

## تعیین نقش پپتید مرتبط با ژن کلسی تونین در اکسیداسیون چربی حین تمرین استقامتی در رت‌های نر نژاد ویستار

نجمه سادات حسینی<sup>۱</sup>، روح‌الله نیکویی<sup>۲</sup>، داریوش مفلحی<sup>۳</sup>

۱. کارشناس ارشد گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

۲. دانشیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه شهید باهنر کرمان\*

۳. استادیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۱۵

### چکیده

هدف از پژوهش حاضر، تعیین نقش پپتید مرتبط با ژن کلسی تونین در اکسیداسیون چربی حین تمرین استقامتی در رت‌های نر نژاد ویستار بود. بدین منظور، ۳۰ رأس رت نر نژاد ویستار به شکل تصادفی به سه گروه کنترل (۱۰ نفر)، تمرینی محض (۱۰ نفر) و تمرین + CGRP(8-37) (۱۰ نفر) تقسیم شدند. گروه‌های تمرینی محض و تمرین + CGRP(8-37)، یک جلسه تمرین استقامتی را با سرعت ۲۶ متر بر دقیقه و به مدت ۶۰ دقیقه انجام دادند و بلافاصله پس از تمرین، مایع مغزی نخاعی و نمونه خونی آزمودنی‌ها جمع‌آوری گردید. قابل ذکر است که پیش از انجام تمرین، گروه تمرین + CGRP(8-37)، تزریق درون‌صفاقی CGRP(8-37) (منع‌کننده گیرنده‌های پپتید مرتبط با ژن کلسی تونین) را به مقدار (10 µg/kg) دریافت نمودند. شایان ذکر است که غلظت پپتید مرتبط با ژن کلسی تونین در مایع مغزی نخاعی و سطوح سرمی آن، غلظت اسید چرب آزاد و تری‌گلیسرید پلاسما با تکنیک الایزا اندازه‌گیری گردید. جهت مقایسه بین گروه‌ها نیز آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌راهه و آزمون تعقیبی توکی مورد استفاده قرار گرفت. یافته‌ها نشان می‌دهند که بلافاصله پس از تمرین، غلظت پپتید مرتبط با ژن کلسی تونین در مایع مغزی نخاعی و سرم در گروه تمرینی صرف ( $P < 0.01$ ) و تمرین + CGRP(8-37) ( $P < 0.01$ ) نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری یافته است. علاوه بر این، سطوح پلاسمایی تری‌گلیسرید کاهش معنادار ( $P < 0.05$ ) و اسید چرب آزاد افزایش معناداری ( $P < 0.01$ ) را در هر دو گروه تمرینی نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهند. در انتهای جلسه تمرینی نیز تنها مقادیر اسید چرب آزاد در گروه تمرینی محض به‌طور معناداری بالاتر از گروه تمرین + CGRP(8-37) می‌باشد ( $P < 0.05$ ). به‌طور کلی، انجام تمرین استقامتی منجر به افزایش غلظت پپتید مرتبط با ژن کلسی تونین سرم و مایع مغزی که عامل دخیل در آزادسازی اسید چرب آزاد حین تمرین استقامتی است می‌باشد.

**واژگان کلیدی:** پپتید مرتبط با ژن کلسی تونین، تمرین استقامتی، متابولیسم چربی، هموستاز انرژی

## مقدمه

پپتید مرتبط با ژن کلسی تونین<sup>۱</sup> (CGRP) نروپپتیدی<sup>۳۷</sup>، اسیدآمینهای است که به طور عمده در بافت عصبی مرکزی و محیطی پستانداران وجود دارد (۱،۲،۳). این پپتید براساس تفاوت در ژن کدکننده، به دو نوع CGRP- و CGRP- تقسیم می‌شود (۴،۵). از نظر ساختاری، CGRP خانواده پپتیدی متشکل از CGRP کلسی تونین، آدرنومدولین<sup>۲</sup> و آمیلین است (۵). این ژن و گیرنده‌های آن در سیستم‌های عصبی و سیستم قلبی - عروقی قرار دارند و در عملکردهای بیولوژیکی از جمله گشادکردن عروق خونی، مصونیت قلبی، تنظیم کردن گردش خون، انبساط عضله صاف و انتقال درد نقش دارند (۵،۶). در کنار نقش‌های ذکرشده، نقش متابولیکی نیز برای CGRP گزارش شده است. CGRP باعث ایجاد مقاومت انسولین در عضله اسکلتی و کبدی می‌شود (۷) و تعدیل‌کننده مهم فیزیولوژیکی در متابولیسم گلوکز درون سلولی می‌باشد که در نهایت، منجر به کاهش سنتز گلیکوژن در عضله اسکلتی می‌گردد (۷). اخیراً نشان داده شده است که CGRP تأثیر مهمی بر متابولیسم چربی در عضله و کبد دارد؛ اثری که عمدتاً از طریق مسیر AMPK<sup>۳</sup> واسطه‌گری می‌شود (۸). اطلاعات در محیط آزمایشگاه<sup>۴</sup> نشان می‌دهد که CGRP، دردسترس بودن اسیدهای چرب آزاد و استفاده از آن در بافت‌های کلیدی را افزایش می‌دهد (۸). همچنین، این پپتید با افزایش فعالیت مسیر AMPK که به شدت اکسیداسیون اسیدهای چرب را از طریق مهار استیل کوآ کربوکسیلاز افزایش می‌دهد، منجر به بهبود اکسیداسیون اسید چرب می‌شود (۸). در این راستا، والکر<sup>۵</sup> و همکاران (۲۰۱۴) به وجود مکانیسم‌های سینالینگ مستقل از عملکرد cAMP<sup>۶</sup> اشاره نموده و عنوان کرده‌اند که احتمال راه‌اندازی مسیرهای سیگنالینگ دیگر نظیر Ca<sup>2+</sup>/IP<sub>3</sub> برای CGRP نیز وجود دارد که مستقل از مسیر cAMP عمل می‌کند؛ لذا، احتمال این که نقش CGRP در اکسیداسیون لیپید از طریق این مسیر واسطه‌گری شود وجود خواهد داشت (۹). این اثرات عمدتاً از طریق دو گیرنده متفاوت این پپتید به نام CGRPR<sub>1</sub> و CGRPR<sub>2</sub> میانجی‌گری می‌شوند که هر دوی این گیرنده‌ها دارای خصوصیات آنتاگونیستی به ماده CGRP8-37 می‌باشند (۶). (8-37) CGRP آنتاگونیست انتخابی گیرنده CGRP بوده که به عنوان یک منع‌کننده اختصاصی گیرنده‌های CGRP عمل می‌کند

- 
1. Calcitonin Gene-Related Peptide
  2. Adrenomedullin
  3. AMP-Activated Protein Kinase
  4. In Vitro
  5. Walker CS
  6. Cyclic Adenosine Monophosphate

(۶). تأثیر نهایی این ماده، خنثی کردن عمل CGRP در بافت‌های پیرامونی است که به کرات در مطالعات پیشین جهت حذف اثرات بیولوژیک CGRP در محیط بدن استفاده شده است (۶). علاوه بر این، تری گلیسرید بافت چربی یکی از مهم‌ترین منابع انرژی موجود در حین ورزش محسوب می‌شود (۱۰). تسریع لیپولیز و افزایش در میزان در دسترس بودن اسیدهای چرب که در حین ورزش رخ می‌دهد، نیازمند همکاری سیستم‌های عصبی، هورمونی و گردش خون است. پژوهش‌های اخیر جایگاه ویژه‌ای را برای سیستم عصبی مرکزی، به‌ویژه مغز در کنترل هموستاز چربی قائل شده‌اند. مغز اثرات خود بر اکسیداسیون لیپید را از دو طریق انجام می‌دهد: ۱. از طریق کنترل فعالیت اعصاب سمپاتیک که به صورت مستقیم بافت چربی را عصب‌دهی می‌کند و ۲. از طریق نروپپتیدهایی همانند  $TGF-\beta$ ،  $NPY$ ، CGRP که در پاسخ به تغییرات متابولیک خون از مغز به جریان خون ترشح می‌شوند. سطوح CGRP در خون و عضله در پی تمرین درازمدت تغییر می‌کند و اهداف چندگانه‌ای را دنبال می‌نماید (۱۱، ۱۲)؛ به‌عنوان مثال، نشان داده شده است که ۷۲ ساعت پس از دویدن در سراشیبی، غلظت CGRP در نرون‌های عضلهٔ دوقلوی میانی افزایش می‌یابد و بعد از چهار هفته به سطوح کنترل برمی‌گردد (۱۲). در پژوهشی دیگر نشان داده شد که ورزش کوتاه‌مدت، سطح CGRP سرم و بیان آن را در گانگلیون ریشهٔ پشتی<sup>۳</sup> (DRG) تغییر نمی‌دهد؛ در حالی که ورزش طولانی‌مدت به‌طور معناداری غلظت CGRP سرم را افزایش می‌دهد (۱۳). همچنین، در مطالعه‌ای دیگر که در آن تأثیر تمرین بر تغییرات CGRP و آدرنومدولین در ۱۲ نفر از ساکنان سطح دریا پس از پنج روز قرارگرفتن در ارتفاع بررسی شده است، نتایج حاکی از افزایش مقادیر CGRP و آدرنومدولین در پاسخ به تمرین بوده است (۱۱). ساچلر<sup>۴</sup> نیز افزایش در غلظت CGRP سرم متعاقب تمرین را در رت نشان داد و عمل فیزیولوژیک این افزایش را به هایپرتروفی قلبی ناشی از ورزش نسبت داد؛ اثری که توسط درمان با آنتاگونیست CGRP (CGRP8-37) هایپرتروفی قلبی ناشی از ورزش به‌طور کامل از بین می‌رود (۱۴). علی‌رغم مشخص‌بودن افزایش سطوح CGRP در خون و عضله در پی تمرین، نقش فیزیولوژیک این افزایش ناشناخته می‌باشد. با توجه به این که CGRP پپتیدی است که از مغز ترشح می‌شود و به جریان خون آزاد می‌شود، عاملی است که می‌تواند ارتباط بین دستگاه عصبی مرکزی و گردش خون را حین تمرین برقرار نماید. همچنین، با توجه به نتایج پژوهش‌ها مبنی بر تأثیر CGRP بر اکسیداسیون لیپید، این احتمال وجود دارد که یکی از دلایل افزایش CGRP در حین تمرین، تسهیل و راه‌اندازی اکسیداسیون لیپید باشد. باین‌وجود،

- 
1. Transforming Growth Factor Beta
  2. Neuropeptide Y
  3. Dorsal Root Ganglion
  4. Sachl

تاکنون مدارک مستقیمی مبنی بر رد یا تأیید این فرضیه به دست نیامده است؛ لذا، هدف از پژوهش حاضر، تعیین تغییرات CGRP سرم و مایع مغزی نخاعی در پی تمرین استقامتی و تعیین نقش احتمالی آن در اکسیداسیون لیپید در حین تمرین استقامتی در رت‌های نر نژاد ویستار می‌باشد.

### روش پژوهش

تعداد ۳۰ سر رت از نژاد ویستار در سن هشت هفته (با میانگین وزن  $211 \pm 19$  گرم) از مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان تهیه شدند و در شرایط دمایی  $22 \pm 3$  درجه سانتی‌گراد و تحت شرایط  $12:12$  ساعت تاریکی و روشنایی نگهداری گشتند و با غذای مخصوص رت و آب تغذیه شدند. پس از گذشت یک هفته و آشنایی با محیط آزمایشگاه، رت‌ها به صورت تصادفی به سه گروه تمرینی محض (۱۰ نفر)، تمرین CGRP (8-37) + (۱۰ نفر) و کنترل (۱۰ نفر) تقسیم شدند. رت‌های گروه کنترل، در تمام مدت در قفس‌های خود غیرفعال بودند و گروه تمرین + CGRP (8-37) ده دقیقه قبل از انجام تمرین استقامتی، تزریق درون‌صفاقی CGRP (8-37) را دریافت نمودند. این تزریق به منظور منع گیرنده‌های CGRP و خنثی کردن عمل CGRP در بافت‌های پیرامونی انجام شد. رت‌های گروه‌های تمرینی محض نیز همین مقدار بافر PBS را دریافت نمودند. سپس، گروه‌های تمرینی پروتکل تمرین را به شرح زیر انجام دادند.

ابتدا، رت‌ها به مدت ۱۰ روز با سرعتی معادل ۱۵ متر بر دقیقه و به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه با دویدن روی تردمیل آشنا شدند. در انتهای دوره آشناسازی، سرعت به ۲۶ متر بر دقیقه و مدت نیز به ۶۰ دقیقه رسید. گروه‌های تمرینی پس از دوره آشناسازی، یک هفته استراحت داشتند (به منظور از بین بردن اثرات حاد احتمالی آخرین جلسه تمرین) و بعد از آن، یک جلسه تمرین استقامتی را با سرعت ۲۶ متر بر دقیقه و به مدت ۶۰ دقیقه انجام دادند.

گروه تمرینی محض بلافاصله پس از انجام تمرین با تزریق درون‌صفاقی کتامین ( $90 \text{ mg/kg}$ ) و زایلازین ( $10 \text{ mg/kg}$ ) بی‌هوش شدند. پس از اطمینان از بی‌هوشی رت، موهای سر و جمجمه به دقت تراشیده شد. سپس، حیوان به دستگاه استریوتاکس انتقال داده شد و سر حیوان با زاویه تقریباً  $70^\circ$  درجه در دستگاه ثابت و بی‌حرکت گردید. در ادامه، بلافاصله برش طولی در وسط ایجاد شد و محل دقیق سیسترنای مگنا<sup>۱</sup> با استفاده از راهنمای اطلس مغز رت (پاکسینوس) بین اولین مهره گردنی و جمجمه و یا حدوداً یک سانتی‌متر و نیم پایین‌تر از لامبدا مشخص گردید. (سیسترنای مگنا نقطه‌ای با مساحت تقریباً یک میلی‌متر مربع و کاملاً شفاف است که از بقیه مکان‌ها قابل تشخیص می‌باشد). قابل ذکر است که سرنگ پروانه‌ای ۲۳G به یک سرنگ انسولینی متصل بود (شکل شماره

#### 1. Cisterna Magna

یک) و به‌عنوان ابزار جمع‌آوری مایع مغزی نخاعی استفاده گردید. جهت جلوگیری از ورود خون به مایع مغزی نخاعی، نوک سرنگ به اندازه سه تا چهار میلی‌متر وارد سیسترنای مگنا گردید و عملیات کشیدن مایع توسط شخص دوم به آهستگی و در مدت کمتر از ۳۰ ثانیه تکمیل شد. همچنین، رنگ مایع به‌دقت کنترل می‌گردید تا آلوده به خون نباشد. سپس، مایع مغزی نخاعی جمع‌آوری شده (۴۰ تا ۹۰ لاند) در تیوپ‌های ۰/۲ تخلیه گشت و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۶، ۱۵). بلافاصله پس از جمع‌آوری مایع مغزی نخاعی، نمونه خون به‌صورت مستقیم از قلب حیوان جمع‌آوری گردید، جداسازی سرم انجام گرفت و پلاسما با سانتریفیوژ در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه و دور ۳۰۰۰g انجام گرفت. گروه تمرین + CGRP(8-37)، ۱۰ دقیقه قبل از انجام تمرین استقامتی، تزریق درون‌صفاقی (CGRP(8-37) به مقدار (10 µg/kg) را دریافت نمودند (۱۷). این تزریق به‌منظور منع گیرندهای CGRP و خنثی کردن عمل CGRP در بافت‌ها انجام شد. سپس، این گروه همانند گروه تمرینی محض، ادامه کار را تجربه نمود و مشمول جمع‌آوری مایع مغزی نخاعی، سرم و پلاسما پس از انجام تمرین شد.



شکل ۱- سرنگ پروانه‌ای ۲۲G متصل به سرنگ انسولینی

اندازه‌گیری مقادیر CGRP به‌وسیله کیت الیزای مربوط با شماره فروش ۲۶۶۳۷۷ از شرکت مای بیوسورس<sup>۱</sup> و به روش الیزا طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. حساسیت کیت در اندازه‌گیری معادل 5pg/ml بود. مقادیر تری‌گلیسرید نیز به‌وسیله کیت الیزای مربوط با شماره

1. ELISA Kit-96well Rat Calcitonin Gene Related peptide (Mybiosource, USA Cat Number: 266377)

فروش ۱۰۰۱۰۳۰۳ ساخت شرکت کایمن چمیکال<sup>۱</sup> طبق دستورالعمل شرکت سازنده اندازه‌گیری گردید. همچنین، اندازه‌گیری مقادیر FFA به‌وسیله کیت الایزای مربوط از شرکت ابکم<sup>۲</sup> طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت.

داده‌ها به‌صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شده‌اند. نرمال‌بودن داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیروویلیک<sup>۳</sup> و همگنی واریانس‌ها با آزمون لوین<sup>۴</sup> سنجیده شد. جهت مقایسه بین گروه‌ها نیز آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه تحلیل واریانس یک راهه<sup>۵</sup> و آزمون تعقیبی توکی مورد استفاده قرار گرفت.

## نتایج

جدول شماره یک مقادیر مربوط به سطوح CGRP در مایع مغزی نخاعی و پلازما و سطوح پلاسمایی FFA و تری‌گلیسرید در گروه‌های پژوهش را نشان می‌دهد.

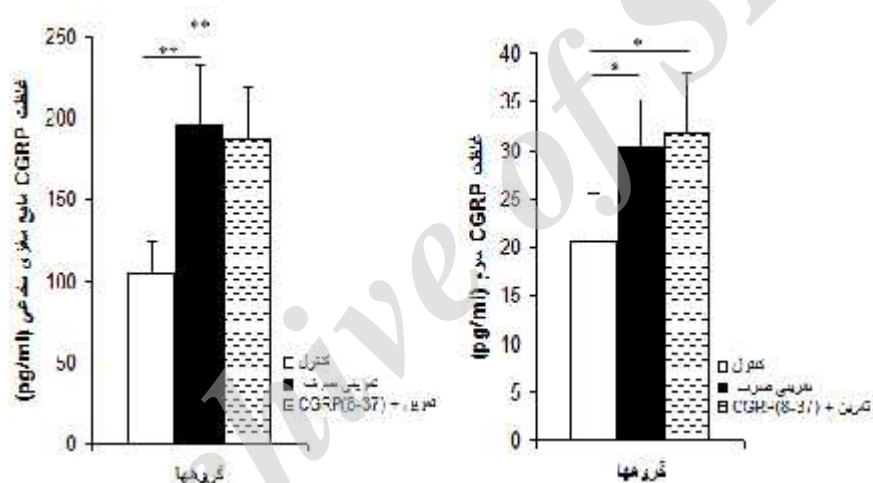
جدول ۱- سطوح CGRP در مایع مغزی نخاعی و سرم، سطوح پلاسمایی FFA و تری‌گلیسرید بلافاصله بعد از تمرین

تمرین + CGRP (8-37)	تمرینی محض	کنترل	
$187/38 \pm 31/9^*$	$196/37 \pm 35/97$	$105/08 \pm 18/75$	غلظت پپتید مرتبط با ژن کلسی تونین مایع مغزی نخاعی (pg/ml)
$31/84 \pm 6/14^*$	$30/37 \pm 4/92^*$	$20/55 \pm 5/15$	سطوح سرمی پپتید مرتبط با ژن کلسی تونین (pg/ml)
$37/33 \pm 3/5^*$	$36/67 \pm 4/97^*$	$79 \pm 20/06$	سطوح پلاسمایی تری‌گلیسرید (ng/dl)
$254/3 \pm 28/7^{*#}$	$299/6 \pm 25/9^*$	$187/3 \pm 30/2$	سطوح پلاسمایی اسید چرب آزاد ( $\mu M$ )

داده‌ها میانگین  $\pm$  انحراف معیار هستند. هر داده میانگین ۱۰ رأس حیوان است. \* تفاوت معنادار با گروه کنترل ( $P < 0.05$ )، # تفاوت معنادار با گروه تمرینی محض ( $P < 0.05$ ).

1. Triglyceride Colorimetric Assay Kit (Cat number: 10010303, Cayman Chemical, USA)
2. Rat Free Fatty Acids Quantification kit (Cat number: ab65341, abcam, USA)
3. Shapiro-Wilk
4. Levene
5. ANOVA

بلافاصله بعد از تمرین استقامتی، غلظت CGRP مایع مغزی نخاعی بین گروه‌های مختلف پژوهش تفاوت معناداری را نشان داد ( $F_{(2,27)}=17.31, P<0.01$ )؛ بدین صورت که غلظت CGRP در گروه تمرینی محض و گروه تمرین+ CGRP(8-37) نسبت به گروه کنترل به ترتیب ۸۶ و ۸۷ درصد افزایش را نشان داد (شکل شماره دو a). با این وجود، اختلاف معناداری بین غلظت CGRP مایع مغزی نخاعی در گروه تمرینی صرف نسبت به تمرین+ CGRP(8-37) مشاهده نشد. همچنین، بلافاصله پس از تمرین استقامتی، غلظت CGRP سرم بین گروه‌های مختلف پژوهش تفاوت معناداری داشت ( $F_{(2,27)}=17.31, P<0.01$ )؛ بدین صورت که سطوح سرمی در گروه تمرینی محض و گروه تمرین+ CGRP(8-37) نسبت به گروه کنترل به ترتیب ۴۷ و ۵۴ درصد افزایش را نشان داد (شکل شماره دو b) ( $P<0.01$ ).



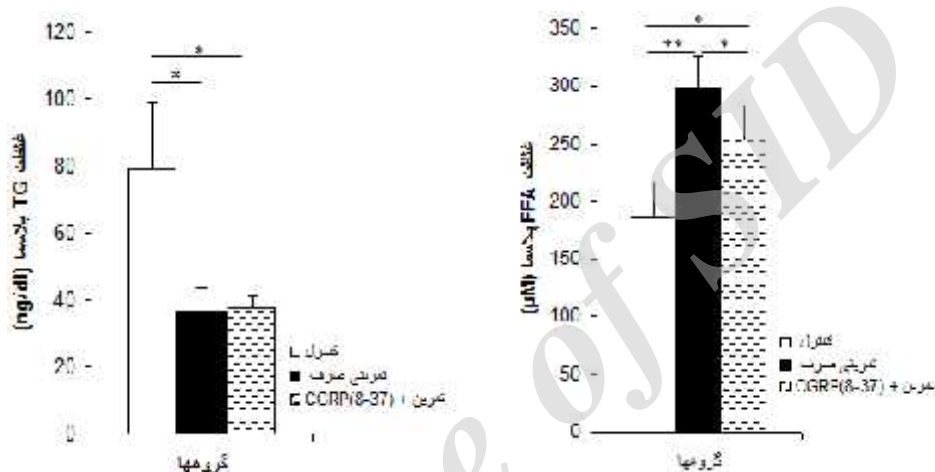
شکل ۲- (a): غلظت CGRP مایع مغزی نخاعی (b): سطوح سرمی آن بلافاصله بعد از تمرین استقامتی در گروه‌های پژوهش

کنترل (۱۰ نفر)، تمرینی محض (۱۰ نفر) و تمرین + CGRP (8-37) (۱۰ نفر)

\* اختلاف معنادار با گروه کنترل ( $P < 0.05$ )، \*\* ( $P < 0.01$ )

بلافاصله بعد از تمرین استقامتی، کاهش معنادار  $53/2$  و  $52/4$  درصدی در سطوح پلاسمایی تری‌گلیسرید به ترتیب در گروه تمرینی محض ( $P < 0.05$ ) و تمرین + CGRP(8-37) ( $P < 0.05$ ) نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (شکل شماره سه a)، اما اختلاف معناداری بین غلظت پلاسمایی تری‌گلیسرید در گروه‌های تمرینی محض و تمرین+ CGRP(8-37) وجود نداشت (شکل شماره سه a). علاوه بر این، بلافاصله بعد از تمرین استقامتی، سطوح پلاسمایی FFA بین گروه‌های پژوهش

تفاوت معناداری را نشان داد ( $F(2,27)=22.02, P<0.01$ ). غلظت پلاسمایی FFA در گروه‌های تمرینی محض و تمرین + CGRP(8-37) نیز نسبت به گروه کنترل به ترتیب نشان‌دهنده افزایش ۵۸/۲ و ۳۵ درصدی بود. همچنین، تفاوت معناداری بین غلظت پلاسمایی FFA در گروه‌های تمرینی و تمرین + CGRP (8-37) مشاهده شد ( $P<0.05$ ) (شکل شماره سه ب).



شکل ۳- (a): سطوح پلاسمایی TG، (b): سطوح پلاسمایی FFA بلافاصله بعد از تمرین استقامتی در گروه‌های پژوهش

کنترل (۱۰ نفر)، تمرینی محض (۱۰ نفر) و تمرین + CGRP(8-37) (۱۰ نفر)  
\* اختلاف معنادار بین گروه‌های پژوهش ( $P < 0.05$ ), \*\* ( $P < 0.01$ )

## بحث و نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر با انجام یک جلسه تمرین استقامتی حاد به منظور تعیین نقش CGRP بر اکسیداسیون چربی در رت‌های نر نژاد ویستار انجام گرفت. مهم‌ترین یافته پژوهش حاضر این بود که بلافاصله پس از تمرین استقامتی، غلظت CGRP افزایش قابل توجهی در مایع مغزی نخاعی و پلاسما دارد و این افزایش در مایع مغزی نخاعی نسبت به سطوح پلاسمایی بیشتر است. همچنین، اگرچه منع عملکرد بیولوژیک CGRP در حین تمرین بر سطوح TG پلاسما بدون تأثیر بود، اما باعث کاهش معنادار سطوح FFA پلاسما بلافاصله پس از انجام تمرین استقامتی گردید. این نتایج، اثرات CGRP سرم در آزادسازی و فراهم‌آوردن اسید چرب آزاد در حین تمرین استقامتی را گوشزد می‌کند.



علاوه بر این، سنجش غلظت CGRP در مایع مغزی نخاعی در پژوهش حاضر به دلیل تعیین نقش مغز در افزایش سطوح سرمی این پپتید حین تمرین استقامتی انجام گرفت و مشخص شد که متعاقب انجام تمرین استقامتی، غلظت CGRP در مایع مغزی نخاعی افزایش معناداری داشته است. CGRP در قسمت‌های مختلف مغز نظیر قشر، هیپوتالاموس و هیپوکمپ، بیان گسترده‌ای دارد (۱۸). افزایش بیان CGRP در هر کدام از این قسمت‌ها در حین تمرین می‌تواند دلیل افزایش مشاهده شده در غلظت CGRP مایع مغزی نخاعی در پژوهش حاضر باشد. این که انجام تمرین چگونه می‌تواند بیان CGRP را در قسمت‌های مختلف مغز تغییر دهد، از دو دیدگاه قابل بررسی می‌باشد. دیدگاه اول افزایش فعالیت قسمت‌های مختلف مغز در حین تمرین است. نشان داده شده است که فعالیت قسمت‌هایی از مغز نظیر قشر، مخچه و هیپوتالاموس که با انجام حرکت ارتباط مستقیم دارند در حین تمرین افزایش می‌یابد (۲۰-۱۸)، اما با توجه به این که بیان CGRP در بخش‌هایی از مغز که با حرکت درگیر می‌شوند کم است، این عامل به احتمال زیاد نمی‌تواند دلیل افزایش مشاهده شده در مایع مغزی نخاعی باشد. دیدگاه دوم، تأثیرات اندوکراین و فاکتورهای متابولیک خون است که در حین تمرین اثرات خود را از طریق دستگاه گردش خون بر مغز اعمال کرده و سبب ایجاد تغییرات مغزی می‌شود که عمده هدف این تغییرات، حفظ هموستاز بدن است (۲۱)؛ به عنوان مثال، افزایش لاکتات خون در حین تمرین می‌تواند با عبور از سد خونی - مغزی، متابولیسم خود مغز را تغییر دهد و سبب راه‌اندازی مسیرهای متابولیک مانند راه‌اندازی اکسیداسیون لیپید شود. این دیدگاه می‌تواند محتمل‌تر از دیدگاه قبل باشد، اما روش پژوهش حاضر به گونه‌ای نیست که بتواند عوامل تنظیمی احتمالی را معرفی نماید و مشخص شدن این موضوع مستلزم انجام پژوهش‌های دیگری می‌باشد.

در پژوهش حاضر، سطوح CGRP سرم در پی تمرین استقامتی افزایش معناداری داشت. نتایج نشان داد که بیان CGRP در مایع مغزی نخاعی در حین تمرین افزایش چشمگیری دارد. این نتیجه بیان می‌کند که احتمالاً افزایش بیان CGRP در مغز می‌تواند دلیل افزایش سرمی این نوروپپتید در حین تمرین باشد. با این وجود، CGRP در اندام‌های دیگر نظیر عضله اسکلتی و تیروئید نیز بیان می‌شود و این بافت‌ها می‌توانند دلیل افزایش سطوح سرمی CGRP در حین تمرین باشند (۲۰، ۲۱، ۷)، اما با توجه به این که بیان CGRP در تیروئید بسیار کم بوده و بافت تیروئید در حین تمرین استقامتی به عنوان یک بافت غیرفعال تلقی می‌شود، احتمال این که این بافت در افزایش سطوح CGRP درگیر باشد، بسیار کم است. از سوی دیگر، فعالیت عضله اسکلتی در حین تمرین افزایش می‌یابد که می‌تواند این بافت را به عنوان منبع افزایش CGRP سرم معرفی نماید. با این وجود، مطالعات پیشین نشان داده‌اند که عضله اسکلتی، توانایی آزادسازی CGRP به درون گردش خون را ندارد که این امر

نقش این بافت را در افزایش سطوح سرمی CGRP در حین تمرین خنثی می‌کند (۱۲). دلیل افزایش سطوح سرمی CGRP در حین تمرین به‌طور کامل شناخته شده نیست، اما CGRP فاکتوری است که در بین عوامل فیزیولوژیکی ناشی از تمرین در اثر عواملی چون هایپوکسی (۲۲) و تغییر در فعالیت سمپاتیک (۲۳) دستخوش تغییر می‌شود. وقوع هایپوکسی در بدن، گسترش بستر عروقی و فعالیت عوامل رگ‌گشا را ایجاد می‌کند (۲۴). حداقل دو مسیر سیگنالینگ متفاوت در زمینه رگ‌گشایی به CGRP نسبت داده شده است: مسیر نیتریک اکسید که در این مسیر CGRP از طریق رهایش نیتریک اکسید عملیات رگ‌گشایی را انجام می‌دهد (۶،۲۵) و مسیر آدنیلات سیکلاز که در آن CGRP با تحریک آدنیلات سیکلاز، سنتز cAMP را افزایش داده و منجر به فعال‌سازی کانال‌های کلسیمی حساس به ATP شده و رگ‌گشایی را تسهیل می‌کند (۶،۲۵). دومین فاکتور احتمالی، افزایش فعالیت سمپاتیک در حین تمرین است. سطوح CGRP سرم با اپی‌نفرین پلاسما ارتباط نزدیکی دارد (۲۳،۲۴). نشان داده شده است که افزایش سطوح اپی‌نفرین پلاسما به مقدار ۶/۴ نانومول در لیتر، منجر به آزاد شدن CGRP می‌شود (۲۶،۲۷). با توجه به این که مقادیر اپی‌نفرین پلاسما در حین تمرین استقامتی به این مقدار نزدیک می‌باشد؛ لذا، این امکان وجود دارد که افزایش سطوح اپی‌نفرین در حین تمرین باعث افزایش CGRP سرم شود. دلیل احتمالی دیگر، افزایش سطوح لاکتات خون در حین تمرین است. اثر مستقیم لاکتات بر آزادسازی CGRP در نخاع شوکی، در مطالعات حیوانی گزارش شده است (۲۸). همچنین، مطالعات نشان داده‌اند که آزاد شدن CGRP در ارتفاع و در شرایط هایپوکسی، الگوی مشابهی با آزاد شدن لاکتات خون دارد و وجود یک رابطه خطی بین افزایش لاکتات و افزایش CGRP خون در مطالعات پیشین گزارش شده است (۱۱).

در کنار این عوامل احتمالی، در پژوهش حاضر فرضیه‌ای مبنی بر دخالت CGRP در راه‌اندازی اکسیداسیون لیپید در حین تمرین استقامتی به آزمون گذاشته شد. برای مشخص شدن این که آیا افزایش CGRP با افزایش اکسیداسیون لیپید در حین تمرین همراه است یا نه، از تزریق درون‌صفاقی CGRP (8-37) به مقدار  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$  در گروه تمرین + CGRP (8-37) استفاده شد. CGRP (8-37) یک آنتاگونیست انتخابی گیرنده CGRP است که به‌عنوان یک منع‌کننده اختصاصی برای گیرنده‌های CGRP عمل می‌کند (۶). تأثیر نهایی این ماده، خنثی کردن عمل CGRP در بافت‌های پیرامونی است (۶). اثرات CGRP عمدتاً از طریق دو گیرنده متفاوت به نام‌های  $\text{CGRP}_{\text{R1}}$  و  $\text{CGRP}_{\text{R2}}$  میانجی‌گری می‌شوند (۶). خصوصیات آنتاگونیستی CGRP (8-37) برای هر دوی این گیرنده‌ها گزارش شده است، اما این ماده عمدتاً اثر خود را از طریق گیرنده نوع یک اعمال می‌کند (۶). استفاده از این آنتاگونیست جهت منع فعالیت پیرامونی CGRP به کرات در مقالات پیشین گزارش شده است (۱۴،۲۹). علاوه بر این، پژوهش حاضر نشان داد که سطوح پلاسمایی تری‌گلیسرید

در هر دو گروه تمرینی محض و تمرین + CGRP (8-37) در انتهای تمرین استقامتی نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری داشته است. در این پژوهش، مدت زمان تمرین استقامتی ۶۰ دقیقه در نظر گرفته شد تا میزان اکسیداسیون لیپید در حین تمرین درخور توجه باشد. مطالعات نشان می‌دهند که روند افزایشی در اکسیداسیون و به کارگیری اسیدهای چرب بعد از گذشت ۳۰ دقیقه از شروع تمرین آغاز می‌شود و از ۴۰ به بعد، به حداکثر میزان خود می‌رسد (۳۰). همچنین، در پژوهش حاضر از اندازه‌گیری دو شاخص TG و FFA پلاسما به عنوان شاخص‌های اکسیداسیون لیپید استفاده شد؛ زیرا، غلظت این سوستر (TG) در خون با مصرف چربی بدن در حین تمرین نسبت عکس دارد و این شاخص نمادی از مصرف چربی در بدن می‌باشد. FFA نیز به عنوان نمادی از آزادسازی اسید چرب از منابع اسید چرب در بدن در نظر گرفته شد. کاهش معنادار در غلظت TG پلاسما در هر گروه تمرینی محض و تمرین + CGRP (8-37) نشان‌دهنده این است که در پژوهش حاضر، به کارگیری چربی در حین تمرین مشهود بوده است. با این وجود، تفاوت معناداری بین غلظت‌های TG پلاسما بین دو گروه تمرین محض و تمرین + CGRP (8-37) دیده نشد که مؤید این نکته است که CGRP در استفاده از چربی‌ها در حین تمرین نقش معناداری ندارد. با این وجود، این تفسیر می‌بایست با احتیاط انجام گیرد؛ زیرا، این احتمال وجود دارد که با توجه به این که رت‌های مورد استفاده در پژوهش حاضر رت‌های تمرین کرده نبودند، ظرفیت محدود اکسیداسیون لیپید در آن‌ها، اثر CGRP بر اکسیداسیون لیپید را از بین برده باشد؛ به عنوان مثال، این احتمال وجود دارد که رت‌های گروه تمرینی محض، توان اکسیداسیون لیپید بیشتر از مقادیر مشاهده شده را نداشته‌اند و به همین دلیل، مقادیر یکسانی از اکسیداسیون لیپید (براساس نتایج TG) بین دو گروه مشاهده گردیده است. درگیر بودن این مسأله در نتایج پژوهش حاضر زمانی قوت گرفت که مشخص شد رت‌های گروه تمرین + CGRP (8-37) در مقایسه با گروه تمرین صرف، مقادیر FFA پلاسما کمی را در پایان تمرین استقامتی داشته‌اند؛ در حالی که سطوح TG در دو گروه مشابه می‌باشد. این نتیجه نشان می‌دهد که علی‌رغم فراهم بودن FFA بیشتر در گروه تمرینی محض، ظرفیت محدود اکسیداسیون لیپید در این حیوانات منجر به مقادیر یکسان TG (مصرف اسید چرب) در انتهای تمرین شده است. با این وجود، نتایج FFA پلاسما و مقایسه آن بین گروه‌های تمرینی نشان داد که CGRP در محیط بدن و در حین تمرین استقامتی منجر به آزاد شدن FFA می‌شود. این که چگونه CGRP این عمل را در محیط بدن انجام می‌دهد از نتایج پژوهش حاضر قابل استخراج نمی‌باشد و مشخص شدن این مهم، مستلزم انجام پژوهش‌های دیگری است، اما با توجه به نتایج مطالعات در محیط آزمایشگاه که در آن‌ها نقش CGRP در متابولیسم چربی مطالعه شده است، این امکان وجود دارد که این امر از طریق عمل CGRP بر بافت‌های چربی و عضله اسکلتی واسطه‌گری

شود. در حمایت از این موضوع نشان داده شده است که CGRP با افزایش فعالیت مسیرهای سیگنالینگ مانند cAMP و AMPK در سلول عضله اسکلتی منجر به بهبود اکسیداسیون لیپید می‌شود (۵). داناها<sup>۱</sup> و همکاران (۲۰۰۸) نیز نشان دادند که CGRP به‌عنوان یک تنظیم‌کننده مؤثر، دسترسی به اسیدهای چرب آزاد و به‌کارگیری لیپید در بافت‌های مصرف‌کننده چربی را تسهیل کرده و می‌تواند فراهم‌شدن اسیدهای چرب آزاد درون عضلانی را افزایش دهد (۸). همچنین، والکر و همکاران (۲۰۱۴) به وجود مکانیسم‌های سینالینگ مستقل از عملکرد cAMP اشاره کرده و اذعان می‌دارند که احتمال راه‌اندازی مکانیسم‌های دیگری نظیر  $Ca^{2+}/IP_3$  برای CGRP وجود دارد و اعتقاد دارند که CGRP می‌تواند مستقل از cAMP در اکسیداسیون لیپید مؤثر باشد (۹)؛ لذا، احتمال این‌که نقش CGRP در اکسیداسیون لیپید در حین تمرین از طریق این مسیرها واسطه‌گری شود وجود دارد. علی‌رغم این امر، مشخص‌شدن این موضوع نیاز به پژوهش‌های بیشتری دارد. همچنین، با توجه به این‌که اندازه‌گیری صرف شاخص‌های اکسیداسیون چربی نظیر TG و FFA پلازما نمی‌تواند به‌طور کامل بازگوکننده اکسیداسیون لیپید باشد (دیگر منابع موجود نظیر چربی درون‌عضلانی و غیره نیز اشتراک قابل‌توجهی در اکسیداسیون لیپید در حین تمرین دارند)، جمع‌آوری گازهای تنفسی در حین تمرین در کنار شاخص‌های سرمی جهت تعیین هرچه دقیق‌تر نقش CGRP در اکسیداسیون لیپید به پژوهشگران بعدی پیشنهاد می‌شود. در پژوهش حاضر این مهم به‌دلیل نبودن شرایط اندازه‌گیری در مکان انجام پژوهش میسر نشد.

**پیام مقاله:** پژوهش حاضر نشان داد که انجام تمرین استقامتی با افزایش غلظت CGRP سرم و مایع مغزی نخاعی همراه می‌باشد. همچنین، مشخص شد که تغییرات سطوح سرمی CGRP بر سطوح TG پلازما بدون تأثیر است، اما باعث افزایش در غلظت‌های پلاسمایی FFA می‌شود. براساس این نتایج، CGRP عاملی دخیل در آزادسازی FFA در حین تمرین استقامتی محسوب می‌شود.

### تقدیر و تشکر

این پژوهش با حمایت مالی و آزمایشگاهی مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان انجام شده است و نویسندگان بدین‌وسیله مراتب سپاس و قدرانی خود را از مسئولان این سازمان ابراز می‌دارند.

## منابع

1. Brain S D, Cox H M. Neuropeptides and their receptors: Innovative science providing novel therapeutic targets. *Br J Pharmacol*. 2006; 147(9): 202-11.
2. Esfandyari T, Macnaughton W K, Quirion R, St Pierre S, Junien J L, Sharkey KA et al. A novel receptor for calcitonin gene-related peptide (CGRP) mediates secretion in the rat colon: Implications for secretory function in colitis. *FASEB J*. 2000; 14(10): 1439-46. (In Persian).
3. Poyner D R, Sexton P M, Marshall I, Smith D M, Quirion R, , Born W, et al. International union of pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. *Pharmacol Rev*. 2002; 54(2): 233-46.
4. Steenbergh P H, Höppener J W, Zandberg J, Lips C J, Jansz H S. A second human calcitonin/ CGRP gene. *FEBS Lett*. 1985; 183(2): 403-7.
5. Lerner U H. Deletions of genes encoding calcitonin/ alpha-CGRP, amylin and calcitonin receptor have given new and unexpected insights into the function of calcitonin receptors and calcitonin receptor-like receptors in bone. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2006; 6(6): 87-95.
6. Docent H. Calcitonin gene-related peptide. Characterization of binding sites and structure-activity relationships in the eye and effects on intraocular pressure. Master of science Medical University of Tempere; 2004.
7. Rossetti L, Farrace S, Choi S B, Giaccari A, Sloan L, Frontoni S, et al. Multiple metabolic effects of CGRP in conscious rats: Role of glycogen synthase and phosphorylase. *Am J Physiol*. 1993; 264(1): 1-10
8. Danaher R N, Loomes K M, Leonard B L, Whiting L, Hay D L, Xu LY, et al. Evidence that alpha-calcitonin gene-related peptide is a neurohormone that controls systemic lipid availability and utilization. *Endocrinology*. 2008; 149(1): 154-60.
9. Walker C S, Hay D L, Fitzpatrick S M, Cooper G J, Loomes K M. A-calcitonin gene relate peptide (a-CGRP) mediated lipid mobilization in 3T3-L1 adipocytes. *Peptides*. 2014; 58(5): 14-9.
10. Achten J, Venables M C, Jeukendrup A E. Fat oxidation rates are higher during running compared with cycling over a wide range of intensities. *Metabolism*. 2003; 52(6): 747-52.
11. Hasbak P, Lundby C, Olsen N V, Schifter S, Kanstrup I L. Calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin release in humans: Effects of exercise and hypoxia. *Regul Pept*. 2002; 108(2): 89-95.
12. Homonko D A. Downhill exercise elicits differential changes in the levels of calcitonin gene-related peptide in the intact adult rat neuromuscular system. Doctor of science University of Toronto; 1999.
13. Sun X J, Pan S S. Role of calcitonin gene-related peptide in cardioprotection of short-term and long-term exercise preconditioning. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2014; 64(1): 53-9.
14. Schuler B, Rieger G, Gubser M, Arras M, Gianella M, Vogel O ,et al. Endogenous acalcitonin-gene-related peptide promotes exercise-induced, physiological heart hypertrophy in mice. *Acta Physiol*. 2014; 211(1): 107-21.

15. Pegg C C, He C, Stroink A R, Kattner K A, Wang C X. Technique for collection of cerebrospinal fluid from the cisterna magna in rat. *J Neurosci Methods*. 2010; 187(1): 8-12.
16. Liu L, Duff K. A technique for serial collection of cerebrospinal fluid from the Cisterna Magna in Mouse. Published Online. 2008; 10(21): 3791-960.
17. Z bil Büyükco kun N, Güleç G, Cam Etöz B, Ozlük K. Central effects of glucagon-like peptide-1 on cold-restraint stress-induced gastric mucosal lesions. *Turk J Gastroenterol*. 2007; 18(3): 150-6.
18. Wyon Y, Hammar M, Theodorsson E, Lundeberg T. Effects of physical activity and acupuncture on calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in different parts of the rat brain and in cerebrospinal fluid, serum and urine. *J Appl Physiol*. 2000; 162(4): 517-22.
19. Brain S D, Grant A D. Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. *Physiol Rev*. 2004; 84(3): 903-34.
20. Bell D, McDermott B J. Calcitonin gene-related peptide in the cardiovascular system: Characterization of receptor populations and their (patho) physiological significance. *Pharmacol Rev*. 1996; 48(2): 253-88.
21. Hongbao M A. Calcitonin gene-related peptide (CGRP). Doctoral of science Department of Medicine, Michigan State University, East Lansing, Michigan; 2004.
22. Keith I M<sup>1</sup>, Ekman R. Dynamic aspects of regulatory lung peptides in chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Exp Lung Res*. 1992; 18(2): 205-24.
23. Goadsby P J, Edvinsson L, Ekman R. Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache. *Ann Neurol*. 1990; 28(2): 183-7.
24. Hansen P B, Schnermann J. Vasoconstrictor and vasodilator effects of adenosine in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003; 285(4): 590-9.
25. Kawase T<sup>1</sup>, Okuda K, Burns D M. Immature osteoblastic MG63 cells possess two calcitonin gene-related peptide receptor subtypes that respond differently to [Cys(Acm) (2,7)] calcitonin gene-related peptide and CGRP (8-37). *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005; 289(4): 811-8.
26. Tidgren B, Theodorsson E, Hjemdahl P. Renal and systemic plasma immunoreactive neuropeptide Y and calcitonin gene-related peptide responses to mental stress and adrenaline in humans. *Clin Physiol*. 1991; 11(1): 9-19.
27. Trasforini G, Margutti A, Valentini A, Ambrosio M R, Bondanelli M, Rossi R ,et all. Interrelationships between calcitonin gene-related peptide and sympathoadrenomedullary system: Effects of administration of epinephrine and norepinephrine in healthy man. *Regul Pept*. 1996; 63(1): 57-61.
28. Wang X, Fiscus R R. Lactic acid potentiates bradykinin- and low-pH-induced release of CGRP from rat spinal cord slices. *Am J Physiol*. 1997; 273(1): 92-8.
29. Hindiyeh N A, Krusz J C, Cowan R P. Does exercise make migraines worse and tension type headaches better? *Curr Pain Headache Rep*. 2013; 17(12): 380.
30. Jeppesen J, Kiens B. Regulation and limitations to fatty acid oxidation during exercise. *J Physiol*. 2012; 590(5): 1059-68.

**استناددهی**

سادات حسینی نجمه، نیکویی روح‌الله، مفلحی داریوش. تعیین نقش CGRP در اکسیداسیون چربی حین تمرین استقامتی در رت‌های نر نژاد ویستار. فیزیولوژی ورزشی. زمستان ۱۳۹۵؛ ۸(۳۲): ۱۸۵-۲۰۰.

Sadat Hossini. N, Nikooie. R. A, Moflehi. D. Determination of CGRP Role in Lipid Oxidation During Endurance Exercise in Male Wistar Rats. Sport Physiology. Winter 2017; 8 (32): 185-200.

Archive of SID

## Determination of CGRP Role in Lipid Oxidation during Endurance Exercise in Male Wistar Rats

N. Sadat Hossini<sup>1</sup>, R. Nikooie<sup>2</sup>, D. Moflehi<sup>3</sup>

1. M.Sc. of Shahid Bahonar University of kerman
2. Associate Professor, Shahid Bahonar University of kerman \*
3. Assistance Professor, Shahid Bahonar University of kerman

Received: 2016/01/18

Accepted: 2016/03/05

### Abstract

Energy homeostasis during exercise is a complex interaction of neuronal and hormonal inputs that are integrated at the level of the central nervous system (CNS). The aim of the present study was to investigate the role of calcitonin gene related peptide (CGRP) in fat oxidation during acute exercise in male Wistar rats. Thirty animals were randomly divided into three groups: control (C; n = 10), training (T; n = 10) and training + CGRP (8-37) (T+CGRP8-37; n = 10). The animals from T and T+CGRP8-37 groups performed a single bout of endurance exercise at 26 m/min for 60 min. Cerebrospinal fluid (CSF) and blood samples were collected immediately after exercise. The animals from T+CGRP8-37 group received CGRP (8-37) (an antagonist of CGRP receptor, 10 µg/kg; IP) before endurance exercise. CGRP concentrations in the cerebrospinal fluid and serum, FFA, and triglyceride concentrations were measured by ELISA. The difference between groups were evaluated with one-way ANOVA test and Tukey's post-hoc test. CGRP concentrations in the cerebrospinal fluid and serum were significantly higher in the animals from T (P<0.01) and T+CGRP8-37 (P<0.01) in comparison to C group. In both trained groups, plasma levels of triglycerides significantly decreased (P<0.05) and plasma FFA was significantly higher compared to that of the animals from C group (P<0.01). At the end of the exercise, only plasma FFA concentration was significantly higher in the animals from T group compared to T+CGRP8-37 group (P<0.05). In summary, endurance exercise leads to an increase in CGRP concentrations in serum and CSF, which is a contributing factor in FFA release during endurance training.

**Keyword:** Calcitonin Gene-Related Peptide, Endurance Training, Energy Homeostasis, Fat Oxidation

\*Corresponding Author

Email: r\_nikooie@uk.ac.ir