

تأثیر حاد و بلندمدت تمرین استقامتی بر بیان ژن CGRP در مغز، مایع مغزی نخاعی و سرم رت‌های نر نژاد ویستار

ملیحه آوسه^۱، مریم کوشکی جهرمی^۲، جواد نعمتی^۳، سعید اسماعیلی ماهانی^۴

۱. دانشجوی دکتری بیوشیمی و متابولیسم ورزشی، دانشگاه شیراز

۲. دانشیار فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه شیراز*

۳. استادیار فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه شیراز

۴. دانشیار زیست‌شناسی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۹/۲۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۴/۲۴

چکیده

هدف از انجام مطالعه حاضر، تعیین تأثیر حاد و بلندمدت تمرین استقامتی بر بیان ژن پپتید مرتبط با ژن کلسی‌تونین در مغز، مایع مغزی نخاعی و سرم موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار بود. تعداد ۴۰ حیوان به چهار گروه کنترل، حاد، تمرینی مزمن و تمرین‌کرده حاد تقسیم شدند. گروه حاد یک جلسه تمرین استقامتی و گروه تمرین‌کرده حاد یک جلسه تمرین استقامتی را بعد از ۱۲ هفته تمرین و گروه تمرینی مزمن ۱۲ هفته تمرین استقامتی را انجام دادند. مایع مغزی نخاعی جمع‌آوری شد و قسمت‌های مختلف مغز استخراج شدند. غلظت پپتید کلسی‌تونین در مایع مغزی نخاعی و سرم با تکنیک الیزا و بیان ژن آن با تکنیک ریل‌تایم پی.سی.آر. اندازه‌گیری گردید. از آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌راهه برای مقایسه‌ها استفاده شد. در مقایسه با گروه کنترل، پپتید کلسی‌تونین مایع مغزی نخاعی در گروه‌های حاد ($P = 0.006$) و تمرین‌کرده حاد ($P = 0.008$) و پپتید کلسی‌تونین سرم در گروه‌های حاد ($P = 0.009$) و تمرین‌کرده حاد ($P = 0.007$)، به‌طور معناداری بالاتر بود. پپتید کلسی‌تونین تنها در قشر گروه‌های حاد ($P = 0.007$) و تمرین‌کرده حاد ($P = 0.006$) نسبت به گروه کنترل و همچنین، گروه تمرین‌کرده حاد نسبت به گروه حاد ($P = 0.018$) به‌طور معناداری بالاتر بود. در هیچ‌یک از متغیرهای پژوهش، اثر بلندمدت تمرین معنادار نبود. به‌طور کلی، افزایش بیان ژن پپتید کلسی‌تونین در قشر، به‌احتمال زیاد مسئول افزایش آن در مایع مغزی نخاعی و سرم در حین تمرین است. همچنین، سطوح استراحتی پپتید کلسی‌تونین سرم و مایع مغزی نخاعی و بیان آن، تحت تأثیر بلندمدت تمرین قرار نمی‌گیرند؛ اما مشمول پاسخ پس از سازگاری می‌شوند.

واژگان کلیدی: پپتید وابسته به ژن کلسی‌تونین، سازگاری تمرینی، مغز، مایع مغزی نخاعی

مقدمه

خانواده پپتیدهای کلسی‌تونین شامل شش عنصر به نام‌های کلسی‌تونین^۱، آمیلین^۲، آدرنومدولین^۳، پپتید مربوط به ژن کلسی‌تونین^۴ (CGRP) و اینترمدین^۵ است. پپتید وابسته به ژن کلسی‌تونین نوروپپتیدی ۳۷ اسیدآمینوای است که در بدن انسان و حیوان به دو شکل عمده (α و β) وجود دارد. α -CGRP غالباً در دستگاه عصبی مرکزی و محیطی وجود دارد؛ درحالی‌که β -CGRP به‌طور عمده در دستگاه عصبی روده‌ای^۶ بیان می‌شود (۱). تولید عمده CGRP در دستگاه عصبی مرکزی و پیرامونی است. در سطح سلولی، بالاترین سطح بیان پپتید در آمیگدال مرکزی^۷، پوسته هسته دم‌دار^۸ (یکی از اجزای عقده‌های قاعده‌ای)، هسته عصب سه شاخه ستون فقرات^۹، توده ژلاتینی^{۱۰} و شاخ خلفی نخاع یافت می‌شود. این درحالی است که منبع عمده CGRP در دستگاه عصبی پیرامونی در پیوندگاه عصبی - عضلانی یافت می‌شود؛ هرچند این پپتید در عضله اسکلتی و غده تیروئید نیز بیان می‌شود (۲).

CGRP در بدن انسان و حیوان اعمال زیست‌شناختی متعددی را انجام می‌دهد. CGRP گشادکننده بسیار قوی عروق پیرامونی است و در نتیجه، دارای توانایی حفاظتی است که برای برخی شرایط فیزیولوژیک و بیماری‌شناختی دستگاه قلبی و عروقی و بهبود زخم مهم است (۳، ۴). همچنین، این پپتید نقش مهمی در اتساع عروق خون مغزی دارد که نقش حفاظتی مهم آن را در سلول‌های عصبی متذکر می‌شود (۵، ۶). در این زمینه، اطلاعات موجود حاکی از محافظت موش‌های صحرایی از ایسکمی مغزی است (۷). به علاوه، به دلیل اینکه CGRP از اعصاب حسی منتشر می‌شود، در مسیر درد نیز نقش دارد؛ بنابراین، اخیراً به استفاده از آنتاگونیست CGRP برای کاهش میگردن توجه شده است (۸، ۴، ۳). همچنین، این پپتید در مسیرهای متابولیکی نظیر تنظیم متابولیسم گلوکز و چربی نقش دارد (۹، ۱۰)؛ برای مثال، سنتز گلیکوژن ناشی از انسولین را در عضله اسکلتی کاهش می‌دهد (۹) و در متابولیسم کربوهیدرات عضله اسکلتی نقش مهمی دارد (۱۰). افزون‌براین، رهایش CGRP در مدت هیپوگلیسمی، سازوکار مهمی برای تسریع بازگشت سطوح گلوکز خون به سطح طبیعی است (۱۱).

1. Calcitonin
2. Amylin
3. Adrenomedullin
4. Calcitonin Gene-Related Peptide
5. Intermedin
6. Enteric Nervous System
7. Central Amygdaloid
8. Caudate Putamen
9. Spinal Trigeminal Nerve Nucleus
10. Substantia Gelatinosa

محدوده پژوهش‌های انجام‌شده در زمینه تمرین و CGRP نشان می‌دهد که غلظت CGRP سرم در طی تمرین حاد در انسان و حیوان افزایش می‌یابد. نقش بالقوه این افزایش به‌طور دقیق مشخص نیست؛ اما نقش‌های احتمالی برای آن گزارش شده‌اند؛ به‌عنوان مثال، هاسباک^۱ و همکاران (۱۲) نشان دادند که با انجام تمرین بیشینه در سطح دریا و متعاقب آن، بعد از ۲۴ ساعت و بعد از پنج روز قرارگرفتن در معرض ارتفاع و هیپوکسی، مقادیر CGRP و آدرنودولین یک هم‌راستا با ضربان قلب، لاکتات و کاتکولامین‌ها افزایش می‌یابند. این پژوهشگران نشان دادند که رهایش CGRP در حین تمرین توسط هیپوکسی تعدیل می‌شود. آن‌ها بیان کردند که رهایش CGRP تنها به‌دلیل خاصیت ضدسمپاتیکی آن در حین تمرین نیست و نقش‌های احتمالی دیگری برای آن وجود دارند. در پژوهشی دیگر، تأثیرات تمرین‌های کوتاه‌مدت و بلندمدت بر تأثیر CGRP در محافظت قلبی بررسی شدند (۱۳). در این پژوهش نشان داده شد که تمرین‌های کوتاه‌مدت تأثیری بر نقش محافظت قلبی CGRP ندارند؛ اما تمرین‌های بلندمدت باعث افزایش سنتز CGRP در گانگلیون ریشه پستی و افزایش رهایی آن در قلب و خون می‌شوند و نقش مهمی در محافظت قلبی در حین تمرین ایجاد می‌کنند (۱۳). این نتایج حاکی از اهمیت بالقوه افزایش CGRP در حین تمرین است.

در زمینه اثرهای بلندمدت تمرین بر سطوح استراحتی CGRP نیز پژوهش‌های بسیار محدودی انجام شده‌اند. در تنها پژوهش انجام‌شده در این زمینه، پرنو و همکاران (۱۴) اثرهای تمرین استقامتی (۶۰ دقیقه در روز و سه متر در دقیقه) و مقاومتی بر CGRP و گیرنده استیل کولین^۲ فیبرهای عضلانی کندانقباض سولئوس و تندانقباض درشت‌نی قدامی و عصب سیاتیک را مطالعه کردند. نتایج نشان داد که بین عضلات با ویژگی‌های مختلف و در هر دو نوع تمرین، افزایش قابل توجهی در CGRP و گیرنده استیل کولین مشاهده نشد. هومونکو^۳ و همکاران (۱۵) نشان دادند که بعد از دویدن در سرپایینی، بیان CGRP در نورون‌های حرکتی عضله دوقلوی میانی موش‌های صحرایی و صفحه انتهایی حرکتی فیبرهای عضلانی گلیکولیتی، سریع افزایش می‌یابد. باوجود انجام پژوهش‌های ذکرشده، در حال حاضر، اثرهای بلندمدت تمرین استقامتی بر سطوح استراحتی CGRP سرم و مایع مغزی نخاعی نامشخص است. همچنین، هرچند محتمل است که مغز به‌عنوان عامل افزایش رهایش CGRP سرم در حین تمرین باشد، در این زمینه نیز مدرک مستندی وجود ندارد. با در نظر گرفتن این موضوع که اعمال متعددی که به‌واسطه CGRP در بدن واسطه‌گیری می‌شوند، در حین تمرین تغییرات قابل‌ملاحظه دارند، آگاهی از نحوه پاسخ CGRP به تمرین می‌تواند به شناخت بهتر اعمال زیست‌شناختی این پپتید در حین تمرین کمک کند؛ بنابراین، هدف اول پژوهش حاضر، تعیین تأثیر بلندمدت تمرین استقامتی

1. Hasbak
2. AChR
3. Homonko

بر بیان ژن CGRP در قسمت‌های مختلف مغز، مایع مغزی نخاعی و سرم بود. هدف دوم، تعیین پاسخ پس از سازگاری این‌پیتید در سرم، مایع مغزی نخاعی و بیان آن در قسمت‌های مختلف مغز در موش‌های صحرائی تمرین کرده و مقایسه آن با موش‌های صحرائی تمرین‌نکرده بود.

روش پژوهش

تعداد ۴۰ سر موش صحرائی نر نژاد ویستار در سن شش تا هشت‌هفتگی از مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان تهیه شدند و در شرایط استاندارد آزمایشگاه در چرخه ۱۲:۱۲ ساعت تاریکی - روشنایی نگهداری شدند. موش‌های صحرائی با غذای مخصوص موش صحرائی و آب تغذیه شدند و بعد از یک هفته نگهداری و آشناسازی با محیط آزمایشگاه، موش‌های صحرائی براساس وزن همسان‌سازی شدند و به‌طور تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند: گروه کنترل (تعداد = ۱۰) که در قفس‌های خود در تمام مدت غیرفعال بودند؛ گروه حاد (تعداد = ۱۰): موش‌هایی صحرائی که فقط یک جلسه تمرین استقامتی انجام دادند؛ گروه تمرینی مزمن (تعداد = ۱۰): موش‌هایی صحرائی که ۱۲ هفته تمرین استقامتی انجام دادند؛ گروه تمرین کرده حاد (تعداد = ۱۰): موش‌هایی صحرائی که یک جلسه تمرین را پس از گذراندن دوره ۱۲ هفته‌ای تمرین استقامتی انجام دادند. گروه‌های حاد و تمرینی حاد بلافاصله بعد از تمرین تشریح شدند. گروه تمرین مزمن ۷۲ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین تشریح شدند. برای انجام پژوهش حاضر، مجوز اخلاق از کمیته اخلاقی مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان دریافت شد. در ابتدا، موش‌های صحرائی گروه حاد دوره آشناسازی مشتمل بر تمرین دویدن روی نوارگردان با سرعت ۱۵-۲۶ متر در دقیقه را به مدت ۳۰-۶۰ دقیقه، به مدت ۱۰ روز انجام دادند. هدف از دوره آشناسازی در این گروه، بالابردن توانایی موش‌های صحرائی برای انجام یک جلسه تمرین استقامتی به مدت ۶۰ دقیقه با سرعت ۲۶ متر در دقیقه بود. برای حذف اثرهای تمرینی دوره آشناسازی، یک هفته بعد از این دوره، گروه‌های ذکر شده یک جلسه تمرین استقامتی را با سرعت ۲۶ متر در دقیقه به مدت ۶۰ دقیقه انجام دادند.

در گروه تمرینی مزمن، دوره آشناسازی به مدت پنج روز با سرعت ۱۵ متر در دقیقه و با زمان ۲۰-۱۵ دقیقه انجام شد. سپس، پروتکل تمرین استقامتی به مدت ۱۲ هفته انجام شد که طی آن، به تدریج به سرعت و زمان افزوده شد. متغیرهای تمرینی، در نهایت در هفته آخر به سرعت ۲۶ متر در دقیقه به مدت ۶۰ دقیقه رسیدند (جدول شماره یک) (۱۶). گروه‌های حاد و تمرین کرده حاد بلافاصله بعد از انجام تمرین تشریح شدند و مشمول جمع‌آوری مایع مغزی نخاعی برای اندازه‌گیری غلظت CGRP شدند. سپس، حیوانات تشریح شدند؛ نمونه‌خونی به‌طور مستقیم از قلب انجام شد و جداسازی پلاسما

با سانتریفیوژ کردن در ۳۰۰۰ دور در دقیقه^۱، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه برای اندازه گیری سطوح سرمی CGRP انجام شد. همچنین، قسمت های مختلف مغز شامل هیپوکمپ، قشر، مخچه و هیپوتالاموس استخراج شدند و در نیتروژن مایع منجمد و در ۸۰- برای اندازه گیری بیان CGRP نگهداری شدند. تمامی مراحل و اندازه گیری های ذکر شده، ۷۲ ساعت بعد از انجام آخرین جلسه تمرینی در گروه تمرینی مزمین نیز انجام شدند.

جدول ۱- جزئیات پروتکل تمرینی

هفته	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
زمان (دقیقه)	۳۰	۳۵	۴۰	۴۵	۵۰	۵۵	۵۵	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰
سرعت (متر در دقیقه)	۲۰	۲۰	۲۰	۲۲	۲۲	۲۲	۲۴	۲۴	۲۶	۲۶	۲۶	۲۶

در ابتدا، موش های صحرایی با تزریق درون صفاقی کتامین (۹۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) بی هوش شدند. پس از اطمینان از بی هوشی موش صحرایی، موش های سر و جمجمه به دقت تراشیده شدند تا خطوط ایجاد کننده برگما و لامبدا مشخص شوند. سپس، حیوان به دستگاه استریوتاکس منتقل شد و سر حیوان در دستگاه با زاویه ۴۵ درجه به سمت پایین ثابت و بی حرکت شد. برش طولی در خط میانی سر ایجاد عضلات و بافت های اضافی برداشته شد تا سیستمنا مگنا^۲ مشخص شود. نوک سوزن پروانه ای به اندازه کمتر از دو میلی متر و با زاویه ۴۵ درجه وارد سیستمنا مگنا شد و جمع آوری مایع مغزی نخاعی به آهستگی انجام شد. در مدت جمع آوری، رنگ مایع مغزی نخاعی به دقت کنترل می شد تا از آلودگی یا خون جلوگیری شود. نمونه های حاصل در ۱۲۰۰۰ در ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و سوپرناتانت برای اندازه گیری بعدی جمع آوری شد (۱۷). بعد از جمع آوری مایع مغزی نخاعی، نمونه خونی از طریق قلب جمع آوری شد و سپس، جداسازی پلاسما با سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰، ۱۵ دور در دقیقه و در دمای چهار درجه انجام گرفت. پس از آن، موش های صحرایی تشریح شدند؛ قشر، هیپوتالاموس، هیپوکمپ و مخچه استخراج شدند و در نیتروژن مایع فریز شدند و سپس، در فریزر ۸۰- برای اندازه گیری های بعدی نگهداری شدند. روش اندازه گیری CGRP: غلظت CGRP در مایع مغزی نخاعی و سرم با استفاده از کیت آزمایشگاهی شرکت مای بیوسورس آمریکا^۳ با حساسیت یک پیکوگرم بر میلی لیتر و ضریب درون سنجی ۵/۶ درصد

1. RPM
2. Cisterna Magna
3. Rat CGRP ELISA Kit (Cat Number: MBS727982, Mybiosource, USA)

به روش الیزا اندازه‌گیری شد. بیان ژن CGRP در مغز به وسیله تکنیک ریل تایم- پی.سی.آر.^۱ اندازه‌گیری شد و با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ کمی‌سازی گردید.

حدود ۵۰ میلی‌گرم از بافت با روش هاون کوبی در نیتروژن مایع پودر شد (در مواردی که حجم نمونه کم بود، بافت موردنظر به‌طور مستقیم در ایزول^۲ هموزن می‌شد) و برای استخراج total RNA به نسبت یک به ۱۰ در ایزول هموزن شد. برای برداشتن اجزای پروتئینی، محصول حاصل در دمای چهار درجه و به مدت ۱۰ دقیقه در در ۱۲۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت برداشته شد؛ با نسبت یک به ۰/۵ با کلروفورم مخلوط شد؛ محصول در دمای چهار درجه به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ g سانتریفیوژ گردید و بخش معدنی و آبی از هم جدا شدند. بخش محتوی RNA برداشته شد؛ با نسبت یک به ۰/۵ با ایزوپروپانل مخلوط شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق رها شد. سپس، در دمای چهار درجه به مدت ۱۰ دقیقه ۱۲۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. پلیت^۳ حاوی RNA در اتانول شست‌وشو و در ۲۰ میلی‌لیتر آب RNAs-Free حل شد. غلظت RNA با استفاده از دستگاه نانو دراپ^۴ سنجیده شد. برای صحت خلوص RNA، از نسبت ۲۸۰/۲۶۰ استفاده شد و نسبت‌های بین ۱/۸ تا دو به‌عنوان تخلیص مطلوب در نظر گرفته شدند (۱۸).

سنتز cDNA با استفاده از یک میکروگرم از RNA و با استفاده از Random Hexamer و آنزیم Primescript TM RT enzyme mix I با کیت سنتز cDNA متعلق به شرکت تاکارای ژاپن^۵ طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد.

در ابتدای کار، میزان غلظت بهینه cDNA و همچنین، پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از آزمایش سریال غلظت، برای هر کدام به‌طور جداگانه مشخص گردید؛ به‌طوری‌که کمترین میزان دایمر مشاهده شود. ریل تایم- پی.سی.آر. با استفاده از Premix Ex Taq II (2x) و با استفاده از غلظت مناسب cDNA و پرایمرهای مربوط به هر ژن انجام شد. برنامه ریل تایم شامل واسرشت اولیه سه دقیقه در دمای ۹۵ درجه بود که با ۴۰ چرخه (۹۵ درجه به مدت ۲۲ ثانیه و اکستنشن ۶۶ درجه به مدت ۴۵ ثانیه) بود. توالی پرایمرهای استفاده‌شده در جدول شماره دو گزارش شده است. از ۱۸s به‌عنوان ژن مرجع استفاده شد و داده‌های ریل تایم با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ کمی‌سازی شدند (۱۹). یکسان‌بودن کارایی پرایمرها در تکثیر ژن‌های موردنظر، با استفاده از سریال غلظت cDNA مربوطه آزمون شد.

1. Rael Time- PCR
2. Isol
3. Pellet
4. Nono Drop
5. (cDNA Kit, cat# RR037A, TaKaRa, Japan)

جدول ۲- توالی‌های پرایمر استفاده شده برای ریل تایم- پی.سی.آر.

Gene	Forward primer (5' to 3')	Backward primer (5' to 3')	Size (bp)
18 S	GTTGGTTTTTCGGAAGCTGAGGC	GTCGGCATCGTTTATGGTCG	204
CGRP	AGTTCTCCCTTTCTGGTTGTC	CTCCTGTTCTCCTCCTGCTC	94

در بخش آمار توصیفی، از شاخص‌های پراکندگی انحراف معیار، میانگین و نمودار استفاده شد. در بخش آمار استنباطی، برای تعیین طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون کلموگروف-اسمیرنوف^۱ استفاده شد. همسان بودن واریانس‌ها در مقایسه‌های بین گروهی، با آزمون لوین^۲ سنجیده شد. برای تعیین معنادار بودن تفاوت متغیرها بین گروه‌های پژوهش، از آزمون‌های آنالیز واریانس یک‌راهه^۳ و آزمون تعقیبی توکی^۴ استفاده شد. در تمامی آزمون‌های استنباطی، سطح معناداری برابر با $a = 0.05$ انتخاب شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزارهای اکسل^۵ و اس.پی.اس.اس^۶ (نسخه ۱۹) استفاده شد.

نتایج

برای تعیین تأثیر بلندمدت و کوتاه‌مدت تمرین بر بیان CGRP در مغز، غلظت آن در مایع مغزی نخاعی و سرم، این مقادیر بین گروه‌های تمرینی مزمن و کنترل، حاد و کنترل، تمرین کرده حاد و کنترل، و با هدف بررسی تأثیر سازگاری بر پاسخ، پاسخ گروه‌های حاد و تمرین کرده حاد به یک جلسه تمرین، با یکدیگر مقایسه شدند. نتایج حاکی از عدم تفاوت معنادار در CGRP به دنبال تمرین بلندمدت بود؛ بدین معنی که بیان CGRP در مغز و غلظت‌های سرمی و مغزی نخاعی آن تحت تأثیر تمرین بلندمدت قرار نگرفت (جدول شماره سه).

در پاسخ به ورزش حاد، غلظت CGRP در مایع مغزی نخاعی حدود $1/95$ برابر در گروه حاد ($P = 0.006$) و $2/3$ برابر در گروه تمرین کرده حاد ($P = 0.008$) در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت. همچنین، غلظت CGRP در مایع مغزی نخاعی در گروه تمرین کرده حاد نسبت به گروه حاد به طور معناداری بالاتر بود ($P = 0.031$) (جدول شماره سه). هم‌راستا با افزایش غلظت CGRP در مایع مغزی نخاعی، غلظت CGRP سرم حدود $1/5-1/7$ برابر در گروه‌های حاد ($P = 0.009$) و تمرین کرده

1. Kolmogorov-Smirnov
2. Levene's Test
3. One-way ANOVA
4. Tukey Post Hoc Test
5. Excel
6. SPSS

حاد نسبت به گروه کنترل افزایش یافت. غلظت CGRP سرم، در گروه‌های تمرین‌کرده حاد نسبت به گروه حاد به‌طور معناداری بالاتر بود ($P = 0.034$) (جدول شماره ۳ه).

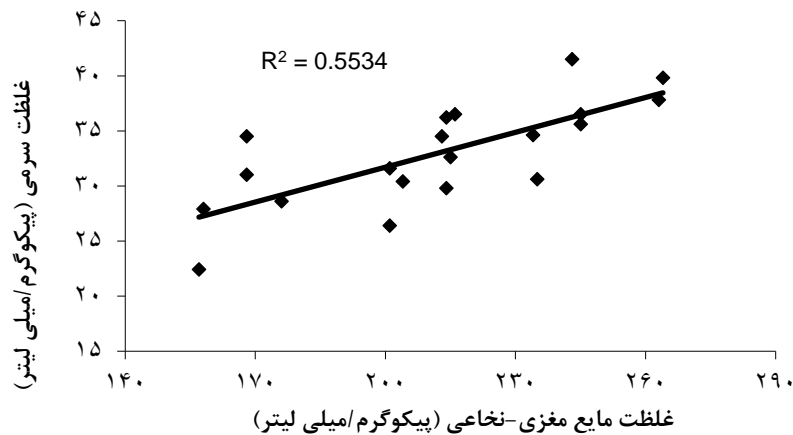
جدول ۳- تأثیرات کوتاه‌مدت و بلندمدت تمرین بر سرم و مایع مغزی نخاعی

متغیرها	تمرینی مزمن	تمرین‌کرده حاد	حاد	کنترل
CGRP سرم (pg/ml)	۲۱/۴ ± ۳/۵	۳۵/۲ ± ۳/۸* [≠]	۳۰/۵ ± ۴/۴*	۲۰/۶ ± ۳/۲
CGRP مایع مغزی نخاعی (pg/ml)	۱۰۷/۴ ± ۲۲/۲	۲۲۸/۱ ± ۲۹/۵* [≠]	۱۹۵/۳ ± ۲۹/۳*	۹۹/۸ ± ۱۸/۴

(داده‌ها میانگین ± انحراف معیار هستند. هر داده میانگین تعداد ۱۰ سر حیوان است).

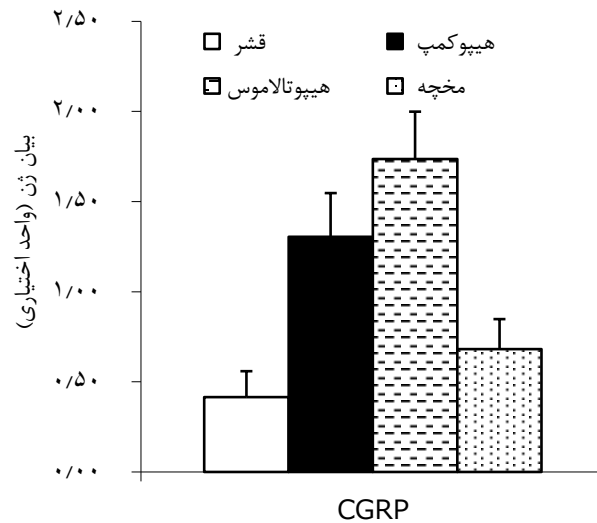
* تفاوت معنادار با گروه کنترل ($P < 0.01$), [≠] تفاوت معنادار با گروه حاد ($P < 0.05$)

برای تعیین سهم مایع مغزی نخاعی در CGRP سرم، رابطه بین CGRP مایع مغزی نخاعی و CGRP سرم ارزیابی شد. ارتباط معناداری بین غلظت CGRP در مایع مغزی نخاعی و سرم بعد از تمرین حاد در دو گروه حاد و تمرین‌کرده حاد (روی‌هم‌رفته) مشاهده شد ($r = 0.74$, $P < 0.01$) (شکل شماره یک). ۵۵ درصد از تغییرات واریانس، تغییرات در CGRP سرم با تغییرات CGRP مایع مغزی نخاعی در پایان تمرین حاد قابل‌پیش‌بینی بود ($R^2 = 0.55$ ، پیکوگرم بر میلی‌لیتر $SEE = ۳/۷۴$). (شکل شماره یک).



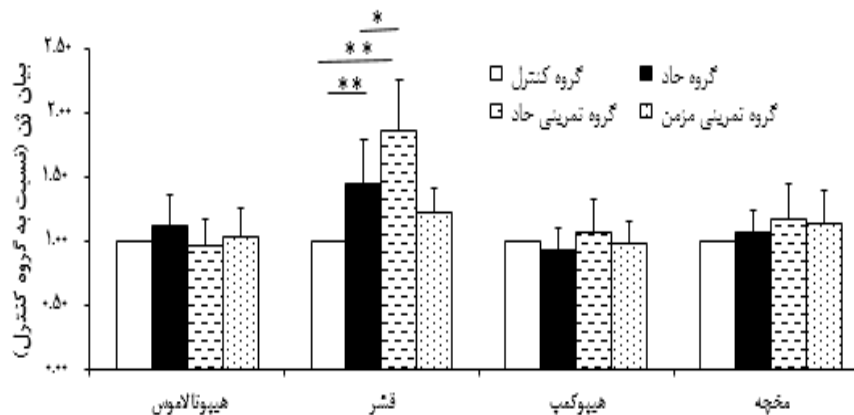
شکل ۱- همبستگی بین غلظت CGRP در مایع مغزی نخاعی و سرم بعد از تمرین حاد در دو گروه حاد (تعداد = ۱۰) و تمرین‌کرده حاد (تعداد = ۱۰)

برای فهمیدن اینکه چه بخشی از مغز می‌تواند در افزایش CGRP مایع مغزی نخاعی در طی تمرین درگیر باشد، بیان آن در بخش‌های مختلف مغز بررسی شد. در گروه کنترل، بالاترین و پایین‌ترین بیان CGRP، به ترتیب در هیپوتالاموس و قشر دیده شد (شکل شماره دو).



شکل ۲- سطوح استراحتی بیان ژن CGRP در قسمت‌های مختلف مغز در گروه‌های پژوهش

در مقایسه با حیوانات گروه کنترل، بیان CGRP قشر به‌طور قابل توجهی در پاسخ به یک جلسه ۶۰ دقیقه‌ای تمرین در هر دو گروه حاد ($P = 0.007$) و تمرین کرده حاد ($P = 0.006$) نسبت به گروه کنترل بالاتر بود. همچنین، بیان CGRP در قشر در گروه تمرین کرده حاد در مقایسه با گروه حاد به‌طور معناداری بالاتر بود (شکل شماره سه). بیان CGRP در بقیه قسمت‌های مغز بدون تغییر باقی ماند (شکل شماره سه). مقادیر استراحتی بیان CGRP تحت تأثیر تمرین بلندمدت قرار نگرفت؛ بدین معنی که اختلاف معناداری بین گروه‌های کنترل و تمرینی مزمن در هیچ‌کدام از قسمت‌های مغز دیده نشد.



شکل ۳- بیان ژن CGRP در قسمت‌های مختلف مغز در گروه‌های پژوهش

* اختلاف معنادار ($P < 0.05$)، ** ($P < 0.01$)

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر با هدف تعیین تأثیر بلندمدت تمرین استقامتی و پاسخ پس از سازگاری CGRP سرم و مایع مغزی نخاعی و بیان این پپتید بر قسمت‌های مختلف مغز، در موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار انجام شد. مهم‌ترین نتیجه مطالعه حاضر این بود که بیان CGRP در حین تمرین استقامتی در مغز افزایش می‌یابد و افزایش بیان آن در قشر به احتمال زیاد مسئول افزایش CGRP در مایع مغزی نخاعی و سرم است. همچنین، سطوح استراحتی CGRP سرم و مایع مغزی نخاعی و بیان آن تحت تأثیر بلندمدت تمرین قرار نمی‌گیرند و تنها اثرهای بلندمدت تمرین بر این عوامل، به شکل پاسخ پس از سازگاری (سطوح بالاتر این متغیرها در حین تمرین در موش‌های صحرایی تمرین کرده در مقایسه با موش‌های صحرایی تمرین نکرده) مشاهده می‌شوند.

مشابه با مطالعات پیشین (۱۲، ۱۳)، غلظت CGRP مایع مغزی نخاعی در طی تمرین حاد در گروه‌های حاد و تمرینی مزمن افزایش یافت. برای تعیین منبع افزایش CGRP در مایع مغزی نخاعی، بیان CGRP در قسمت‌های مختلف مغز بررسی شد. نتایج نشان داد که تمرین تأثیر معناداری بر بیان CGRP در مغز دارد و بیان آن را در مغز افزایش می‌دهد؛ با وجود این، این اثر در پژوهش حاضر در قسمت‌های مختلف مغز یکپارچه نبود؛ زیرا، تنها در قشر تغییرات معنادار دیده شد و در دیگر مناطق مشهود نبود. دلیل خاص این ناهمگونی معلوم نیست؛ اما چندین عامل محتمل هستند: اول اینکه، به احتمال زیاد این ناهمگونی به پاسخ متفاوت قسمت‌های مختلف مغز به ورزش مربوط می‌شود (۲۰). برخی قسمت‌های مختلف مغز (مانند کورتکس، مخچه و ساقه مغز) در پاسخ به تمرین فعال‌تر هستند

و انتظار می‌رود که تغییرات ناشی از تمرین در آن‌ها بارز تر باشد؛ باوجوداین، مخچه که بخش فعال مغز در طی تمرین است، افزایشی در بیان CGRP نشان نداد و این نشان می‌دهد که ممکن است فعال شدن منطقه‌ای مغز در تمرین تنها عامل مؤثر در بیان CGRP در پاسخ به ورزش حاد نباشد. این مطلب بدین معنی است که به احتمال زیاد فعال شدن در اثر تمرین، تنها عامل اثرگذار نیست. بخشی از تفاوت‌های مشاهده شده بین قشر و مغز می‌تواند مربوط به آوران عصب سه‌شاخه^۱ - منبع اصلی انتشار CGRP در مغز (۲۱) - باشد که از قشر عبور می‌کند؛ اما از مخچه عبور نمی‌کند (۲۲). طبق مطالعات قبلی، این اعصاب مهم‌ترین عامل رهایش CGRP در مغز هستند (۲۱)؛ دوم اینکه، در پژوهش حاضر، قشر ناحیه‌ای بود که سطوح استراحتی CGRP آن در میان قسمت‌های مورد بررسی مغز پایین‌تر از همه است و ممکن است افزایش بیان CGRP در آن به دلیل جبران مقادیر کم اولیه CGRP باشد. از آنجایی که CGRP قادر به عبور از سد خون مغزی نیست (۲۳، ۲۲) و نمی‌تواند از خون شریانی به مایع مغزی نخاعی ورود کند و همچنین، با توجه به نتایج پژوهش حاضر مبنی بر نبود تغییر معنادار بیان CGRP در سایر قسمت‌های مغز، به احتمال زیاد افزایش غلظت CGRP در مایع مغزی نخاعی در حین تمرین عمدتاً ناشی از افزایش بیان این پپتید در قشر مغز است.

موازی با افزایش CGRP در مایع مغزی نخاعی، غلظت سرمی CGRP نیز در گروه‌های حاد و تمرین‌کرده حاد به‌طور قابل توجهی نسبت به گروه کنترل بالاتر بود. از آنجایی که غلظت متغیرهای خون بعد از ورزش حاد به‌ویژه بعد از تمرین بلندمدت می‌تواند تحت تأثیر تغییرات در حجم پلاسما ناشی از ورزش قرار گیرد، سطوح هموگلوبین و هماتوکریت قبل و بعد از تمامی آزمون‌ها اندازه‌گیری شدند و تغییرات حجم پلاسما در هر آزمون در محاسبات نهایی بررسی شدند؛ بنابراین، کاهش حجم پلاسما در پژوهش حاضر نمی‌تواند در افزایش سطوح سرمی CGRP در طول آزمون اثرگذار باشد؛ از این‌رو، منشأ افزایش CGRP سرم می‌تواند به CNS یا سایر منابع محیطی مانند عضله اسکلتی و غده تیروئید نسبت داده شود (۲۴). سهم مغز در افزایش سطح غلظت سرمی CGRP نمی‌تواند به‌طور کامل از پژوهش ما استخراج شود؛ با این حال، این واقعیت که افزایش غلظت سرمی CGRP تقریباً به‌طور موازی با افزایش CGRP مایع مغزی نخاعی بود (افزایش CGRP سرم به مایع مغزی نخاعی، به ترتیب ۰/۷۵ و ۰/۷۷ در گروه‌های حاد و تمرینی مزمن بود) و همبستگی معنادار یافت‌شده بین غلظت CGRP مایع مغزی نخاعی و غلظت CGRP سرم در انتهای آزمون تمرین حاد، می‌تواند این ایده را ثابت کند که این افزایش به‌طور عمده به دلیل تغییرات در مغز است. همچنین، مقادیر بالاتر CGRP سرم همراه با بیان بالاتر CGRP در قشر در گروه تمرینی حاد می‌تواند شواهد بیشتری برای این ایده فراهم آورد؛ با این وجود، نقش بافت‌های پیرامونی نظیر تیروئید (۲۴) و عضله اسکلتی (۲۶، ۲۵) که CGRP در

1. Trigeminal Afferents

آن‌ها بیان می‌شود نیز نباید نادیده گرفته شود. در واقع، CGRP در انتهای عصبی حرکتی و انتهای نورون‌های حسی در عضله اسکلتی یافت می‌شود (۲۴)؛ با این حال، بعید است که عضله اسکلتی منشأ گردش خون CGRP در طول تمرین حاد باشد؛ زیرا، غلظت بالای از پتاسیم و کلسیم برای انتشار CGRP از پایانه‌های عصبی اسکلتی مورد نیاز است (۲۵). حتی غلظت بالای از پتاسیم بدون حضور کلسیم در رهایی CGRP اثربخش نیست و چنین مقادیر بالای از پتاسیم و کلسیم نمی‌توانند توسط تمرین استقامتی ایجاد شوند. همچنین، در مورد غده تیروئید، هم محتوای CGRP آن کم است که نمی‌تواند این چنین افزایش معناداری را در سطوح در گردش CGRP ایجاد کند و هم اینکه این بافت یک بافت غیرفعال نسبت به عضله اسکلتی در حین تمرین است. افزون‌بر این، نشان داده شده است که مشارکت تیروئید در افزایش CGRP جریان خون محدود به موش‌های پیر است (۲۴) که به دلیل هیپرپلازی سلول‌های C مرتبط با سن در تیروئید موش‌های پیر اتفاق می‌افتد (۲۴). با توجه به اینکه موش‌های صحرائی استفاده شده در این پژوهش جوان بودند، در نتیجه، این بافت نیز احتمالاً نمی‌تواند منشأ افزایش CGRP جریان خون در مطالعه حاضر باشد.

CGRP هم در پژوهش حاضر و هم در پژوهش‌های پیشین، تحت تأثیر تمرین حاد بود؛ بنابراین، در پژوهش حاضر، فرضیه‌ای مبنی بر تأثیرپذیری این پپتید در سطح سرم و مایع مغزی نخاعی و مغز از اثرهای بلندمدت تمرین استقامتی مورد آزمون قرار گرفت؛ با وجود این، غلظت CGRP استراحت در مایع مغزی نخاعی و سرم و بیان آن در بخش‌های مختلف مغز، بعد از ۱۲ هفته تمرین‌های استقامتی در گروه تمرینی مزمن در مقایسه با گروه کنترل تفاوتی نداشت؛ با این حال، در مقایسه با گروه حاد، موش‌های صحرائی گروه تمرینی مزمن مقدار بیشتری برای تمامی این متغیرها در طول تمرین داشتند. طبیعی است که تفسیر این نتیجه مشکل است و علت دقیق آن از روش پژوهش حاضر قابل استخراج نیست؛ به‌ویژه با در نظر گرفتن این موضوع که هر دو گروه تمرینی با یک شدت یکسان تمرین کردند. طبیعی است که این تمرین یکسان در گروه تمرین کرده، فشار تمرینی، استرس و متابولیسم کمتری را در موش‌های صحرائی تمرین کرده اعمال می‌کند. این موضوع نشان می‌دهد که پاسخ حاد CGRP به سایر سازگاری‌های ایجاد شده، ناشی از تمرین استقامتی وابسته است که باید به‌نوعی در پژوهش‌های آینده بررسی شود. این نتایج به‌وضوح نشان می‌دهد که تغییرات (از قبیل متابولیسم یا اندوکراین) مرتبط با تمرین برای پاسخ CGRP ضروری هستند. ممکن است برخی از عوامل ترشحی ناشی از تمرین که می‌توانند به راحتی از سد خونی مغزی عبور کنند، از جمله لاکتات، باعث افزایش بیان CGRP در طی تمرین در مغز شوند. این ایده زمانی قوت می‌گیرد که در پژوهش‌های پیشین نشان داده شده باشد که تزریق اسید لاکتیک همراه با برادی کینین و کاهش pH باعث آزاد شدن CGRP از اعصاب حسی در طناب نخاعی موش می‌شود (۲۷). همچنین، افزایش برداشت مغزی لاکتات در

موش‌های صحرایی سالم تمرین کرده در مطالعات پیشین گزارش شده است که می‌تواند با ورود بیشتر خود به مغز بیان بیشتر CGRP مغزی را در این حیوانات به‌نوعی تأیید کند؛ باوجوداین، اظهارنظر قطعی در این باره مستلزم انجام پژوهش‌های بعدی است.

پیام مقاله: نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بیان CGRP در پاسخ به تمرین استقامتی در برخی از نواحی مغز افزایش می‌یابد و افزایش بیان آن در قشر، مسئول افزایش CGRP در مایع مغزی نخاعی و سرم است. همچنین، سطوح استراحتی CGRP سرم و مایع مغزی نخاعی و بیان آن، تحت تأثیر بلندمدت تمرین قرار نمی‌گیرند؛ باوجوداین، این متغیرها مشمول پاسخ پس از سازگاری می‌شوند و علل احتمالی آن باید در پژوهش‌های آینده بررسی شوند.

منابع

1. Poyner DR, Sexton PM, Marshall I, Smith DM, 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.
2. Skofitsch G, Jacobowitz DM. Quantitative distribution of calcitonin gene-related peptide in the rat central nervous system. *Peptides.* 1985;6(6):1069-73.
3. Russell FA, King R, Smillie SJ, Kodji X, Brain SD. Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2014;94(4):1099-142.
4. Brain SD, Grant AD. Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. *Physiol Rev.* 2004;84(3):903-34.
5. Zhang ZH, Fang XB, Xi GM, Li WC, Ling HY, Qu P. Calcitonin gene-related peptide enhances CREB phosphorylation and attenuates tau protein phosphorylation in rat brain during focal cerebral ischemia/reperfusion. *Biomed Pharmacother.* 2010;64(6):430-6.
6. Liu Z, Liu Q, Cai H, Xu C, Liu G, Li Z. Calcitonin gene-related peptide prevents blood-brain barrier injury and brain edema induced by focal cerebral ischemia reperfusion. *Regul Pept.* 2011;171(1-3):19-25.
7. Yang SI, Yuan Y, Jiao S, Luo QI, Yu J. Calcitonin gene-related peptide protects rats from cerebral ischemia/reperfusion injury via a mechanism of action in the MAPK pathway. *Biomed Rep.* 2016;4(6):699-703.
8. Iyengar S, Ossipov MH, Johnson KW. The role of calcitonin gene-related peptide in peripheral and central pain mechanisms including migraine. *Pain.* 2017;158(4):543-59.
9. Leighton B, Cooper GJ. Pancreatic amylin and calcitonin gene-related peptide cause resistance to insulin in skeletal muscle in vitro. *Nature.* 1988;335(6191):632-5.
10. Leighton B, Foot EA. The role of the sensory peptide calcitonin-gene-related peptide(s) in skeletal muscle carbohydrate metabolism: effects of capsaicin and resiniferatoxin. *Biochem J.* 1995;307:707-12.

11. Rossetti L, Farrace S, Choi SB, 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 Pt 1):1-10.
12. Hasbak P, Lundby C, Olsen NV, Schifter S, Kanstrup IL. Calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin release in humans: Effects of exercise and hypoxia. *Regul Pept.* 2002;108(2-3):89-95.
13. Sun XJ, Pan SS. 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. Parnow A, Gharakhanlou R, Gorginkaraji Z, Rajabi S, Eslami R, Hedayati M, et al. Effects of endurance and resistance training on calcitonin gene-related peptide and acetylcholine receptor at slow and fast twitch skeletal muscle and sciatic nerve in male Wistar rats. *Int J Pept.* 2012;2012:1-8.
15. Homonko DA, Theriault E. Downhill running preferentially increases CGRP in fast glycolytic muscle fibers. *J Appl Physiol.* 2000;89(5):1928-36.
16. Kregel KC, Allen DL, Booth FW, Fleshner MR, Henriksen EJ, Musch TI, et al. Resource book for the design of animal exercise protocols. California: American Physiological Society; 2006. p. 85.
17. Pegg CC, He C, Stroink AR, Kattner KA, Wang CX. Technique for collection of cerebrospinal fluid from the cisterna magna in rat. *J Neurosci Methods.* 2010;187(1):8-12.
18. Enoki T, Yoshida Y, Lally J, Hatta H, Bonen A. Testosterone increases lactate transport, monocarboxylate transporter (MCT) 1 and MCT4 in rat skeletal muscle. *J Physiol.* 2006;577(Pt 1):433-43.
19. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
20. 20-Thomas AG, Dennis A, Bandettini PA, Johansen-Berg H. The effects of aerobic activity on brain structure. *Front Psychol.* 2012;3:86. doi: 10.3389/fpsyg.2012.00086.
21. Hoffmann J, Wecker S, Neeb L, Dirnagl U, Reuter U. Primary trigeminal afferents are the main source for stimulus-induced CGRP release into jugular vein blood and CSF. *Cephalalgia.* 2012;32(9):659-67.
22. Barker RA, Cicchetti F. *Neuroanatomy and Neuroscience at a Glance.* 4th ed. Cambridge: John Wiley & Sons; 2012. p. 90.
23. Zechner R, Zimmermann R, Eichmann TO, Kohlwein SD, Haemmerle G, Lass A, et al. Fat signals-lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metab.* 2012;15(3):279-91.
24. Emson PC, Zaidi M. Further evidence for the origin of circulating calcitonin gene-related peptide in the rat. *J Physiol.* 1989;412:297-308.
25. Sakaguchi M, Inaishi Y, Kashihara Y, Kuno M. Release of calcitonin gene-related peptide from nerve terminals in rat skeletal muscle. *J Physiol.* 1991;434:257-70.
26. Yamada M, Ishikawa T, Yamanaka A, Fujimori A, Goto K. Local neurogenic regulation of rat hindlimb circulation: CO₂-induced release of calcitonin gene-related peptide from sensory nerves. *Br J Pharmacol.* 1997;122:710-4.
27. Wang X, Fiscus RR. Lactic acid potentiates bradykinin-and low-pH-induced release of CGRP from rat spinal cord slices. *Am J Physiol.* 1997;273:92-8.

ارجاع دهی

آوسه ملیحه، کوشکی جهرمی مریم، نعمتی جواد، اسماعیلی ماهانی سعید. تأثیر حاد و بلندمدت تمرین استقامتی بر بیان ژن CGRP در مغز، مایع مغزی- نخاعی و سرم رت‌های نر نژاد ویستار. فیزیولوژی ورزشی. بهار ۱۳۹۸؛ ۱۱(۴۱): ۱۳۷-۵۲. شناسه دیجیتال: 10.22089/spj.2017.4486.1602

Aveseh M, Koushki Jahromi M, Nemati J, Esmaeili Mahani S. Acute and Chronic Effects of Endurance Training on CGRP Gene Expression in the Brain, CSF, and Serum of Male Wistar Rats. Spring 2019; 11(41): 137-52. (In Persian). DOI: 10.22089/spj.2017.4486.1602

Acute and Chronic Effects of Endurance Training on CGRP Gene Expression in The Brain, CSF, And Serum of Male Wistar Rats

**M. Aveseh¹, M. Koushki Jahromi², J. Nemati³,
S. Esmaeili Mahani⁴**

1. Ph.D. Student of Sport Physiology, Shiraz University
2. Associate Professor of Sport Physiology, Shiraz University *
3. Assistance Professor of Sport Physiology[†], Shiraz University
4. Associate Professor of Biology, Shahid Bahonar University of Kerman

Received: 2017/07/15

Accepted: 2017/12/16

Abstract

The study aimed to investigate the acute and chronic effects of endurance training on calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the brain, cerebrospinal fluid (CSF), and serum in male Wistar rats. Frothy animals were equally divided into four groups including control, acute, trained chronic, and trained acute. The acute group performed only one endurance exercise session, trained acute performed a single exercise session following a twelve-week endurance training, and trained chronic performed twelve-week of endurance training. CSF was collected from the cisterna magna and various parts of the brain were extracted. CSF and serum concentration of CGRP and its gene expression were measured by ELISA and Real Time-PCR technique, respectively. Statistical test of One-way ANOVA was used for data analysis. Compared with control group, CGRP concentration in CSF (acute: $P=0.006$; trained acute: $P=0.008$) and serum (acute: $P=0.009$; trained acute: $P=0.007$) increased significantly. CGRP gene expression increased only in the cortex of the acute ($P = 0.007$) and trained acute ($P = 0.006$) in comparison to control group; Compared with the acute group, CGRP gene expression increased in the cortex of the trained acute group ($P = 0.018$). The chronic effect of exercise did not appear in any of research variables in trained chronic group. In conclusion, CGRP increment in CSF and serum during endurance exercise is likely due to its enhanced expression in the cortex. In addition, resting values of CSF and serum CGRP are not affected by long-term endurance exercise; however, they are subjected to exercise response to adaptation.

Keywords: Calcitonin Gene-Related Peptide, Exercise Adaptation, Brain, Cerebrospinal Fluid

* Corresponding Author

Email: koushkie53@yahoo.com