعالیت بدنی تاکنون تحقیقی انجام نشده است. با این وجود، در تنها مقاله‌ی موجود، قنبری‌نیاکی و همکاران (۲۰۱۰) تغییرات پلاسمایی نسفاتین-۱ را به دو نوع فعالیت بی‌هوازی رست (RAST)[8] و دایره‌ای در کیک بوکسورهای جوان بررسی کردند.

در تمرین RAST ورزشکاران مسافت ۳۵ متر را در ۶ نوبت با فاصله استراحتی ۱۰ ثانیه‌ای دویدند و در تمرین دایره‌ای ۶ تکنیک اختصاصی این رشته، هر کدام به‌مدت ۲۰ ثانیه با استراحت ۱۰ ثانیه‌ای بین هر تکنیک، انجام گرفت. نتایج حاکی از پاسخ متناقض نسفاتین-۱ به دو شیوه تمرینی بود، به‌نحوی که نسفاتین -۱ در تمرین دایره‌ای تمایل به کاهش و در تمرین RAST میل به افزایش داشت (۱۳). بنابراین با توجه به نقش پیشنهادی نسفاتین-۱، در تنظیم انرژی و رفتار دریافت غذا، به‌نظر می‌رسد که بررسی رفتار این پپتید، در پاسخ به تمرین بدنی و ورزشی (مؤثر بر تعادل انرژی، دریافت غذا، وزن و توده چربی بدن) می‌تواند، نقش واقعی آن و همچنین

[1] Melanin-Concertrating Hormone
[2] Agouti-Related Protein
[3] Neuropeptide Y
[4] Cocaine-and Amphetamine-Regulated Transcript
[5] Pro-Opiomelanocortine
[6] Nucleobindin 2
[7] Gherlin
[8] Running-based Anaerobic Sprint Test

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-28]

اهمیت احتمالی این پپتید را در حوزه‌های بالینی و آسیب‌شناختی مربوط به اشتها و مدیریت وزن آشکار سازد. بنابراین، این پژوهش قصد دارد تا نشان دهد که آیا بیان نسفاتین-۱ در پاسخ به تمرین دویدن در بافت هیپوتالاموس تغییر می‌کند؟ دوم، آیا افزایش و یا کاهش احتمالی بیان نسفاتین-۱ با تغییرات غلظت آن، گلیکوژن و ATP بافت هیپوتالاموس همراه می‌باشد؟ بنابراین با توجه به نقش فرضی نسفاتین-۱ و تأثیرپذیری آن در شرایط غیرتمرینی، ضرورت بررسی تغییرات منابع انرژی، به‌ویژه گلیکوژن و ATP بافتی دو چندان می‌گردد.

مواد و روش‌کار

یازده سرموش صحرایی نر نژاد ویستار (۱۰-۸ هفته، با وزن اولیه ۱۴۵ -۱۳۰ گرم) از «انستیتو پاستور شهر آمل» خریداری شد. موش‌ها در آزمایشگاه حیوانات، تحت شرایط کنترل شده نور (۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی)، دما ۱±۲۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت (۳±۵۰ درصد) در قفس‌های مخصوص به ابعاد در ۴۳×۲۷×۲۵ سانتی‌متر نگهداری و با غذای استاندارد برای جوندگان از شرکت خوراک دام به‌پرور کرج و با جیره‌ی طبیعی ۱۰ گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن تغذیه شدند.

در تمامی مراحل پژوهش، حیوانات به‌طور آزادانه به آب دسترسی داشتند. موش‌ها پس از یک هفته آشنایی با فضای آزمایشگاه و دستکاری توسط یک فرد مشخص، به‌طور تصادفی به دو گروه شاهد و تجربی همسان از نظر وزن تقسیم شدند. گروه تمرین با شدت ۲۰ متر در دقیقه، با شیب صفر درجه، ۶۰ دقیقه در هر جلسه، ۵ روز در هفته، و برای ۸ هفته روی نوارگردان دویدند. البته گروه شاهد در هیچ تمرینی شرکت نکرد.

برنامه تمرین به مراحل زیر تقسیم شده بود:

مرحله‌ی اول (مرحله‌ی آشنایی): در این مرحله موش‌ها هر روز به‌مدت ۱۵-۱۰ دقیقه با سرعت ۵ متر در دقیقه بر روی نوارگردان راه رفتند.

مرحله‌ی دوم (مرحله‌ی اضافه‌بار): در این مرحله موش‌ها ابتدا به‌مدت ۱۵ دقیقه و با سرعت ۱۵ متر در دقیقه بر روی نوارگردان دویدند. به‌تدریج طی ۲ هفته تمرین، مدت و شدت فعالیت افزایش یافته تا به میزان نهایی ۶۰ دقیقه و سرعت ۲۰ متر در دقیقه رسید.

مرحله ی سوم (حفظ یا تثبیت بار): در این مرحله موش-های گروه‌های تمرین به‌مدت ۶ هفته (۵ روز در هفته) با سرعت ۲۰ متر در دقیقه به‌مدت ۶۰ دقیقه در روی نوارگردان دویدند.

در این مرحله به‌منظور رعایت مسائل اخلاقی، برای وادار کردن موش‌ها به دویدن از شوک الکتریکی استفاده نشد، بلکه این عمل توسط میله‌ای پلاستیکی انجام شد. ده دقیقه‌ی اول و آخر هر جلسه‌ی تمرین به‌ترتیب به گرم و سرد کردن اختصاص یافت. ۷۲ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین هر دو گروه در روز نمونه‌بردای بافتی با تزریق داخل صفاقی ماده بیهوشی ترکیبی از کتامین[9] (۵۰-۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) و زایلازین[10] (۵-۳ میلی‌گرم در کیلوگرم) بیهوش شدند و هیپوتالاموس جهت تعیین بیان و غلظت نسفاتین -۱ و همچنین گلیکوژن و ATP برداشته، با سرم فیزیولوژی سرد شستشو، تمیز و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد، و برای اندازه‌گیری‌های بعدی در فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. لازم به‌ذکر است که غذا، نه آب، ۴ ساعت قبل از کشته شدن حیوان از قفس

[9] Ketamine
[10] Xylazine

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-28]

برداشته شد (۱۴).

روش تعیین بیان ژن نسفاتین-۱

مراحل استخراج RNA و سنتز cDNA تک رشته ای:

ابتدا له کردن بافت‌ها و لیز سلول‌ها در ۱ میلی‌لیتر از محلول RNX با استفاده از دستگاه هموژنایزر در میکروتیوب‌های بدون آنزیم RNase انجام پذیرفت. بعد از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، ۱۵۰ میکرولیتر کلروفرم به هر میکروتیوب اضافه شد. پس از همگن‌سازی مخلوط با سر و ته کردن و انکوباسیون مخلوط در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، سانتریفوژ میکروتیوب‌ها با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت. با تشکیل سه فاز، RNA موجود در فاز بی‌رنگ بالایی به تیوب جدید منتقل گردید.

بعد از اضافه کردن ایزوپروپانل به اندازه‌ی حجم مایع انتقال یافته، مخلوط کردن و انکوباسیون به‌مدت ۲۰ دقیقه در یخ، سانتریفیوژ نمونه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. تخلیه‌ی فاز روئی، افزودن ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد و ورتکس مخلوط تا کنده شدن رسوب از ته میکروتیوب، سانتریفیوژ نمونه با سرعت ۷۵۰۰ دور در دقیقه، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۸ دقیقه، تخلیه‌ی محلول رویی و خشک شدن نمونه‌ها در دمای اتاق انجام گرفت. حل نمودن رسوب در آب تیمار شده با DEPC و در نهایت RNA به‌دست آمده برای سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفت. برای سنتز cDNA، ابتدا انتقال ۱ میکرولیتر از RNA به تیوب دیگر و اضافه کردن ۱ میکرولیتر آنزیم DNAase I و ۱ میکرولیتر بافر ۱۰X تا رسیدن به حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر انجام شد.

سپس انکوبه تیوب‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه و اضافه کردن ۱ میکرولیتر EDTA و انکوبه کردن آن در دمای ۶۵ درجه به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام پذیرفت. بعد، افزودن ۱ میکرولیتر هگزامر تصادفی به میکروتیوب‌ها و انکوباسیون آن در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. این مرحله باعث دناتوره شدن RNA و از بین رفتن ساختارهای ثانویه آن می‌گردد.

بلافاصله پس از انتقال تیوب‌ها به روی یخ مواد RNasin ۰/۵ میکرولیتر، مخلوط dNTP ۲ میکرولیتر و آب بدون RNase ۰/۵ میکرولیتر به‌ترتیب اضافه گردید. در مرحله بعدی، انکوباسیون مخلوط واکنش به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترمال سایکلر انجام شد. سپس، اضافه کردن یک میکرولیتر آنزیم RT[11]، انکوباسیون مخلوط واکنش به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترمال سایکلر انجام پذیرفت.

حرارت دادن در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترمال سایکلر، جهت غیر فعال‌سازی آنزیم RT و دناتوره شدن کمپلکس RNA-cDNA صورت گرفت.

مراحل انجام RT-PCR

تکثیر قطعات ژن‌های نسفاتین و بتا اکتین توسط روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز معکوس (RT-PCR) با جفت پرایمرهای طراحی شده (جدول ۱) انجام گرفت. محلول واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، شامل ۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۴۰ پیکومول از هر یک از پرایمرها، ۱/۵ میلی‌مول در لیتر MgCl2، ۰/۲میلی‌مول در لیتر dNTP و ۰/۲۵ واحد

[11] Real Time

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-28]

از آنزیم Taq پلیمراز تهیه شد. تکثیر قطعه مورد نظر در دستگاه ترموسایکلر (شرکت Corbett، کشور استرالیا) طبق برنامه زیر انجام گرفت. مرحله واسرشت اولیه در دمای۹۴ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۰ دقیقه، مرحله تکثیر (۳۵ سیکل) در ۹۴ درجه سلسیوس به‌مدت ۴۵ ثانیه، ۶۴ درجه سلسیوس به‌مدت یک دقیقه و ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت یک دقیقه انجام شد. سپس مرحله طویل‌سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۵ دقیقه انجام پذیرفت. برای تشخیص محصولات RT-PCR، قطعات تکثیر یافته به‌روش الکتروفورز در ژل آگاروز ۲ درصد قابل تفکیک بودند. پس از الکتروفورز، ژل آگاروز به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱ میکروگرم در دسی‌لیتر از محلول اتیدیوم بروماید قرار گرفت و قطعات DNA با دستگاه ژل خوان (شرکت Optico، کشور هلند) بررسی شدند.

جدول ۱) توالی پرایمرهای طراحی شده در این مطالعه

نام ژن		توالی پرایمرها	دمای اتصال پرایمرها	سایز باندها
NSF	F	5' TTTGAACACCTGAACCACCA 3'	۶۴/۳ °C	bp۲۱۱
	R	5' TGCAAACTTGGCTTCTTCCT 3'		
Bactin	F	5' CACCCGCGAGTACAACCTTC 3'	۶۰/۴ °C	bp۲۰۷
	R	5' CCCATACCCACCATCACACC 3'		

نحوه آماده‌سازی بافت‌ها و روش‌های تعیین غلظت نسفاتین، گلیکوژن و ATP بافت هیپوتالاموس

ابتدا نمونه هیپوتالاموس (۲۰-۱۵ میلی‌گرم) در ۰/۲ میلی‌لیتر بافر فسفات سالین (PBS ۰/۱ مولار)، توسط دستگاه هموژنایزر (Potter Elvejheim) به‌مدت ۶ ثانیه نمونه با سرعت ۸۰۰ دور در دقیقه سرد شده با یخ، همگن شد. سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه نمونه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه سلسیوس، سانتریفیوژ گردید. پس از آن مایع‌رویی جدا گشته و جهت اندازه‌گیری گلیکوژن، ATP و نسفاتین-۱ مورد استفاده قرار گرفت.

غلظت نسفاتین-۱ با استفاده از کیت مخصوص اندازه‌گیری نسفاتین-۱ به‌روش الایزا[12] و بر اساس دستورالعمل کارخانه‌ی سازنده‌ی کیت (Wuhan,P.R، چین) تعیین گردید. یافته‌های آزمایش توسط دستگاه خوانش الایزا (Ststfax، آمریکا) بررسی شد. گلیکوژن با استفاده از کیت تجارتی به‌روش رنگ‌سنجی از شرکت (Nanjing JianchengBioengineering Institute) نانجینک چین اندازه‌گیری گردید. غلظت ATP نیز با استفاده از کیت بیولمینسنس[13] حساس برای ATP از یک شرکت آلمانی (Bioaffin GmbH & Co KG,Kassel,Germany) تعیین شد.

روش آماری

در پژوهش حاضر با توجه به ماهیت آن و تعداد گروه‌ها از آمار توصیفی برای دسته‌بندی داده‌ها و برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون تی- غیر وابسته[14]

[12] ELISA

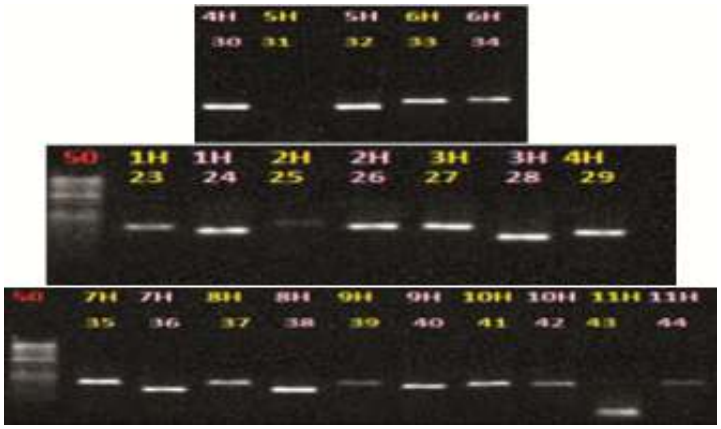
[13] Bioluminescence
[14] Independent t-test

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-28]

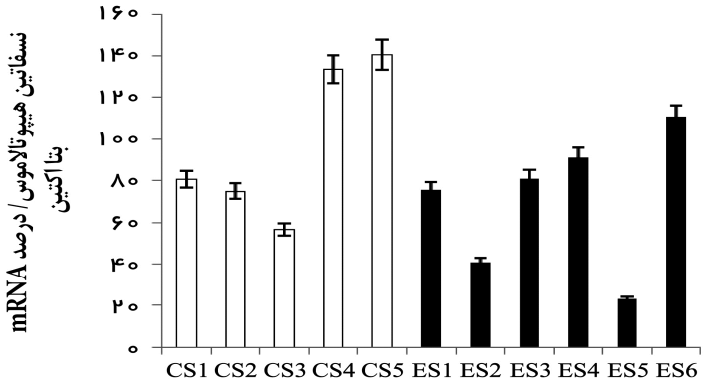
استفاده شد. لازم به‌ذکر است نتایج به‌صورت میانگین±انحراف معیار بیان شده است. برای محاسبه داده‌ها از نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc،Chicago،Il،USA) ویرایش ۱۵ استفاده شد. اختلاف معنی‌داری آماری در سطح P<۰/۰۵ تعیین گردید.

یافته‌ها

در این مطالعه بیان ژن نسفاتین-۱ بر روی ژل آگاروز در شکل ۱ آورده شده است. تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از آن نشان داد که مقدار بیان نسفاتین-۱ هیپوتالاموس در موش‌های تمرین کرده پایین‌تر بوده است، اما این تغییرات به‌حد معنی‌داری نرسید (نمودار ۱، جدول ۲). اگر چه کاهش بیان نسفاتین-۱ هیپوتالاموس با کاهش غلظت نسفاتین-۱ هیپوتالاموس همسو بوده، اما تفاوت معنی‌داری بین دو گروه تمرین و شاهد دیده نشد. استفاده از آزمون تی غیروابسته نشان داد که تغییرات غلظت ATP و گلیکوژن هیپوتالاموسی نیز به‌طور غیرمعنی‌داری در گروه تمرین در مقایسه با گروه شاهد پایین‌تر می‌باشد. تغییرات نسفاتین-۱، ATP و گلیکوژن در گروه‌های تمرین و شاهد پس از ۸ هفته فعالیت ورزشی در جدول ۲ آورده شده است.



شکل ۱) بیان ژن نسفاتین-۱ با استفاده از روش **RT-PCR**، برروی ژل آگارز



نمودار ۱) درصد نسبی بیان ژن نسفاتین-۱ در هر نمونه.
گروه تمرین (ES) و شاهد (CS)

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-28]

جدول۲) تغییرات نسفاتین-۱ و سایر متغیرهای پژوهش در گروه‌های تمرین و شاهد پس از ۸ هفته فعالیت ورزشی

ردیف	گروه شاهد	متغیر اندازه‌گیری شده	گروه‌تمرین
۱	۹۷/۲۸±۳۷/۴۳	نسفاتین هیپوتالاموس/درصد RNA بتااکتین	۷۰/۴۱±۳۲/۵۷
۲	۴/۷۷±۰/۵۷	نسفاتین-۱ هیپوتالاموس ng/g	۴/۶۸±۰/۱۸
۳	۱/۲۷±۰/۴۳	گلیکوژن هیپوتالاموس mg/g	۱/۲۵±۰/۲۴
۴	۴/۶۲±۰/۳۹	ATP هیپوتالاموس µmol/g	۴/۲۰±۰/۱۸

اعداد به‌صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند ($p<0/05$).

بحث

هدف از پژوهش کنونی، بررسی اثر ۸ هفته تمرین استقامتی با شدت ۲۰ متر در دقیقه روی نوار گردان، بر بیان ژن نسفاتین-۱ و تغییرات غلظت آن در هیپوتالاموس بود. از یافته‌های مهم پژوهش کنونی، پایین بودن بیان نسفاتین-۱ و غلظت آن در پاسخ به یک دوره تمرین با شدت کم بوده است که البته با کاهش غیر معنی‌دار غلظت‌های گلیکوژن و ATP در هیپوتالاموس همراه بود. این نخستین پژوهشی است که بیان ژن نسفاتین-۱ را در شرایط استراحت و پس از تمرین در هیپوتالاموس نشان می‌دهد.

گزارش‌ها نشان می‌دهد که منبع اصلی بیان و ترشح نسفاتین-۱، هسته قوسی هیپوتالاموس می‌باشد (۳). اگر چه همین مدارک بیان این پپتید را در دیگر نواحی مغز نیز تأیید می‌کنند، با این حال مطالعات اخیر نشان می‌دهد که علاوه‌بر مغز و هیپوتالاموس، نسفاتین-۱ در بافت‌های خارج هیپوتالاموس مانند پانکراس (۱۵)، بافت چربی (۱۶)، دستگاه گوارش (۱۷) و کبد (قنبری‌نیاکی و همکاران داده‌های چاپ نشده) شناسایی گشته است.

براساس اطلاعات ما تاکنون پژوهشی برروی تأثیر فعالیت بدنی بر بیان نسفاتین-۱ و غلظت آن در بافت‌های مختلف انجام نشده است. در تنها پژوهش چاپ شده که بر نمونه انسانی انجام شده، غلظت پلاسمایی نسفاتین به یک دوره فعالیت با شدت کم (فعالیت دایره‌ای بر پایه فنون بوکس چینی (کیک بوکسینگ[15])) ابتدا افزایشی و سپس کاهشی بوده است. اما پاسخ همین پپتید به فعالیت با شدتی بالاتر (رست)[16] ابتدا کاهشی و سپس روندی افزایشی داشته است (۱۳). به‌نظر می‌رسد که شدت فعالیت بدنی عامل قابل ملاحظه‌ای بر پاسخ نسفاتین باشد.

از طرفی پژوهش حاضر، یافته قبلی شیمیزو (Shimizu) و همکاران (۶)، رامانجانیاو (Ramanjaneya) و همکاران (۱۶) و آیدین (Aydin) و همکاران (۱۸)، مربوط به نسفاتین بافتی به‌ویژه مغز و غلظت پلاسمایی آن را تأیید می‌کند. همچنین نشان داده شد غلظت این پپتید در بافت هیپوتالاموس با کاهش بیان آن هم راستا است (۶ و ۱۹). به دلیل نبود اطلاعات لازم درباره بیان و عملکرد نسفاتین-۱ هنوز مشخص نیست که فعالیت بدنی و ورزش با چه ساز و کارهایی بر بیان نسفاتین-۱ و غلظت آن در هیپوتالاموس اثر می‌گذارد.

اگر چه در پژوهش حاضر موش‌ها ناشتا نبودند، اما مطالعات نشان می‌دهند که ناشتایی، به کاهش ۱۸ درصدی نسفاتین -۱ سرم منجر می‌شود (۱۱) و

[15] Kick boxing
[16] Running-based anaerobic Sprint Test (RAST)

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-28]

علاوه‌بر این مشاهده شده است که در موش‌های ناشتا، ۱۲ ساعت پس از دریافت غذا، سطح کاهش یافته نسفاتین-۱ به حالت طبیعی باز می‌گردد (۳ و ۲۰). رامانجانیا و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که ناشتایی به‌مدت ۲۴ ساعت قبل از کشتن موش‌ها سبب کاهش معنی‌دار بیان نسفاتین-۱ در بافت‌های چربی زیر پوست می‌شود (۱۶). بنابر یافته‌های کهنو (kohno) و همکاران تعداد نورون‌های بیان‌کننده نسفاتین-۱ که c-fos ایمینوراکتیو نیز بودند، ۲ ساعت پس از دریافت غذا متعاقب ۴۸ ساعت گرسنگی، به‌طور معنی‌داری (۱۰ برابر) بیشتر از حیوانات ناشتا بود (۱۰). از طرفی دیگر تأثیر فعالیت بدنی و تمرین بر منابع (گلیکوژن و ATP)، اشتها و وضعیت انرژی بدن به‌خوبی ثابت شده است و نشان می‌دهد که می‌تواند اثراتی همانند ناشتایی و البته شاید هم با گستردگی بیشتر بر این منابع و بازسازی آنها داشته باشد (۲۱ و ۲۲).

بررسی‌ها از کاهش معنی‌دار سطوح ATP و گلیکوژن در کبد و عضله اسکلتی و نیز کاهش برخی پپتیدهای مهم در تنظیم انرژی از قبیل گرلین[17]، AgRP[18] و NPY[19] متعاقب یک جلسه فعالیت هوازی و یا فعالیت بی‌هوازی در موش‌های ناشتا و سیر حکایت دارد (۲۶-۲۳). هوکتون (Houghton) و همکاران نشان دادند که ۱۰ دقیقه دویدن با شدت ۲۷ متر در دقیقه منجر به کاهش ۴۰ و ۲۵ درصدی در سطوح ATP کبد موش‌های ماده تمرین نکرده و کرده ناشتا (۴۸ ساعت) گردید (۲۷).

قنبری‌نیاکی و همکاران (۲۰۱۰) به‌دنبال تزریق یک نوبت محلول اتیونین[20]، کاهش فراوانی در سطوح گلیکوژن و ATP کبد موش‌های تمرین کرده و تمرین نکرده، مشاهده کردند. اتیونین، اتیل آنالوگ متیونین[21] است که تزریق آن به موش، منجر به برهم زدن متابولیسم کبدی و کاهش فعالیت گلوکونئوژنز[22] می‌شود که در نتیجه آن، گلوکاگون[23] پلاسما، مصرف غذا و لیپید پلاسما افزایش می‌یابد. به‌دنبال تزریق اتیونین سطح پلاسمایی گرلین (پپتید اشتها آور) در مقایسه با ابستاتین[24] (پپتید ضد اشتها) افزایش معنی‌داری نشان داده است (۲۱).

در پژوهش حاضر کاهش غیرمعنی‌دار بیان و غلظت نسفاتین-۱ هیپوتالاموسی با کاهش اندکی در گلیکوژن و ATP همراه بود که این خود نشان‌دهنده عدم بازسازی کامل منابع است. همچنین ممکن است این سوال به‌ذهن خطور کند که شاید برداشت غذا، نه آب، از قفس حیوانات، ۴ ساعت قبل از نمونه‌برداری به تحلیل منابع انرژی کمک کرده باشد.

البته تعریف از ناشتایی بیشتر به محدویت آب و غذا برای حداقل ۸ ساعت تا ۵ روز، نه ۴ ساعت، اطلاق می‌گردد. با این حال ممکن است بر تمایل به کاهش بیان و غلظت نسفاتین-۱ و گلیکوژن و ATP هیپوتالاموس مؤثر بوده باشد. باتوجه به وابستگی شدید مغز به قند خون و ضرورت آن در عملکرد صحیح مغز تغییرات بسیار اندک آن در مغز قابل ملاحظه خواهد بود. این منبع به‌عنوان ذخیره انرژی بافری، قابلیت تهیه‌ی انرژی را برای مدت کوتاهی و در سریع‌ترین زمان ممکن دارد (۲۸). گلیکوژن در تمام قسمت‌های مغز، هرچند به‌طور نابرابر، پراکنده گشته است (۲۹).

بیان شده است که کاهش ذخایر گلیکوژن سبب

[17] Ghrelin
[18] Agouti-Related Protein
[19] Neropeptide Y
[20] Ethionine
[21] Methionine
[22] Gluconeogenesis
[23] Glucagon
[24] Obestatin

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-28]

استرس زیست انرژی می‌شود که به موجب آن مقدار ATPکاهش و مقدار آدنوزین افزایش می‌یابد (۳۰). تغییرات گلیکوژن کورتکس پس از ورزش ایجاد کننده خستگی سیستم عصبی مرکزی در موش‌هایی که به‌مدت ۱ هفته بنابر معادله بدفورد (Bedford) (حداکثر اکسیژن مصرفی/وزن) ورزش کردند، تمایل به کاهش داشت ولی این تغییرات معنی‌دار نبود (۳۱). در این راستا نمی‌توان تأثیر عوامل ناشناخته و عوامل دیگری مثل سطوح انسولین، گلوکز بافتی و پلاسمایی، و شاخص‌های التهابی که در این پژوهش اندازه‌گیری نشده، ولی توسط برخی از پژوهشگران گزارش شده است (۶، ۱۶ و ۳۲)، را نادیده گرفت.

به‌طور خلاصه، این نخستین پژوهشی است که بدون تزریق، دستکاری غذایی و یا اعمال ناشتایی و گرسنگی بلند مدت اثر مستقیم یک دوره تمرینی را در شدت پایین روی بیان نسفاتین-۱ و غلظت آن در بافت هیپوتالاموس انجام داده است.

اگر چه براساس نتایج پژوهش حاضر نمی‌توان با قاطعیت بر تأثیر تحلیل منابع انرژی بر بیان و غلظت نسفاتین-۱ در پاسخ به تمرین اظهارنظر نمود. اما اثر کاهشی حتی اندک بیان نسفاتین-۱ که با کاهش غلظت آن و گلیکوژن و ATP در هیپوتالاموس همراه شده است این ایده را تقویت می‌کند که احتمالاً تأثیر شدت فعالیت و دوره‌های برگشت به حالت اولیه پس از تمرین بر بیان و غلظت نسفاتین-۱ در بافت‌ها با محتوای گلیکوژنی و ATP متفاوت، متغیر می‌باشد. مطالعات بیشتری لازم است تا تأثیر واقعی فعالیت بدنی و ورزشی (در اشکال مختلف و با شدت‌های متفاوت) را بر رفتار دقیق نسفاتین بافتی و پلاسمایی و ساز و کارهای مؤثر بر آن، آشکار سازد.

سپاس و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی بخش پژوهش دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی و معاونت پژوهشی دانشگاه مازندران انجام شده است. نویسندگان این مقاله از زحمات سرکار خانم دکتر فاطمه رهبری‌زاده به‌دلیل همکاری صمیمانه، کمال سپاس و قدردانی را دارند.

References:

1.Hosseini-kakhak SA, Ghanbari Niaki A, Rahbarizade F, et al. The effect of treadmill running on plasma and muscle agouti-related protein (AGRP) concentration in male rats. Iran J Endocrinol Metab 2009; 11: 455-61.
2.Miura K, Titani K, Kurosawa Y, et al. Molecular cloning of nucleobindin, a novel DNA-binding protein that contains both a signal peptide and a leucine zipper structure. Biochem Biophys Res Commun 1992; 187: 375-80.
3.Oh S, Shimizu H, Satoh T, et al. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. Nature 2006; 443: 709-12.
4.Goebel M, Stengel A, Tache Y, et al. T1806 fasting decreases nesfatin-1/NUCB2 serum levels in rats. Gastroenterology 2009; 136: A-776.
5.Woods SC, Seeley RJ, Porte D, et al. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. Science 1998; 280: 1378-83.
6.Shimizu H, Oh S, Hashimoto K, et al. Peripheral adminstration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: the leptin-independent mechanism. Endocrinology 2009; 150: 662-71.
7.Zhang AQ, Li XL, Jiang CY, et al. Expression of nesfatin-1/NUCB2 in rodent digestive system. World J Gastroenterol 2010; 16: 1735-41.
8.Stengel A, Goebel M, Wang L, et al. Central nesfatin-1 reduces dark-phase food intake and gastric emptying in rats: differential role of corticotropin-releasing factor2 receptor. Endocrinology 2009; 150: 4911-19.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-28]

9.Tsuchiya T, Shimizu H, Yamada M, et al. Fasting concentrations of nesfatin-1 are negatively correlated with body mass index in non-obese males. Clin Endocrinol (Oxf) 2010; 73: 484-90.
10.Kohno D, Nakata M, Maejima Y, et al. Nesfatin-1 neurons in paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus coexpress oxytocin and vasopressin and are activated by refeeding. Endocrinology 2008; 149: 1295-301.
11.Stengel A, Goebel M, Yakubov I, et al. Identification and characterization of nesfatin-1 immunoreactivity in endocrine cell types of the rat gastric oxyntic mucosa. Endocrinology 2009; 150: 232-8.
12.Su Y, Zhang J, Tang Y, et al. The novel function of nesfatin-1: Anti-hyperglycemia. Biochem Biophys Res Commun 2010; 391: 1039-42.
13.Ghanbari-Niaki A, Kraemer RR, Soltani R. Plasma nesfatin-1 and glucoregulatory hormone responses to two different anaerobic exercise sessions. Eur J Appl Physiol 2010; 110: 863-8.
14.Ooyama K, Wu J, Nosaka N, et al. Combined intervention of medium-chain triacylglycerol diet and Exercise Reduces Body fat mass and enhance energy expenditure in rats. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) 2008; 54: 136-41.
15.Foo KS, Brauner H, Ostenson C, et al. Nucleobindin-2/nesfatin in the endocrine pancreas: distribution and relationship to glycaemic state. J Endocrinol 2010; 204: 255-63.
16.Ramanjaneya M, Chen J, Brown JE, et al. Identification of nesfatin-1 in human and murine adipose tissue: a novel depot-specific adipokine with increased levels in obesity. Endocrinology 2010; 151: 3169-80.
17.Zhang AQ, Li XL, Jiang CY, et al. Expression of nesfatin-1/NUCB2 in rodent digestive system. World J Gastroenterol 2010; 14: 1735-41.
18.Aydin S, Dag E, Ozkan Y, et al. Nesfatin-1 and ghrelin levels in serum and saliva of epileptic patients: hormonal changes can have a major effect on seizure disorders. Mol Cell Biochem 2009; 328: 49-56.
19.Shimizu H, Ohsaki A, Oh S, et al. A new anorexigenic protein, nesfatin-1. Peptides 2009; 30: 995-8.
20.Price CJ, Samson WK, Ferguson AV. Nesfatin-1 inhibits NPY neurons in the arcuate nuceus. Brain Res 2008; 1230: 99-106.
21.Ghanbari-Niaki A, Soltani R, Shemshaki A, et al. Effects of acute ethionine injection on plasma ghrelin and obestatin levels in trained male rats. Metabolism 2010; 59: 982-7.
22.Ghanbari-Niaki A, Bergeron R, Latour MG, et al. Effect of physical exercise on liver ATP levels in fasted and phosphate injected rats. Arch Physiol Biochem 1999; 107: 393-402.
23.Wojciechowska F, Karoń H, Blawack M. The effect of short-lasting intensive physical exercise on ATP content in the rat muscles and liver. Acta Physiol Pol 1975; 26: 313-6.
24.Dohm GL, Newsholme EA. Metabolic control of hepatic gluconeogenesis during exercise. Biochem J 1983; 212: 633-9.
25.Ghanbari-Niaki A, Kraemer RR, Abednazari H. Time-course alterations of plasma and soleus agouti-related peptide and relationship to ATP, glycogen, cortisol, and insulin concentrations following treadmill training programs in male rats. Horm Metab Res 2011; 43: 112-6.
26.Ghanbari-Niaki A, Jafari A, Moradi M, et al. Short-, moderate-, and long-term treadmill training protocols reduce plasma, fundus, but not small intestine ghrelin concentrations in male rats. J Endocrinol Invest 2011; 34: 439-43.
27.Houghton CR, Hawkins RA, Williamson DH, et al. The effects of physical training on the metabolic response to short-term severe exercise in the rat. Biochem J 1971; 124: 57P.
28.Brown AM. Brain glycogen re-awakened. J Neurochem 2004; 89: 537-52.
29.Sagar SM, Sharp FR, Swanson RA. The regional distribution of glycogen in rat brain fixed by microwave irradiation. Brain Res 1987; 417: 172-4.
30.Kong J, Shepel N, Holden CP, et al. Brain Glycogen Decrease with Increased Periods of Wakefulness: Implications for Homeostatic Drive to Sleep. J Neurosci 2002; 22: 5581-7.
31.Jing W, Hongtao L, Qiang M, et al. Changes of Glycogen and Lactate in Cortex of Rats after Exercise-Induced Central

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-28]

System Fatigue. Chinese J Sports Med 2005; 2: 36-42.
32.Nazifi S, Saeb M, Pourkonabadi S, et al. Effect of pistacia atlantica oil feeding on serum thyroides hormones and leptin concentrations in female rats with hyperthyroidism disease. Iran South Med J (ISMJ) 2011; 14: 1-8.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-28]

Original Article

The effect of 8 weeks of endurance training on hypothalamic Nesfatin-1 gene expression and its concentration in male rats

A. Ghanbari-Niaki [1], F. Hosseinpour [2], R. Fathi [1], A. Safai-Kenari [1]*

[1]Department of Exercise Biochemistry, Faculty of Physical Education & Sport Sciences, University of Mazandaran, Mazandaran, IRAN

(Received 11 Jan, 2011 Accepted 12 May, 2011)

Abstract

Background: Hypothalamus is mentioned as the major center of appetite and energy balance. Physical activity and the exersice are able to disturb the energy balance to negative. Nesfatin-1 is a regulating neuropeptide that is produced by hypothalamus and has an important role in establishing energy balance. The purpose of this study was to examine the effect of endurance training regimen on nesfatin-1 gene expression and its concentration in the male rat hypothalamus.

Materials and Methods: Eleven adult wistar male rats (8-10 week old, 130-145g) assigned into control(C, n=5) and training (E, n=6) groups. Training group was given exercise on a motor-driven treadmill (20m/min, 0% grade, 60 min/session, 5days/week for 8 weeks). Rats were sacrificed 72h after the last training session and then the hypothalamus tissue was excised for determination of nesfatin-1 gene expression and its concentration by RT-PCR & ELIZA methods, respectively. Four hours before the experiment the food not tap water was removed from the animal cages. Data was analyzed by using an independent t-student test.

Results: The current results indicated that the levels of nesfatin-1 gene expression and its concentration, ATP, and glycogen concentrations were non-significantly lower in trained group when compared with control group.

Conclusion: This research showed for the first time, that a low-intensity exercises, decreases nesfatin-1 expression and concentration in the hypothalamus, which accompanied insignificant reduction in energy source. It seems that in the present research, the exercise has had the same fasting and being hungry like effect on nesfatin-1 expression and concentration in the hypothalamus.

Keywords: Nesfatin-1, Nucleobindin-2, anorexigenic protein, gene expression, male rat

**Address for correspondence*: Department of Exercise Biochemistry, Faculty of Physical Education & Sport Sciences, University of Mazandaran, Mazandaran, IRAN; E-mail: ghanbara@umz.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2024-03-28]