

تأثیر دویدن اجباری با شدت کم روی نوارگردان بر بیان ژن‌های PGC-1 $\alpha$ ، FNDC5 و BDNF در هیپوکامپ موش‌های صحرایی نرسید محمد علی عظیمی دخت<sup>۱</sup>، رضا قراخانلو<sup>۲\*</sup>، ناصر نقدی<sup>۳</sup>، داور خدادادی<sup>۱</sup>، علی اصغر زارع زاده مهریزی<sup>۴</sup>

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۲. استاد فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۳. استاد فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، موسسه پاستور، تهران، ایران.

۴. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.

## چکیده

**زمینه و هدف:** مطالعات پیشین نشان داده‌اند که عامل نوروتروفیک مشتق شده از مغز (BDNF) در القاء اثرات مفید فعالیت ورزشی بر مغز به ویژه هیپوکامپ، نقش بسیار حیاتی دارد. با این وجود، مسیرهای پیام‌دهی درگیر در افزایش BDNF ناشی از تمرین ورزشی اجباری در هیپوکامپ به خوبی شناخته نشده است. از این رو، هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر ۸ هفته تمرین اجباری با شدت کم روی نوارگردان بر بیان ژن گیرنده فعال کننده تکثیر پروکسی زوم گاما هم‌فعال‌ساز ۱-آلفا (PGC-1 $\alpha$ )، فیبرونکتین نوع ۳ حاوی پروتئین ۵ (FNDC5) و BDNF در هیپوکامپ موش‌های صحرایی نر بود. **روش تحقیق:** تعداد ۱۸ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به طور تصادفی به ۳ گروه کنترل (۶ سر)، شم (۶ سر) و تمرین اجباری (۶ سر) تقسیم شدند. حیوانات در گروه تمرین ورزشی به انجام ۸ هفته تمرین اجباری (۵ جلسه در هفته) با شدت پایین (سرعت ۱۵ متر بر دقیقه) بر روی نوارگردان پرداختند. ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی همه موش‌ها بیهوش شدند. سر حیوانات جدا شد و هیپوکامپ استخراج گردید و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد برای تجزیه تحلیل‌های بعدی نگهداری شد. به منظور سنجش میزان بیان ژن‌ها در هیپوکامپ از روش واکنش زنجیره پلی‌مرز زمان واقعی (Real-Time-PCR) استفاده شد. داده‌ها با روش تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی در سطح  $p < 0.05$  تجزیه و تحلیل شد. **یافته‌ها:** سطوح ژن‌های PGC-1 $\alpha$  ( $p < 0.003$ )، FNDC5 ( $p < 0.006$ ) و BDNF ( $p < 0.02$ ) در گروه تمرین اجباری نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری بالاتر بود؛ اما تفاوتی بین گروه شم و کنترل در میزان mRNA ژن‌ها مشاهده نشد ( $p > 0.05$ ). **نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد تمرین اجباری با شدت کم احتمالاً از مسیر پیام‌دهی وابسته به PGC-1 $\alpha$  منجر به افزایش بیان FNDC5 و در نتیجه، افزایش بیان BDNF می‌گردد. بنابراین، این نوع از تمرین ورزشی را می‌توان به منظور القاء اثرات مفید ورزش بر هیپوکامپ، به کار گرفت.

واژه‌های کلیدی: تمرین اجباری با شدت پایین، ژن PGC-1 $\alpha$ ، ژن FNDC5، ژن BDNF، هیپوکامپ موش صحرایی.

\* نویسنده مسئول، آدرس: تهران، بزرگراه جلال آل احمد، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم انسانی، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی؛

DOI: 10.22077/JPSBS.2017.1037.1321

ghara\_re@modares.ac.ir

## مقدمه

فیبرونکتین نوع-3 حاوی پروتئین-5 (FNDC5) و BDNF در هیپوکامپ می‌شود. علاوه بر این، این تحقیق نشان داد که یکی از مسیرهای پیام‌دهی افزایش بیان BDNF ناشی از فعالیت ورزشی اختیاری در نورون‌های هیپوکامپ، مسیر پیام‌دهی PGC-1 $\alpha$ /FNDC5 می‌باشد.

PGC-1 $\alpha$  نخستین بار به عنوان یک هم‌فعال‌ساز نسخه‌برداری بیوژنز میتوکندری و متابولیسم اکسایشی در بافت چربی قهوه‌ای شناخته شد که دارای نقش حیاتی در القاء اثرات مثبت فعالیت ورزشی بر عضلات اسکلتی است (اسپیگلمن<sup>۱</sup>، ۲۰۰۷). مطالعات بعدی نشان داد که PGC-1 $\alpha$  نقش مهمی در مغز دارد، به طوری که نبود آن در مغز، با تخریب نورون‌ها همراه است (وران و دیگران، ۲۰۱۳). علاوه بر این، FNDC5 به عنوان یک مایوکاین وابسته به PGC-1 $\alpha$  شناخته شده که در حین تمرین در عضلات فعال بیان می‌شود و بعضی اثرات مفید متابولیسم ورزش را القاء می‌کند (بوستروم<sup>۱۵</sup> و دیگران، ۲۰۱۲). FNDC5 یک پروتئین غشایی گلیکوزیله است که بعد از بیان، بلافاصله تحت فرآیند پروتئولیز قرار می‌گیرد و به صورت یک پپتید ۱۲ کیلودالتونی به نام آیریزین<sup>۱۶</sup> در جریان خون منتشر می‌شود و سبب تبدیل بافت چربی زیر جلدی زرد به قهوه‌ای می‌گردد (بوستروم و دیگران، ۲۰۱۲). FNDC5 همچنین در مغز نیز بیان می‌شود و نشان داده شده جدا کردن ژن FNDC5 در نورون‌های نابالغ، سبب توقف رشدی نورون‌ها و عدم تبدیل آن‌ها به نورون‌های بالغ می‌شود (هاشمی و دیگران، ۲۰۱۳). مطالعات نشان داده که PGC-1 $\alpha$  یک تنظیم‌کننده رونویسی از ژن FNDC5 در مغز می‌باشد. همچنین افزایش بیان ژن FNDC5 منجر به افزایش بیان ژن BDNF شده و جدا کردن ژن FNDC5 منجر به کاهش بیان ژن BDNF در نورون‌های کشت شده قشری می‌گردد (وران و دیگران، ۲۰۱۳).

مطالعات قبلی نشان داده که فعالیت ورزشی چه به صورت اختیاری<sup>۱۷</sup> (به عنوان بخشی از شیوه زندگی فرد) و چه به صورت اجباری<sup>۱۸</sup> (به عنوان بخشی از برنامه کاهش وزن یا برنامه درمانی)، می‌تواند اثرات مفید بسیاری بر مغز داشته

انجام فعالیت ورزشی منظم اثرات مفیدی بر سلامت مغز داشته و اثرات مخرب بیماری‌های عصبی مانند آلزایمر، پارکینسون و افسردگی را کاهش می‌دهد (کاتمن<sup>۱</sup> و دیگران، ۲۰۰۷). اثرات مفید فعالیت ورزشی بر مغز بیشتر در نواحی هیپوکامپ<sup>۲</sup> مشاهده می‌شود و شامل افزایش جریان خون و اندازه هیپوکامپ، تغییرات ساختاری در دندریتها و برآمدگی‌های دندریتی<sup>۳</sup>، افزایش پلاستیسیته سیناپسی و نورون‌زایی است (ماتسون<sup>۴</sup>، ۲۰۱۲). یکی از ملکول‌های مهمی که اثرات مفید فعالیت ورزشی را بر هیپوکامپ القاء می‌کند، عامل نوروتروفیک مشتق شده از مغز<sup>۵</sup> (BDNF) است (واینمن<sup>۶</sup> و دیگران، ۲۰۰۴). BDNF یکی از اعضاء خانواده نوروتروفین<sup>۷</sup> است که در سال ۱۹۸۲ از مغز خوک به عنوان عامل ارتقاء نجات سلولی برای اعصاب حسی استخراج شد. BDNF به عنوان یک عامل تروفیک بسیار قوی در عملکردهای مختلف مغزی مانند نجات سلولی، تمایز نورونی، مهاجرت نورون‌های عصبی، شاخه‌ای شدن دندریتی<sup>۸</sup> و سیناپس‌زایی نقش دارد. علاوه بر این، وجود BDNF برای پلاستیسیته سیناپسی، عملکرد هیپوکامپ و یادگیری ضروری است. BDNF در بخش‌های مختلف مغز پستانداران از قبیل هیپوکامپ، قشر مغز و مخچه بیان می‌شود و از طریق گیرنده اختصاصی تیروزین کینازی خود، یعنی trkB فعالیت‌های زیستی خود را اعمال می‌کند (رزا و فانسستوک<sup>۹</sup>، ۲۰۱۴).

مطالعات قبلی نشان داد که فعالیت ورزشی باعث افزایش میزان mRNA مربوط به BDNF در مناطق مختلف مغز به ویژه هیپوکامپ می‌شود (سویا<sup>۱۰</sup> و دیگران، ۲۰۰۷). با این وجود، سازوکارهای دقیق سلولی افزایش BDNF ناشی از فعالیت ورزشی در هیپوکامپ به خوبی شناخته نشده است. به تازگی ورن<sup>۱۱</sup> و دیگران (۲۰۱۳) نشان داده اند که ۳۰ روز فعالیت ورزشی اختیاری بر روی چرخ گردان در موش‌های نر ۶ هفته‌ای، منجر به افزایش بیان ژن‌های گیرنده فعال کننده تکثیر پروکسی زوم گاما هم‌فعال‌ساز ۱-آلفا<sup>۱۲</sup> (PGC-1 $\alpha$ ).

- Cotman
- Hippocampus
- Dendritic spines
- Mattson
- Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)
- Vaynman
- Neuro trophin (NT)

- Dendritic arborization
- Rosa & Fahnstock
- Soya
- Wrann
- Peroxisome proliferator activated receptor-gamma co-activator 1-alpha (PGC-1 $\alpha$ )
- Fibronectin type III domain containing 5 (FNDC5)

- Spiegelman
- Boström
- Irisin
- Voluntary exercise
- Forced exercise

نگهداری می‌شد که آزادانه به آب و غذای استاندارد دسترسی داشته باشند. تمامی مراحل نگهداری و کشتار موش‌ها بر اساس ضوابط کمیته اخلاقی حیوانات دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. در سرتاسر دوره تحقیق موش‌ها توسط یک نفر جابجا و دست‌کاری می‌شدند.

یک هفته قبل از شروع تمرین، همه حیوانات با محیط آزمایشگاه سازگار و با دستگاه نوارگردان (۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه، ۵ روز در هفته، به مدت یک هفته) آشنا شدند. سپس حیوانات به طور تصادفی به سه گروه: کنترل (۶ سر)، شم (۶ سر) و تمرین (۶ سر) تقسیم شدند. حیوانات در گروه کنترل در هیچ‌گونه مداخله‌ای شرکت نکردند، اما حیوانات گروه شم در تمام طول دوره تمرین از قفس‌ها خارج می‌شدند و در معرض نوارگردان روشن (بدون هیچ حرکتی) قرار می‌گرفتند تا شرایط استرس‌زای محیط را تجربه کنند.

**پروتکل تمرینی:** موش‌های صحرایی گروه تمرین بر روی نوارگردان (ساخت شرکت پیشرو اندیشه صنعت- ایران) با شیب صفر درجه در چرخه روشنایی، از ساعت ۹ الی ۱۱ صبح به مدت ۸ هفته (۵ روز در هفته با شدت و مدت مورد نظر) به تمرین پرداختند. موش‌ها در هفته اول و دوم با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه در دو جلسه جداگانه ۱۵ دقیقه‌ای با وقفه (استراحت غیرفعال) ۵ دقیقه‌ای (به منظور جلوگیری از خستگی عضلانی در موش‌ها)، بر روی نوارگردان به دویدن پرداختند. در هفته سوم و چهارم با افزایش زمان فعالیت، موش‌ها به دویدن با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه در سه جلسه جداگانه ۱۵ دقیقه‌ای با وقفه ۵ دقیقه‌ای پرداختند. در هفته پنجم و ششم موش‌ها با سرعت ۱۵ متر بر دقیقه در سه جلسه جداگانه ۱۵ دقیقه‌ای با وقفه ۵ دقیقه‌ای فعالیت کردند و در هفته‌های پایانی هفتم و هشتم با سرعت ۱۵ متر بر دقیقه در چهار جلسه جداگانه ۱۵ دقیقه‌ای با وقفه ۵ دقیقه‌ای، فعالیت اجرا شد (دائو<sup>۵</sup> و دیگران، ۲۰۱۵؛ زاگار<sup>۹</sup> و دیگران، ۲۰۱۳) (شکل ۱). موش‌های گروه تمرین اجباری در تمام جلسات تمرینی پایش شدند و با استفاده از یک شوک الکتریکی ضعیف (شدت ۰/۵ میلی آمپر) که در حیوان ایجاد

باشد (العمری<sup>۱</sup> و دیگران ۲۰۱۳). با این وجود، نتایج در این زمینه ضد و نقیض است، به طوری که بعضی مطالعات اثرات فعالیت ورزشی اختیاری و اجباری بر مغز را مشابه گزارش کرده اند. برای نمونه، کیم<sup>۲</sup> و دیگران (۲۰۱۳) نشان داده‌اند که تمرین اختیاری و اجباری اثرات مشابهی بر افزایش بیان BDNF در هیپوکامپ دارند. اما برخی دیگر تاثیر تمرینات اختیاری و اجباری بر مغز را متفاوت دانسته‌اند. مطالعات نشان داده که تمرین اختیاری و اجباری اثرات متفاوتی بر بیان پاروالومین<sup>۳</sup> (آریدا<sup>۴</sup> و دیگران، ۲۰۰۴) و همچنین بر بیان BDNF و سیناپسین-۱<sup>۵</sup> در هیپوکامپ دارند (پلگمن<sup>۶</sup> و دیگران، ۲۰۰۵). علاوه بر این لیژر و جونز<sup>۷</sup> (۲۰۰۸) نشان دادند که حتی در صورت یکسان بودن مسافت طی شده حین تمرین اختیاری و اجباری، این دو نوع تمرین اثرات متفاوتی بر هیپوکامپ دارند.

با توجه به تاثیر متفاوت تمرینات اختیاری و اجباری بر مغز و مشخص نبودن تاثیر تمرین اجباری بر مسیر پیام‌دهی PGC-1 $\alpha$ /FNDC5/BDNF؛ هدف از تحقیق حاضر بررسی تاثیر ۸ هفته تمرین اجباری با شدت کم روی نوارگردان بر بیان ژن‌های PGC-1 $\alpha$ ، FNDC5 و BDNF در هیپوکامپ موش‌های صحرایی نر بود. نتایج این مطالعه می‌تواند ما را در فهم بهتر سازوکارهای سلولی درگیر در افزایش BDNF ناشی از فعالیت ورزشی اجباری در هیپوکامپ، کمک کند.

### روش تحقیق

با توجه به اطلاعات مطالعات قبلی (سویا و دیگران، ۲۰۰۷) تعداد نمونه‌های ما در این تحقیق، ۱۸ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با سن ۸ هفته و دامنه وزنی  $190 \pm 10$  گرم در نظر گرفته شد که از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. موش‌ها در آزمایشگاه حیوانات دانشگاه تربیت مدرس در اتاقی به ابعاد ۱/۶۰ در ۲/۲۰ متر در شرایط کنترل شده از نظر نور (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، شروع روشنایی ۶ صبح و شروع خاموشی ۶ عصر)، دما ( $22 \pm 3$  سانتی‌گراد)، و رطوبت (حدود ۴۵ درصد) نگهداری شدند. تعداد سه سر موش در قفس‌هایی از جنس پلکسی گلاس با درب توری و به ابعاد ۲۵ در ۲۷ در ۴۳ سانتی متر به گونه‌ای

1. Alomari

2. Kim

3. Parvalbumin

4. Arida

5. Synapsin-1

6. Ploughman

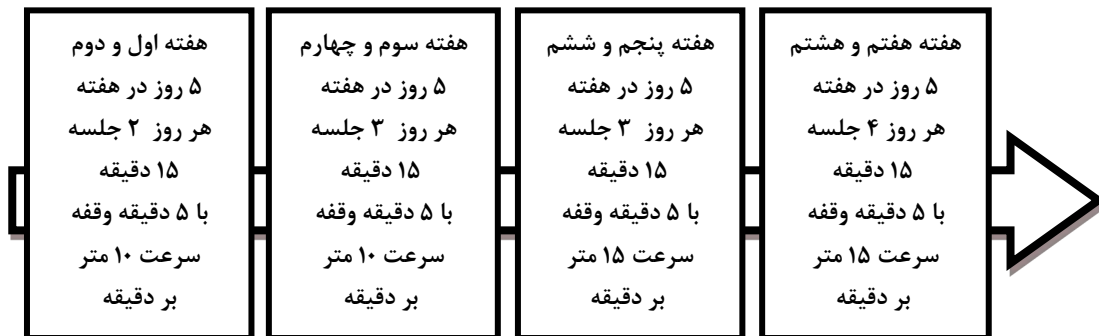
7. Leasure &amp; Jones

8. Dao

9. Zagaar

جدا و مغز کامل خارج شد. سپس، با احتیاط هیپوکامپ از بقیه بافت مغز جدا و در نیتروژن  $-80^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد منجمد و برای تجزیه و تحلیل بعدی به یخچال  $-80^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد منتقل شد.

استرس زیادی نمی‌کرد و یا دستکاری با یک اسفنج، تشویق به ادامه دویدن شدند (دائو و دیگران، ۲۰۱۵). ۲۴ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی، موش‌ها بوسیله تزریق درون صفاقی کتامین (۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) بیهوش شدند. سر حیوان توسط دستگاه گیوتین



شکل ۱. جزئیات پروتکل تمرین اجباری

باند‌های RNA های ریبوزومی ۱۸S و ۲۸S به طور تفکیک، صحت تخلیص را تأیید کرد. سنتز cDNA مطابق با دستورالعمل کیت high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems) انجام شد. تمام مراحل انجام کار روی یخ، زیر هود و با استفاده از وسایل RNase free صورت گرفت.

**واکنش زنجیره پلی‌مراز زمان واقعی (Real time-PCR):** اندازه‌گیری بیان ژن با روش کمی Real time-PCR و با به کارگیری RealQ Plus 2x Master Mix Green شرکت AMPLIQON و با استفاده از غلظت ۲۵۰ نانوگرم از cDNA و به صورت duplicate انجام گرفت. طراحی پرایمرها بر اساس اطلاعات ژن‌های BDNF، PGC-1α، FNDC5 و GAPDH در بانک ژنی NBCI و توسط شرکت پیشگام، ایران انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ گزارش شده است. برنامه دمایی Real time-PCR شامل واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ دقیقه، واسرشت در هر سیکل PCR در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و با توجه به دمای انلینگ پرایمرها هر سیکل به مدت ۳۰ ثانیه (۴۰ سیکل) در نظر گرفته شد. از GAPDH به عنوان ژن کنترل استفاده گردید و میزان بیان ژن‌های مورد نظر با فرمول  $2^{-\Delta\Delta CT}$  اندازه‌گیری شد (لیواک و اسمیتگن، ۲۰۰۱).

**استخراج RNA و سنتز cDNA:** حدود ۵۰ میلی‌گرم بافت هیپوکامپ جهت استخراج total RNA در ۱ میلی‌لیتر TRIzol Lysis reagent هموزن گردید. به منظور برداشتن اجزاء پروتئینی، محصول حاصل در ۴ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ دقیقه، با  $12000 \times \text{g}$  سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت<sup>۱</sup> برداشته و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق (۲۵-۱۵ درجه سانتی‌گراد) نگه داری شد. سپس با نسبت ۱ به ۰/۵ با کلروفرم مخلوط و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. محصول به مدت ۳-۲ دقیقه در دمای اتاق نگه داری شد و سپس در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۱۵ دقیقه، با  $12000 \times \text{g}$  سانتریفیوژ گردید و بخش معدنی و آبی از هم جدا شدند، بخش محتوی RNA برداشته و با نسبت ۱ به ۰/۵ با ایزوپروپانول<sup>۲</sup> مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق رها و سپس در ۴ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۱۰ دقیقه، با  $12000 \times \text{g}$  سانتریفیوژ گردید. پلت حاوی RNA در اتانول شست و شو و در ۲۰ میکرولیتر آب RNase-Free حل گردید. تمام مراحل استخراج زیر هود و با مواد و وسایل کاملاً استریل انجام گرفت. غلظت RNA با استفاده از دستگاه نانو دراپ سنجیده و نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸-۲/۱ به عنوان تخلیص مطلوب، تعریف گردید. جهت اطمینان بیشتر از صحت تخلیص RNA، تعدادی از RNA های تخلیص شده به طور تصادفی روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد و مشاهده

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در روش Real time-PCR در مطالعه حاضر

Gene name	Primer Sequence (5' 3')
PGC-1 $\alpha$	Forward - TCAGCGGTCTTAGCACCTA
	Reverse - TCTCTGTGGGTTTGGTGTGA
FNDC5	Forward - AGAGAGCAAGCACCAAGACT
	Reverse - GATGGAGTCGGAACCCCTGAA
BDNF	Forward - TGCAGGGGATAGACAAAAGG
	Reverse - CTTATGAATCGCCAGCCAATTCTC
GAPDH	Forward - AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG
	Reverse - CATACTCAGCACCAGCATCACC

روش‌های آماری: در نرم افزار SPSS (ویرایش ۲۲)، پس از اطمینان از طبیعی بودن توزیع داده‌ها با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف<sup>۱</sup> و همگن بودن واریانس‌ها با آزمون لون<sup>۲</sup>؛ از آزمون تحلیل روش واریانس یک‌طرفه (ANOVA) برای مقایسه بین‌گروهی داده‌ها و در صورت وجود اختلاف معنی‌دار، از آزمون تعقیبی توکی<sup>۳</sup> برای مقایسه‌های زوجی در سطح معنی‌داری  $p < 0.05$  استفاده شد. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد (S.E.M) بیان شده‌اند.

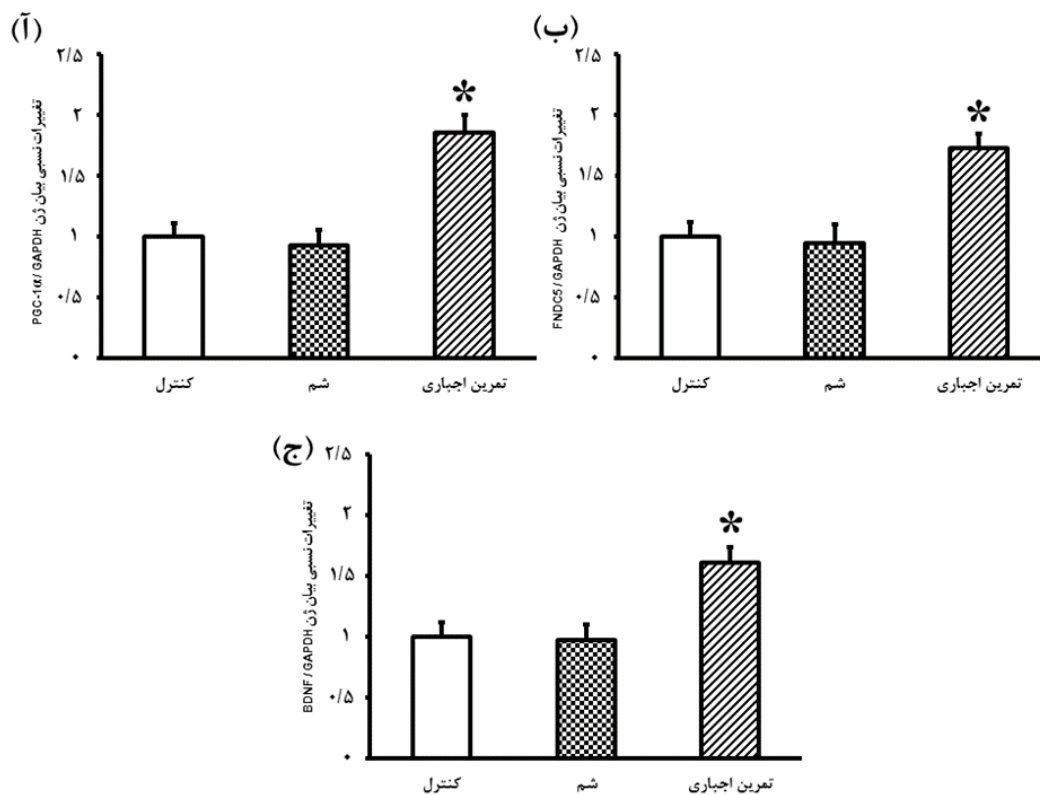
**یافته‌ها**

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که به دنبال ۸ هفته تمرین اجباری، وزن موش‌ها در گروه تمرین ۱۰ درصد کمتر از گروه کنترل بود (از  $190 \pm 8$  گرم به  $310 \pm 10$  در گروه تمرین در مقابل  $193 \pm 12$  گرم به  $335 \pm 8$  در گروه کنترل). مقایسه بین‌گروهی، آزمون ANOVA نشان داد که بین میانگین سطوح بیان ژن‌های PGC-1 $\alpha$  ( $p < 0.0001$ )، FNDC5 و BDNF نسبت به GAPDH در گروه‌های مختلف (خطای استاندارد  $\pm$  میانگین) تفاوت معنی‌داری وجود دارد. نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد که میزان mRNA مربوط به PGC-1 $\alpha$  در گروه تمرین اجباری به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل است ( $p < 0.003$ )؛ اما بین گروه شم و کنترل تفاوت معنی‌داری دیده نشد (شکل ۲-آ). میزان mRNA مربوط به FNDC5 در شاخص در گروه تمرین اجباری به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل است ( $p < 0.006$ )؛ در حالی‌که بین گروه شم و کنترل تفاوت معنی‌داری دیده نشد (شکل ۲-ب). همچنین تجزیه تحلیل آماری نشان داد که میزان mRNA مربوط به BDNF در گروه تمرین اجباری به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل می‌باشد ( $p < 0.02$ )؛ اما بین گروه شم و کنترل تفاوت معنی‌داری دیده نشد (شکل ۲-ج).

جدول ۲. تغییرات بیان ژن‌های PGC-1 $\alpha$ ، FNDC5 و BDNF نسبت به GAPDH در گروه‌های مختلف (خطای استاندارد  $\pm$  میانگین)

گروه‌ها	کنترل	شم	تمرین اجباری
تغییرات نسبی PGC-1 $\alpha$ /GAPDH (واحد قراردادی)	$1 \pm 0.10$	$0.92 \pm 0.12$	$1.85 \pm 0.14^*$
تغییرات نسبی FNDC5/GAPDH (واحد قراردادی)	$1 \pm 0.11$	$0.94 \pm 0.14$	$1.72 \pm 0.12^*$
تغییرات نسبی BDNF/GAPDH (واحد قراردادی)	$1 \pm 0.11$	$0.96 \pm 0.12$	$1.60 \pm 0.13^*$

\* تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل در سطح  $p < 0.05$ .



شکل ۲. تغییرات بیان ژن‌های PGC-1 $\alpha$ ، FNDC5، BDNF و نسبت به GAPDH در هیپوکامپ موش‌های صحرایی نر  
\* تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل در سطح  $p < 0.05$ .

بر نواحی مختلف مغز القاء می‌کند (شیخ زاده و دیگران، ۲۰۱۵). یکی از این نواحی مغزی هیپوکامپ است که نقش مهمی در تشکیل حافظه و یادگیری دارد و مطالعات نشان داده که فعالیت ورزشی از طریق افزایش BDNF، سبب بهبود عملکرد و ساختار هیپوکامپ می‌شود (وایمن و دیگران، ۲۰۰۴). بیشتر مطالعات تأثیر فعالیت ورزشی اختیاری (به دلیل نبود شرایط استرس) را بر بیان BDNF مورد سنجش قرار داده‌اند. به طوری که وران و دیگران (۲۰۱۳) نشان دادند که ۳۰ روز فعالیت ورزشی اختیاری بر روی چرخ گردان در موش‌های نر ۶ هفته‌ای، منجر به افزایش بیان ژن BDNF در هیپوکامپ می‌شود. در مطالعه‌ای دیگر، رت‌هایی که دسترسی آزاد به چرخ گردان به مدت یک تا ۶ هفته داشتند، افزایش

#### بحث

یافته‌های تحقیق حاضر نشان داد که به دنبال ۸ هفته تمرین اجباری با شدت کم، سطوح mRNA ژن‌های PGC-1 $\alpha$ ، FNDC5 و BDNF به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش می‌یابد. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که انجام فعالیت ورزشی منظم در پیشگیری از ابتلا به آلزایمر و اختلال حافظه موثرند (بوچمن<sup>۱</sup> و دیگران، ۲۰۱۲). فعالیت ورزشی به واسطه افزایش پروتئین‌های مرتبط با کارایی سیناپسی، نقش مهمی در محافظت از مغز دارد و از مسیرهای مختلفی از جمله افزایش اکسیژن مصرفی مغز، افزایش انتقال‌دهنده‌های مغزی و همچنین تنظیم افزایشی BDNF در مغز؛ اثرات مفیدش را

افزایش بیان PGC-1 $\alpha$  و FNDC5 در هیپوکامپ همراه است. مطالعات قبلی دال بر آن است که فعالیت ورزشی استقامتی با افزایش بیان PGC-1 $\alpha$  منجر به تحریک بیوژنز میتوکندریایی در عضلات اسکلتی (فینک و کلی<sup>۱</sup>، ۲۰۰۶) و نواحی مختلف مغزی می‌شود (استینر<sup>۲</sup> و دیگران، ۲۰۱۱). علاوه بر این، FNDC5 به عنوان یک تنظیم کننده مثبت بیان BDNF در هیپوکامپ شناخته شده که بیان آن توسط PGC-1 $\alpha$  تنظیم می‌شود، به طوری که در موش‌هایی که ژن PGC-1 $\alpha$  آن‌ها ناک اوت شده بود، بیان ژن FNDC5 در مغز کاهش پیدا کرد (وران، ۲۰۱۵). از طرفی، افزایش بیان PGC-1 $\alpha$  به عواملی چون میزان کلسیم درون سلولی و نیاز به تولید ATP میتوکندریایی وابسته است و در شرایط متفاوت فیزیولوژیکی مانند ورزش این دو عامل در عضلات اسکلتی افزایش می‌یابند (استینر و دیگران، ۲۰۱۱). علاوه بر این، مشخص شده که فعالیت ورزشی تحریک نوروهای گلوتاماترژیک<sup>۱۰</sup> هیپوکامپ شده و میزان کلسیم درون سلولی را در این نوروها افزایش می‌دهد و فعال شدن مسیرهای پیام دهی مرتبط با افزایش پلاستیسیته سیناپسی را در پی دارد (ماتسون، ۲۰۱۲). به نظر می‌رسد فعالیت ورزشی اجباری نیز با افزایش عملکرد و فعالیت نوروهای هیپوکامپ، منجر به افزایش کلسیم درون سلولی در این نوروها شده و در نتیجه، افزایش بیان PGC-1 $\alpha$  و به دنبال آن، افزایش بیان FNDC5 و نهایتاً افزایش بیان BDNF را موجب می‌شود. با این وجود، سوالی که هنوز بدون پاسخ مانده این است که فعالیت ورزشی دقیقاً با چه سازوکاری و با تحریک چه عناصری موجب افزایش بیان PGC-1 $\alpha$  در هیپوکامپ می‌شود؟ نقش عوامل متابولیکی چون پروتئین متصل شونده به عنصر پاسخ به cAMP<sup>۱۱</sup> (CREB) و پروتئین کیناز فعال شده توسط آدنوزین مونوفسفات<sup>۱۲</sup> (AMPK) به عنوان تنظیم کننده‌های اصلی بیان PGC-1 $\alpha$  (یو و یانگ<sup>۱۳</sup>، ۲۰۱۰؛ فرشاف و دیگران، ۲۰۱۶) در افزایش بیان PGC-1 $\alpha$  توسط فعالیت ورزشی در هیپوکامپ بسیار محتمل است و

قابل ملاحظه‌ای را در mRNA و پروتئین BDNF هیپوکامپ نشان داده‌اند (مورای و هولمز<sup>۱</sup>، ۲۰۱۱). افزایش قابل توجه mRNA مربوط به BDNF در هیپوکامپ پس از دو هفته (چن<sup>۲</sup> و دیگران، ۲۰۰۵)، سه هفته (وان<sup>۳</sup> و دیگران، ۲۰۰۳)، چهار هفته (فارمر<sup>۴</sup> و دیگران، ۲۰۰۴) و دو ماه (مولتنی<sup>۵</sup> و دیگران، ۲۰۰۴) دوییدن اختیاری گزارش شده است.

با این که استفاده از فعالیت ورزشی اجباری به دلیل قابل کنترل بودن پارامترهای تمرین (مانند شدت، مدت و تعداد جلسات تمرین)، هنوز هم مورد توجه است (انگ و گومز پنیل<sup>۶</sup>، ۲۰۰۷)، مطالعات نشان داده اند که فعالیت ورزشی اجباری به دلیل فعال کردن سیستم استرس و افزایش هورمون‌های استرسی (مانند کورتیکواسترون)، از افزایش بیان BDNF در هیپوکامپ جلوگیری می‌کند (یانگیتا<sup>۷</sup> و دیگران، ۲۰۰۷). با این وجود، سویا و دیگران (۲۰۰۷) نشان داده‌اند که فعالیت‌های ورزشی اجباری با شدت کم (سرعت ۱۵ متر بر دقیقه)، تأثیری بر سطوح در گردش کورتیکواسترون ندارند، اما می‌تواند منجر به افزایش BDNF mRNA در مغز گردند. همسو با این مطالعات، نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که ۸ هفته تمرین اجباری (با شدت کم) سبب افزایش بیان BDNF در هیپوکامپ موش‌های صحرایی می‌گردد.

اگر چه مطالعات بسیاری نشان داده اند که فعالیت ورزشی از طریق افزایش BDNF اثرات مثبت خود را بر هیپوکامپ القاء می‌کند (وایمن و دیگران، ۲۰۰۴)؛ با این وجود مکانیزم دقیق افزایش BDNF ناشی از فعالیت ورزشی به خوبی شناخته نشده است. یافته‌های اخیر حاکی از آن است که فعالیت ورزشی اختیاری از طریق مسیر پیام دهی وابسته به PGC-1 $\alpha$  منجر به افزایش بیان FNDC5 و در نتیجه، افزایش بیان BDNF در نوروهای هیپوکامپ می‌شود (وران و دیگران، ۲۰۱۳). مطابق با این یافته‌ها، نتایج مطالعه ما نشان داد که افزایش بیان BDNF ناشی از تمرین اجباری با شدت کم نیز با

1. Murray & Holmes  
2. Chen  
3. Van  
4. Farmer  
5. Molteni  
6. Ang & Gomez-Pinilla

7. Yanagita  
8. Fink & Kelly  
9. Steiner  
10. Glutamatergic neurons  
11. cAMP response-element-binding protein (CREB)  
12. Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)

13. Yu & yang

نوع از تمرین ورزشی را به منظور القاء اثرات مفید ورزش بر هیپوکامپ به کار گرفت.

#### قدردانی و تشکر

از دانشگاه تربیت مدرس تهران به خاطر حمایت مالی این تحقیق و از بخش فیزیولوژی و فاماکولوژی موسسه پاستور، به دلیل همکاری در اجر؛ کمال تشکر و قدردانی را داریم.

پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده تأثیر تمرین اجباری بر بیان این ژن‌ها نیز مورد بررسی قرار گیرد.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به افزایش بیان ژن‌های PGC-1 $\alpha$ ، FNDC5 و BDNF به دنبال تمرین اجباری با شدت کم روی نوارگردان در هیپوکامپ موش‌های صحرایی، به نظر می‌رسد تمرین اجباری با شدت کم، همانند تمرین اختیاری از مسیر پیام‌دهی وابسته به PGC-1 $\alpha$  منجر به تنظیم بیان FNDC5 و در نتیجه افزایش بیان BDNF می‌گردد. بنابراین، می‌توان این

#### منابع

Alomari, M. A., Khabour, O. F., Alzoubi, K. H., & Alzubi, M. A. (2013). Forced and voluntary exercises equally improve spatial learning and memory and hippocampal BDNF levels. *Behavioural Brain Research*, 247, 34-39.

Ang, E., & Gomez-Pinilla, F. (2007). Potential therapeutic effects of exercise to the brain. *Current Medicinal Chemistry*, 14(24), 2564-2571.

Arida, R. M., Scorza, C. A., da Silva, A. V., Scorza, F. A., & Cavalheiro, E. A. (2004). Differential effects of spontaneous versus forced exercise in rats on the staining of parvalbumin-positive neurons in the hippocampal formation. *Neuroscience Letters*, 364(3), 135-138.

Boström, P., Wu, J., Jedrychowski, M. P., Korde, A., Ye, L., Lo, J. C., ... & Kajimura, S. (2012). A PGC-1 $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*, 481(7382), 463.

Buchman, A., Boyle, P., Yu, L., Shah, R., Wilson, R., & Bennett, D. (2012). Total daily physical activity and the risk of AD and cognitive decline in older adults. *Neurology*, 78(17), 1323-1329.

Chen, M. J., & Russo-Neustadt, A. A. (2005). Exercise activates the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Molecular Brain Research*, 135(1), 181-193.

Cotman, C. W., Berchtold, N. C., & Christie, L. A. (2007). Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends in Neurosciences*, 30(9), 464-472.

Dao, A. T., Zagaar, M. A., & Alkadhi, K. A. (2015). Moderate treadmill exercise protects synaptic plasticity of the dentate gyrus and related signaling cascade in a rat model of Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology*, 52(3), 1067-1076.

Farmer, J., Zhao, X., Van Praag, H., Wodtke, K., Gage, F., & Christie, B. (2004). Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male Sprague-Dawley rats in vivo. *Neuroscience*, 124(1), 71-79.

Farshbaf, M. J., Ghaedi, K., Megraw, T. L., Curtiss, J., Faradonbeh, M. S., Vaziri, P., & Nasr-Esfahani, M. H. (2016). Does PGC1 $\alpha$ /FNDC5/BDNF elicit the beneficial effects of exercise on neurodegenerative disorders?. *Neuromolecular Medicine*, 18(1), 1-15.

Finck, B. N., & Kelly, D. P. (2006). PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(3), 615-622.



- Hashemi, M. S., Ghaedi, K., Salamian, A., Karbalaie, K., Emadi-Baygi, M., Tanhaei, S., ... & Baharvand, H. (2013). Fndc5 knockdown significantly decreased neural differentiation rate of mouse embryonic stem cells. *Neuroscience*, 231, 296-304.
- Kim, S. E., Ko, I. G., Shin, M. S., Kim, C. J., Jin, B. K., Hong, H. P., & Jee, Y. S. (2013). Treadmill exercise and wheel exercise enhance expressions of neurotrophic factors in the hippocampus of lipopolysaccharide-injected rats. *Neuroscience Letters*, 538, 54-59.
- Leasure, J. L., & Jones, M. (2008). Forced and voluntary exercise differentially affect brain and behavior. *Neuroscience*, 156(3), 456-465.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Mattson, M. P. (2012). Energy intake and exercise as determinants of brain health and vulnerability to injury and disease. *Cell Metabolism*, 16(6), 706-722.
- Molteni, R., Wu, A., Vaynman, S., Ying, Z., Barnard, R. J., & Gomez-Pinilla, F. (2004). Exercise reverses the harmful effects of consumption of a high-fat diet on synaptic and behavioral plasticity associated to the action of brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience*, 123(2), 429-440.
- Murray, P. S., & Holmes, P. V. (2011). An overview of brain-derived neurotrophic factor and implications for excitotoxic vulnerability in the hippocampus. *International Journal of Peptides*, 146(7), 347-356.
- Ploughman, M., Granter-Button, S., Chernenko, G., Tucker, B. A., Mearow, K. M., & Corbett, D. (2005). Endurance exercise regimens induce differential effects on brain-derived neurotrophic factor, synapsin-I and insulin-like growth factor I after focal ischemia. *Neuroscience*, 136(4), 991-1001.
- Rosa, E., & Fahnstock, M. (2014). *Amyloid-Beta, BDNF, and the mechanism of neurodegeneration in alzheimer's disease*. In: Kostrzewa R. (eds) *Handbook of Neurotoxicity*. Springer, New York, NY.
- Sheikhzadeh, F., Etemad, A., Khoshghadam, S., Asl, N. A., & Zare, P. (2015). Hippocampal BDNF content in response to short-and long-term exercise. *Neurological Sciences*, 36(7), 1163-1166.
- Soya, H., Nakamura, T., Deocaris, C. C., Kimpara, A., Imura, M., Fujikawa, T., ... & Nishijima, T. (2007). BDNF induction with mild exercise in the rat hippocampus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358(4), 961-967.
- Spiegelman, B. M. (2007). Transcriptional control of mitochondrial energy metabolism through the PGC1 coactivators. In *Novartis Foundation Symposium 287*, 60. Chichester; New York; John Wiley; 1999.
- Steiner, J. L., Murphy, E. A., McClellan, J. L., Carmichael, M. D., & Davis, J. M. (2011). Exercise training increases mitochondrial biogenesis in the brain. *Journal of Applied Physiology*, 111(4), 1066-1071.
- Vaynman, S., Ying, Z., & Gomez-Pinilla, F. (2004). Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *European Journal of Neuroscience*, 20(10), 2580-2590.

Wrann, C. D. (2015). FNDC5/Irisin—their role in the nervous system and as a mediator for beneficial effects of exercise on the brain. *Brain Plasticity*, 1(1), 55-61.

Wrann, C. D., White, J. P., Salogiannis, J., Laznik-Bogoslavski, D., Wu, J., Ma, D., ... & Spiegelman, B. M. (2013). Exercise induces hippocampal BDNF through a PGC-1 $\alpha$ /FNDC5 pathway. *Cell Metabolism*, 18(5), 649-659.

Yanagita, S., Amemiya, S., Suzuki, S., & Kita, I. (2007). Effects of spontaneous and forced running on activation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons in rats. *Life Sciences*, 80(4), 356-363.

Yu, L., & Yang, S. J. (2010). AMP-activated protein kinase mediates activity-dependent regulation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  and nuclear respiratory factor 1 expression in rat visual cortical neurons. *Neuroscience*, 169(1), 23-38.

Zagaar, M., Dao, A., Levine, A., Alhaider, I., & Alkadhi, K. (2013). Regular exercise prevents sleep deprivation associated impairment of long-term memory and synaptic plasticity in the CA1 area of the hippocampus. *Sleep*, 36(5), 751-761.

## Abstract

**The effect of the forced treadmill running on genes expression of the PGC-1 $\alpha$ , FNDC5 and BDNF in hippocampus of male rats****Seyyed Mohammad Ali Azimi Dokht<sup>1</sup>, Reza Gharakhanlou<sup>2\*</sup>, Nasser Naghdi<sup>3</sup>, Davar Khodadadi<sup>1</sup>, Ali Asghar Zarezade Mehrizi<sup>4</sup>**

1. PhD Student of Exercise Physiology, Department of Physical Education and Sport Sciences, Faculty of Humanities, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
2. Full Professor, Department of Physical Education and Sport Sciences, Faculty of Humanities, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
3. Full Professor, Department of Physiology and Pharmacology, Pasteur Institute, Tehran, Iran.
4. PhD Student of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.

**Background and Aim:** Previous studies have shown that brain-derived neurotrophic factor (BDNF) plays a vital role to induce the beneficial effects of exercise on the brain, especially the hippocampus. However, signaling pathways related to increasing BDNF induced by forced exercise in hippocampus not well known. Therefore, the purpose of current study was to investigate the effect of 8-week of low-intensity forced treadmill training on genes expression of peroxisome proliferator activated receptor-gamma co-activator 1-alpha (PGC-1 $\alpha$ ), fibronectin type III domain containing 5 (FNDC5) and BDNF in hippocampus of male rats. **Materials and Methods:** Eighteen male Wistar rats were randomly divided into 3 groups including control (n=6), sham (n=6) and forced training (n=6). Animals in the training group performed 8 weeks of forced training (5 sessions per week) with low-intensity (speed: 15 m/min) on the treadmill. Twenty-four hours after last session of exercise, rats were decapitated and the hippocampus were carefully removed and rapidly frozen in liquid nitrogen, and finally stored at -80°C for further analysis. Real-Time-PCR method was used to measure the expression of genes in the hippocampus. Data were analyzed by one way ANOVA and Tukey post hoc test at the significant level of  $p < 0.05$ . **Results:** The results showed that mRNA levels of PGC-1 $\alpha$  ( $p < 0.003$ ), FNDC5 ( $p < 0.006$ ) and BDNF ( $p < 0.02$ ) in the forced training group were significantly higher than the control group. However, there was no significant difference in the mRNA levels of genes between the sham and control groups ( $p > 0.05$ ). **Conclusion:** It seems that the low-intensity forced training, likely through a PGC-1 $\alpha$ -dependent signaling pathway, leads to increasing expression of FNDC5 and as a result causes increasing the expression of BDNF. Thus, this type of exercise training can be used as induction of beneficial effects of exercise on the hippocampus.

**Keywords:** Low-intensity forced training, Gene PGC-1 $\alpha$ , Gene FNDC5, Gene BDNF, Rat hippocampus.

*Journal of Practical Studies of Biosciences in Sport, vol. 7, no. 14, Fall & Winter 2019/2020*

*Received: Oct 9, 2017*

*Accepted: Dec 5, 2017*

\*Corresponding Author, Address: Department of Physical Education and Sport Sciences, Faculty of Humanities, Tarbiat Modares University, Jallale Ale Ahmad, Tehran, Iran;

Email: ghara\_re@modares.ac.ir

DOI: 10.22077/JPSBS.2017.1037.1321