Archive of SID

مجله‌ی غدد درون‌ریز و متابولیسم ایران
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی شهید بهشتی
دوره‌ی سیزدهم، شماره‌ی ۲، صفحه‌های ۲۰۸ ـ ۲۰۲ (تیر ۱۳۹۰)

مقاله‌ی پژوهشی

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

دکتر عباس قنبری نیاکی[۱]، فاطمه حسین‌پور[۱]، دکتر رزیتا فتحی[۱]، دکتر مریم السادات دانشپور[۲]، دکتر هاله اخوان نیاکی[۳]، مریم زرکش[۲]، دکتر مهدی هدایتی[۲]

۱) دانشکده‌ی تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، ۲) مرکز تحقیقات پیشگیری و درمان چاقی، پژوهشکده‌ی علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، ۳) دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، **نشانی مکاتبه‌ی نویسنده‌ی مسئول:** تهران، اوین، مرکز تحقیقات پیشگیری و درمان چاقی، پژوهشکده‌ی علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، صندوق پستی: ۴۷۶۳-۱۹۳۹۵، دکتر مهدی هدایتی، e-mail:hedayati@endocrine.ac.ir

چکیده

مقدمه: نسفاتین-۱ پروتئین ضد اشتهای جدیدی است که از ژن نوکلئوبایندین-۲ مشتق، در بافت چربی بیان و در پلاسما ظاهر می‌گردد. هدف پژوهش حاضر بررسی اثر ۸ هفته تمرین استقامتی بر بیان ژن نسفاتین و غلظت آن در کبد موش‌های صحرایی نر بود. مواد و روش‌ها: ۱۱ سر موش صحرایی نر به‌طور تصادفی به ۲ گروه تمرین و کنترل تقسیم شدند. گروه تمرین با شدت ۲۰ متر در دقیقه (معادل ۵۵-۵۰٪ vo2 max)، به مدت ۶۰ دقیقه، ۵ روز در هفته و در مجموع ۸ هفته روی نوار گردان تمرین کردند. حیوانات، ۷۲ ساعت پس از آخرین جلسه‌ی تمرین بیهوش، و تکه‌ای از کبد آن‌ها برای تعیین بیان ژن، غلظت نسفاتین-۱ و گلیکوژن به روش‌های RT-PCR، الایزا و رنگ سنجی برداشته شد. یافته‌ها: این پژوهش نشان داد، تمرین استقامتی موجب افزایش بیان و غلظت نسفاتین-۱ شد، اگرچه این تغییر نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نبود. غلظت گلیکوژن استراحتی کبد نیز در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری افزایش یافت. نتیجه‌گیری: یافته‌های این پژوهش برای نخستین بار نشان داد که نسفاتین-۱، اول در کبد بیان می‌شود و دوم در پاسخ به تمرین استقامتی افزایش می‌یابد. تغییرات غیرمعنی‌دار نسفاتین-۱ به احتمال زیاد از نقش آن در تنظیم انرژی حکایت دارد. به نظر می‌رسد بهبود نسبی شرایط انرژی کبد بر افزایش بیان ژن نسفاتین اثرگذار باشد. این در حالی است که ATP به عنوان نمایانگر شارژ انرژی کبد در گروه تمرین، پایین‌تر از گروه کنترل بود.

واژگان کلیدی: نسفاتین-۱، Nucb2، پروتئین ضد اشتها، بیان ژن، موش‌های صحرایی نر
دریافت مقاله: ۸۹/۱۰/۶ ـ دریافت اصلاحیه: ۸۹/۱۱/۱۸ ـ پذیرش مقاله: ۸۹/۱۱/۱۹

مقدمه

مواردی مانند تعادل بیرونی و درونی انرژی[i]، تنظیم وزن، رفتار دریافت غذا و هزینه کرد انرژی[ii] همواره مهم و مورد علاقه‌ی پژوهشگران در حوزه‌ی فیزیولوژی ورزش، فارماکولوژی، پاتولوژی و بهداشت بوده است. معادله‌ی انرژی را می توان پایه‌ی این موضوع دانست که بر اساس آن همواره باید تعادلی بین دریافت و هزینه کرد انرژی وجود داشته باشد، تا وزن طی یک دوره‌ی زمانی نسبت طولانی، بدون تغییر باقی بماند. در غیر این صورت این موازنه به هم خورده، اضافه یا کاهش وزن رخ می‌دهد.[۱،۲]

i - Energy homostasis
ii - Energy expenditure

www.SID.ir

Archive of SID

مولکول‌های زیادی در تنظیم رفتار تغذیه‌ای نقش دارند که این مولکول‌ها و گیرنده‌های آن‌ها در محور بافت چربی- مغز واقع هستند.[۳] مولکول‌های موجود در این محور در تنظیم اشتها نقش عمده‌ای را ایفا می‌کنند. نسفاتین-۱ یکی از این پروتئین‌های ضد اشتها می‌باشد که در سال ۲۰۰۶ توسط اُه و همکاران کشف گردید.[۴] این پروتئین از نوکلئوبایندین-۲ (NUCB2)[i] مشتق شده و در سلول‌های کنترل کننده‌ی اشتهای موش‌های صحرایی بیان گردیده است.[۴،۵] نوکلئوبایندین‌ها، پروتئین‌هایی با عملکردهای متعدد هستند که از گروه EF-hand ها بوده و با کلسیم، اسیدهای نوکلئیک و چندین پروتئین تنظیمی، در مسیرهای پیام‌رسانی متفاوت، برهم کنش دارند.[۴] نسفاتین/نوکلئوبایندین-۲ ترکیبی از یک پایانه‌ی پیام رسانی ۲۴ اسید آمینه‌ای و ساختار پروتئینی دارای ۳۹۶ اسید آمینه است.[۶] اُه و همکاران،[۴] بخش‌های مشتق شده از NUCB2 را به‌صورت زیر تفکیک کردند: نسفاتین-۱، از شماره ۸۲-۱؛ نسفاتین-۲، از شماره ۱۶۳-۸۵؛ و نسفاتین-۳، از شماره ۳۹۶-۱۶۶. در این میان تنها نسفاتین-۱ موجب مهار دریافت غذای شبانه و جلوگیری از افزایش وزن در موش‌های صحرایی می‌شود.[۲،۷]

نسفاتین-۱ در نورون‌های ناحیه‌های مختلفی از هیپوتالاموس مانند هسته‌ی جانبی بطنی[ii](PVN)، هسته‌ی کمانی، هسته‌ی فوق بینایی[iii](SON)، ناحیه‌ی جانبی هیپوتالاموس و ساقه مغز که در تنظیم متابولیک و رفتار تغذیه درگیرند ، بیان می‌شود.[۴،۸،۹] با توجه به توزیع آن در CNS[iv]، نسفاتین-۱ علاوه بر تنظیم رفتار تغذیه‌ای، بر مصرف انرژی به‌صورت درون‌ریز و خودکار هم اثرگذار است.[۴،۱۰] بررسی‌ها نشان می‌دهد که نسفاتین-۱ به واسطه‌ی عوامل متعددی از جمله ناشتایی و تغذیه‌ی مجدد پس از ناشتایی، دیابت، و فعالیت بدنی تاثیر پذیر می‌باشد. بیان گردیده که در شرایط گرسنگی، بیان ژن نوکلئوبایندین-۲ در PVN به همراه غلظت نسفاتین-۱ کاهش پیدا کرده[۴،۹] و بیان نورون NPY[v] در هسته‌های کمانی توسط پپتید نسفاتین-۱ مهار می‌شود.[۱۱]

کوهنو و همکاران (۲۰۰۸) در پژوهش‌های خود گزارش کردند که ناشتایی موجب کاهش بیان نسفاتین-۱ شده و تغذیه‌ی مجدد، میزان بیان آن را به حد طبیعی یا بالاتر رسانده است.[۱۲] در دیگر بررسی‌ها نیز در شرایط گرسنگی، بیان mRNA نسفاتین/ نوکلئوبایندین ۲، به‌صورت انتخابی کاهش یافت.[۴،۸]

در مورد غلظت بافتی این هورمون و فعالیت بدنی تاکنون پژوهشی انجام نشده است. با این وجود، در تنها پژوهش موجود، توسط قنبری نیاکی و همکاران (۲۰۱۰)، پاسخ نسفاتین-۱ به یک وهله فعالیت بی‌هوازی در نمونه‌های انسانی بررسی گردید که در آن فقط بر تغییرات پلاسمایی تاکید شد.[۱۳]

ناشتایی به‌عنوان یک ابزار کاهنده‌ی منابع انرژی (گلیکوژن وATP) در برخی از پژوهش‌ها مورد استفاده قرار گرفته و تخلیه‌ی گلیکوژن به دنبال دوره‌های کوتاه مدت (۱۲ ساعت) و بلند مدت (۴۸ تا ۷۲ ساعت) ناشتایی گزارش شده است.[۱۴-۱۷] فعالیت‌های بدنی و ورزش به صورت یک جلسه یا تمرین در اشکال متفاوت و در شدت‌های مختلف قادر است که تعادل انرژی را به سوی منفی شدن برهم بزنند. این امر موجب تخلیه‌ی منابع انرژی بلافاصله پس از یک وهله فعالیت و یا بهبود منابع به دنبال یک دوره تمرین، در کبد می‌شود. رخداد یاد شده به‌نوبه‌ی خود می‌تواند تغییرات بیان ژن، به ویژه ژن‌های رمز کننده‌ی پروتئین‌های ناقل را تنظیم کند[۱۲،۱۷] و بر پاسخ گلیکوژنولیز و گلوکونئوژنز اثرگذار باشد.[۱۳] بنابراین با توجه به نقش پیشنهادی نسفاتین-۱، در تنظیم انرژی و رفتار دریافت غذا، به‌نظر می‌رسد که بررسی رفتار این پپتید، به‌ویژه در بافت خارج هیپوتالاموسی، طی شرایط تغییرات احتمالی در حالات انرژی به واسطه‌ی فعالیت بدنی و ورزشی، به روشن شدن اهمیت آن به‌عنوان یک بازیگر مهم یا فرعی در تنظیم انرژی کمک خواهد کرد.

بنابراین، پژوهش حاضر قصد دارد تا اول، نشان دهد آیا نسفاتین-۱ در کبد به‌عنوان یک بافت محیطی بیان می‌شود؟ دوم، آیا یک دوره تمرین دویدن روی نوارگردان به بیان و افزایش این پپتید در گروه تمرین کرده منجر می‌شود؟ سوم، آیا تغییرات احتمالی در این پپتید همراه با تغییرات احتمالی در گلیکوژن و ATP کبد است؟

مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر، ۱۱ سر موش صحرایی نر ۸ هفته‌ای از نژاد ویستار با میانگین وزنی ۱۰±۱۲۳ گرم از انستیتو پاستور شهر آمل خریداری شد. موش‌ها در آزمایشگاه

i - Nucleobindin 2
ii - Paraventricular nucleus
iii - Supraoptic nucleus
iv - Central nervous system
v - Neuropeptide Y

www.SID.ir

Archive of SID

حیوانات، طی شرایط کنترل شده‌ی نور (۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی)، دما (۱±۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد) و رطوبت (۳±۵۰ درصد) در قفس‌های مخصوصی به ابعاد در ۴۳×۲۷×۲۵ سانتی‌متر نگهداری شدند. غذای آزمودنی‌های این پژوهش، تولید شرکت خوراک دام به‌پرور کرج بود که بر اساس وزن کشی هفتگی با ترازوی استاندارد ویژه و با توجه به جیره‌ی طبیعی ۱۰ گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن در روز، در هر قفس قرار داده می‌شد. در تمام مراحل پژوهش، آب مورد نیاز حیوان به صورت آزاد در اختیار آن‌ها قرار داده شد. موش‌ها پس از یک هفته آشنایی با فضای آزمایشگاه و دستکاری توسط یک فرد مشخص، به طور تصادفی به دو گروه کنترل و تمرین (همسان از نظر وزن) تقسیم شدند. این پژوهش از نوع تجربی با دو گروه کنترل و تمرین انجام شد. موش‌های کنترل در هیچ تمرینی شرکت نکردند. طول دوره‌ی تمرینی موش‌ها ۸ هفته بود که در هر هفته ۵ روز به تمرین پرداختند.

کل دوره‌ی تمرین به ۳ مرحله تقسیم شد:

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

مرحله‌ی دوم (مرحله‌ی اضافه بار): در این مرحله موش-ها ابتدا به مدت ۱۵ دقیقه و با سرعت ۱۵ متر بر دقیقه روی نوارگردان دویدند. به تدریج طی ۲ هفته تمرین، مدت و شدت فعالیت افزایش یافت تا به میزان نهایی ۶۰ دقیقه و سرعت ۲۰ متر بر دقیقه رسید.

مرحله‌ی سوم (حفظ یا تثبیت بار): در این مرحله موش‌های گروه‌های تمرینی به‌مدت ۶ هفته (۵ روز در هفته) با سرعت ۲۰ متر بر دقیقه (معادل ۵۵–۵۰٪ VO2 max)[۱۸] به-مدت ۶۰ دقیقه روی نوارگردان دویدند.

در این مرحله به‌منظور رعایت موارد اخلاقی، برای وادار کردن موش‌ها به دویدن از شوک الکتریکی استفاده نشد، بلکه این عمل توسط میله ای پلاستیکی صورت گرفت. ۱۰ دقیقه‌ی اول و آخر هر جلسه‌ی تمرین به‌ترتیب به گرم و سرد کردن اختصاص داده شد. پس از پایان دوره‌ی تمرین، گروه‌های تمرین و کنترل، ۷۲ ساعت پس از آخرین جلسه‌ی تمرین و پس از ۴ ساعت ناشتایی بیهوش شدند.[۱۹]

بی‌هوشی توسط تزریق داخل صفاقی ماده‌ی بی‌هوشی ترکیبی از کتامین (۵۰–۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۵–۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم) انجام و تکه‌ای از بافت کبد بلافاصله با نیتروژن مایع منجمد برداشته و برای اندازه‌گیری‌های بعدی در فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

غلظت نسفاتین-۱ با استفاده از کیت مربوط به اندازه‌گیری نسفاتین-۱ به‌روش الایزا و بر اساس دستورالعمل کارخانه‌ی سازنده‌ی کیت (USCN LIFE Science Inc، ساخت چین، با ضریب تغییرات برون آزمون۷/۱٪، حساسیت روش اندازه‌گیری ۰/۰۸ نانوگرم بر میلی‌لیتر) تعیین گردید. غلظت گلیکوژن نیز با استفاده از کیت کلریمتری گلیکوژن (ساخت شرکت نان جینگ چین با ضریب تغییرات ۴/۵٪ و حساسیت ۰/۰۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اندازه‌گیری شد. هم‌چنین غلظت ATP به‌روش بیولومینانس[i] و با استفاده از کیت Biaffin GmbH ساخت کشور آلمان با استاندارد میلی‌مولار ۴۰ :۱۰۳×۳۰۹ واحد نسبی لومینوسانس تعیین گردید.

۵۰ میلی‌گرم از بافت منجمد عضله در مجاورت با مایع نیتروژن پودر، هموژن شده و برای تخلیص mRNA با استفاده از کیت مربوط به تخلیص RNA (ساخت شرکت سیناژن) با دقت فراوان در محافظت و جداسازی RNA، استفاده شد. برای سنتز اولین رشته‌ی cDNA از هر نمونه بافتی به مقدار یک میکروگرم RNA تخلیص شده استفاده گردید. سطح نسبی mRNA ژن نسفاتین در هیپوتالاموس با روش RT-PCR نیمه کمی اندازه‌گیری شد. پرایمرهای ویژه‌ی نسفاتین شامل:

Nesfatin-Forward: 5' TTTGAACACCTGAACCACCA 3'

Nesfatin-Reverse: 5' TGCAAACTTGGCTTCTTCCT 3'

که یک قطعه‌ی ۲۱۱ جفت بازی را در این ژن تکثیر می‌کنند و پرایمرهای ویژه‌ی β-actin برای تکثیر این ژن به عنوان کنترل به‌کار رفته که شامل:

Nesfatin-Forward: 5' CACCCGCGAGTACAACCTTC 3'

Nesfatin-Reverse: 5' CCCATACCCACCATCACACC 3'

بود، که قطعه‌ی ۲۰۷جفت بازی از ژن بتا اکتین را تکثیر می‌کنند. بتا اکتین یک ژن همیشه بیان شونده[i] است و می‌تواند شاهد خوبی برای بررسی کل فرایند تخلیص mRNA باشد. PCR نیز طی مراحل زیر انجام پذیرفت: ۱) مرحله‌ی واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت ۲) مرحله‌ی تکثیر (۳۵ سیکل) در۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه، ۶۴ درجه‌ی سانتی‌گراد

i -Bioluminescence method

www.SID.ir

Archive of SID

به‌مدت یک دقیقه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه انجام شد. ۳) مرحله‌ی طویل سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. برای به‌دست آوردن بهترین غلظت cDNA الگو، غلظت‌های مختلف از cDNA بررسی و در نهایت بهترین غلظت برای PCR نهایی به‌کار گرفته شد. آزمون های این پژوهش کمینه سه بار تکرار شد. بررسی نیمه کمی باندها با کمک دانسیتومتری کامپیوتری (Kodak, CT) انجام و سطح بیان mRNA نسبت به بیان ژن بتا اکتین محاسبه شد.

از آمار توصیفی برای دسته‌بندی داده‌ها و برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون تی مستقل استفاده شد. لازم به یادآوری است یافته‌ها به‌صورت میانگین±انحراف معیار بیان شده است. برای محاسبه‌ی داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۱/۵ استفاده و اختلاف معنی‌داری آماری در سطح $P\leq ۰/۰۵$ تعیین گردید.

یافته‌ها

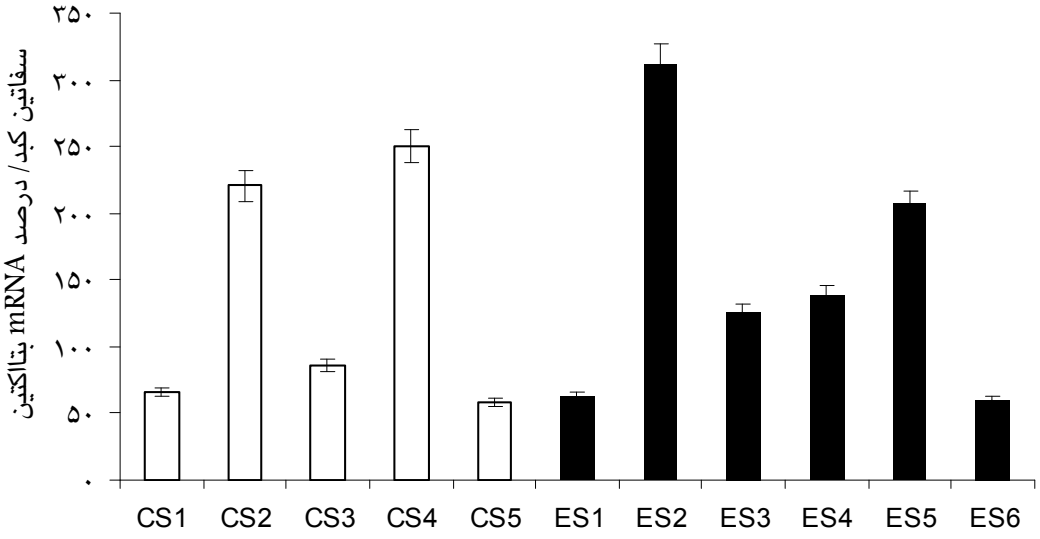
تغییرات نسفاتین-۱ و سایر متغیرهای پژوهش در گروه‌های تمرین و کنترل پس از ۸ هفته فعالیت ورزشی نیز در جدول ۱ ارایه گردید.

جدول ۱- تغییرات نسفاتین-۱ و سایر متغیرهای پژوهش در گروه‌های تمرین و کنترل پس از ۸ هفته فعالیت ورزشی

ردیف	متغیر اندازه گیری شده	گروه کنترل	گروه تمرین
۱	نسفاتین کبد/درصد mRNA بتااکتین	۱۳۶/۱±۹۱/۴	۱۵۰/۸±۹۵/۵
۲	نسفاتین-۱ کبدی (نانوگرم بر گرم)	۰/۲±۰/۰۸	۰/۲±۰/۰۹
۳	گلیکوژن کبد (میلی‌گرم بر گرم)	۲/۷±۰/۴	۵/۳±۱/۷
۴	ATP کبد (میکرومول بر گرم)	۴/۸±۰/۷	۴/۵±۰/۲

*اعداد به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند. مقدار P<۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد.

تجزیه و تحلیل داده‌های به دست آمده از تغییرات نشان می‌دهد که مقدار بیان ژن نسفاتین-۱ کبد در موش‌های تمرین کرده بالاتر بود (P =۰/۸۰ و t= -۰/۲۵) اما این تغییرات به حد معنی‌داری نرسید (نمودار ۱).



نمودار۱- درصد نسبی بیان ژن نسفاتین-۱ در هر نمونه، گروه تمرین (ES) و گروه کنترل (CS)

اگرچه افزایش بیان نسفاتین-۱ کبدی با ازدیاد غلظت نسفاتین-۱ کبد همسو بوده (P=۰/۹۴ و t=۰/۰۶) اما تفاوت معنی‌داری بین دو گروه تمرین و کنترل دیده نشد (جدول ۱ و نمودار ۱) همان‌طور که در جدول مذکور مشاهده می‌شود غلظت گلیکوژن کبد در گروه تمرین به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است ($P\leq ۰/۰۱$ و t= -۳/۱۶).

هم‌چنین استفاده از آزمون تی مستقل نشان داد که سطح استراحتی ATP به‌طور غیر معنی‌داری (P=۰/۸۲ و t=۰/۲۲) در گروه تمرین در مقایسه با گروه کنترل پایین‌تر بود.

i- House keeping gene
ii- Independent t-test

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر ۸ هفته تمرین استقامتی با شدت ۲۰ متر در دقیقه روی نوار گردان، بر بیان ژن نسفاتین-۱ و تغییرات غلظت آن در کبد بود. از یافته‌های مهم این پژوهش مشاهده‌ی بیان ژن نسفاتین-۱ در گروه کنترل و پاسخ آن به تمرین می‌باشد. این نخستین پژوهشی است که بیان ژن نسفاتین-۱ را در شرایط استراحت و پس از تمرین نشان داده است. با این وجود، برخلاف بالا بودن سطح بیان ژن در گروه تمرین، تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید. افزایش معنی‌دار سطح استراحتی گلیکوژن کبد در گروه تمرین نیز از دیگر یافته‌های قابل ملاحظه‌ی پژوهش حاضر است. شواهد و گزارش‌ها نشان می‌دهد که منبع اصلی بیان و ترشح نسفاتین-۱، هسته‌ی کمانی هیپوتالاموس می-باشد.[۴] اگر چه همین گزارش‌ها بیان این پپتید را در دیگر نواحی مغز نیز تایید می‌کنند، با این حال بررسی‌های اخیر نشان می‌دهد که علاوه بر مغز و هیپوتالاموس، نسفاتین-۱ در بافت‌های خارج هیپوتالاموس مانند هسته‌های کمانی، جانبی بطنی، فوق بینایی، ناحیه‌ی جانبی هیپوتالاموس شناسایی شده است.[۴] علاوه بر یافته‌های عنوان شده، ایمونوراکتیویتی NUCB2 در مخاط معده، پانکراس، بیضه، غده هیپوفیز، بافت چرب و سرم نیز یافت شده است.[۲۰،۲۱]

بر اساس یافته‌های ما تنها یک پژوهش وجود دارد که رفتار نسفاتین -۱ پلاسمایی را در پاسخ به دو نوع فعالیت یک وهله‌ای بی‌هوازی (آزمون RAST[i] و NCKB[ii]) در کیک بوکسورهای جوان بررسی کرده است.[۱۳] در این پژوهش مقدار نسفاتین-۱ پلاسما، در آزمون NCKB، پس از فعالیت، دقیقه‌های ۴۵ و ۹۰ دوره‌ی استراحتی افزایش یافت، در حالی‌که، پاسخ آزمون RAST نشان داد که نسفاتین -۱ پس از فعالیت و در دقیقه‌ی ۴۵ کاهش و در دقیقه‌ی ۹۰ دوره استراحتی افزایش یافت. لازم به یادآوری است که هیچ کدام از این تغییرات به حد معنی‌داری نرسید.[۱۳]

به دلیل فقدان داده‌های لازم درباره‌ی بیان و عملکرد نسفاتین-۱ در کبد به‌خوبی روشن نیست که تمرین استقامتی با چه سازوکاری بر این پپتید اثر می‌گذارد. با این وجود، در برخی از بررسی‌ها نشان داده شد که ناشتایی، اثرات مشابه‌ای با تمرین بدنی بر ذخیره‌های انرژی، به‌ویژه ATP، گلیکوژن کبدی و عضله دارد[۱۷] و می‌تواند به کاهش ۱۸٪ نسفاتین -۱ سرم منجر شود.[۲۲] علاوه بر این در موش‌های ناشتا، ۱۲ ساعت پس از دریافت غذا، کاهش نسفاتین-۱ به حالت طبیعی بازگشت.[۴،۱۱] اما در پژوهش حاضر حیوانات سیر بودند و ۷۲ ساعت پس از آخرین جلسه‌ی تمرین کشته شدند. کوهنو و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که تعداد نورون‌های بیان کننده‌ی نسفاتین-۱، C-FOS- immunoreactive، پس از دریافت غذا به مدت ۲ ساعت به دنبال ۴۸ ساعت گرسنگی، در حیوانات دریافت کننده‌ی غذا در مقایسه با حیوانات ناشتا، به طور معنی‌داری (۱۰ برابر) بیشتر بود.[۱۲] در شرایط گرسنگی، بیان mRNA نسفاتین/نوکلئوبایندین ۲، به‌صورت انتخابی کاهش پیدا می‌کند،[۴،۸] از طرفی دیگر، بررسی پژوهش‌های گذشته نیز نشان می‌دهد که تمرین استقامتی طولانی مدت موجب افزایش بازسازی منابع گلیکوژنی می‌شود.[۲۳-۲۶] پژوهشگران با بررسی برنامه‌ی شنای طولانی مدت روی موش‌های ماده‌ی نژاد ویستار نشان دادند که تمرین استقامتی منجر به افزایش میزان و سرعت فرا جبرانی گلیکوژن عضله در موش‌ها می‌شود.[۲۶] در پژوهش قنبری نیاکی و همکاران[۲۷] نیز مشاهده شد که گلیکوژن کبدی در موش‌هایی که تمرین استقامتی (به مدت ۶ هفته با شدت ۲۵ متر در ۶۰ دقیقه برای هر جلسه) انجام می‌دادند، افزایش معنی‌داری داشت. با توجه به اثر تمرین در بهبودی و ازدیاد معنی‌دار گلیکوژن کبد در پژوهش حاضر، شاید بتوان بالا بودن مقدار بیان نسفاتین و غلظت آن در کبد را به گلیکوژن نسبت داد.

بر اساس گزارش‌های موجود، عوامل متعددی بر غلظت ATP کبدی اثرگذار هستند.[۲۷] آنچه که مسلم است فعالیت ورزشی از جمله عوامل بارزی است که موجب تغییرات غلظت ATP کبد می‌شود. البته تاکنون پاسخ‌های متفاوتی در این مورد گزارش شده است. برخی پژوهشگران افزایش معنی‌دار،[۲۸،۲۹] تعدادی نیز کاهش معنی‌دار[۱۴،۲۵،۳۰،۳۱] و در برخی دیگر عدم تغییر معنی‌دار[۳۲] در غلظت ATP کبدی را گزارش نموده‌اند. در پژوهشی که قنبری نیاکی و همکاران[۲۷] (۲۰۰۹) روی موش‌های نر انجام دادند، ۸ هفته تمرین استقامتی (۶۰ دقیقه، شدت ۲۶ متر بر دقیقه) غلظت ATP کبد را در گروه تمرین به طور معنی‌داری افزایش داد. در این بررسی حیوانات ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین بیهوش شده بودند. قنبری نیاکی و همکاران[۳۳] (۲۰۱۰) در پژوهشی دیگر غلظت ATP کبد را پس از ۳، ۶ و ۱۲ هفته

i- Running-based anaerobic sprint test
ii - Non-combat kickboxing session

www.SID.ir

Archive of SID

تمرین استقامتی (۶۰ دقیقه، شدت ۲۵ متر بر دقیقه) بررسی کردند. در این پژوهش غلظت ATP پس از ۳ هفته تمرین تغییری نکرد، در حالی‌که پس از ۶ و ۱۲ هفته، به طور معنی-داری افزایش یافت. لازم به یادآوری است در این پژوهش فاصله‌ی آخرین جلسه‌ی تمرین تا بیهوشی ۴۸ ساعت بود.

در پژوهشی دیگر که به تازگی به چاپ رسید قنبری نیاکی و همکاران[۳۴] (۲۰۱۰) اثر تمرین استقامتی (۶۰ دقیقه، شدت ۲۵ متر بر دقیقه) را در سه گروه تمرینی کوتاه‌مدت (۳ هفته)، متوسط (۹ هفته) و بلندمدت (۱۲هفته) روی تغییرات ATP کبد بررسی کردند. یافته‌ها حاکی از آن بود که تمرین استقامتی کوتاه مدت و بلند مدت موجب افزایش معنی‌دار در غلظت ATP کبد گردید، در حالی‌که تمرین‌های ۹ هفته‌ای تغییری در غلظت ATP کبد ایجاد نکرد. در این پژوهش حیوانات ۳۷ ساعت پس از آخرین جلسه‌ی تمرین بیهوش شده بودند. در راستای یافته‌های پژوهش، هاگتون و همکاران[۳۵] کاهش ATP کبدی را به دنبال فعالیت تمرینی در موش صحرایی گزارش کردند. توجیه این پژوهشگران تغییر متابولیت‌های کبدی در اثر تمرین یاد شده است و مهم‌ترین علت کاهش ATP کبدی را، تلاش کبد برای کاهش لاکتات تولیدی در طی تمرین بیان داشته اند.

بر اساس پژوهش‌های یاد شده به نظر می‌رسد عواملی مانند شدت تمرین، مدت تمرین، طول دوره‌ی تمرین و فاصله‌ی آخرین جلسه‌ی تمرین تا بیهوشی در غلظتATP کبد نقش مهمی داشته باشند. با توجه به این امر، در پژوهش حاضر، فاصله‌ی نسبی زیاد بین آخرین جلسه‌ی تمرین تا کشتار (۷۲ ساعت)، شدت و مدت متوسط تمرین (۲۰ متر بر دقیقه، ۸ هفته) می تواند از جمله عواملی باشد که منجر به عدم افزایش و حتی کاهش این شاخص شده است.

در رابطه با اثر ورزش روی غلظت نسفاتین نیز در گذشته، تنها یک پژوهش انجام شده که آن هم تمرین بی‌هوازی روی انسان بود که یافته‌های به‌دست آمده از آن هم تغییر معنی‌داری در غلظت نسفاتین-۱ پلاسما نشان نداد.[۱۳]

نسفاتین/ نوکلئوبایندین-۲ دارای قابلیت تقسیم شدن توسط پروهورمون کانورتاز (PC) است. تبدیل نسفاتین/ نوکلئوبایندین-۲ به نسفاتین-۱ توسط پروهورمون کانورتاز به منظور جلوگیری از مصرف غذا ضروری است.[۴،۸] در بررسی پژوهش‌های پیشین حضور PC در کبد دیده شده[۳۶] ولی بیان نسفاتین-۱ تاکنون مشهود نبوده است. شاید یکی از دلایل وجود هرچند اندک نسفاتین-۱ در کبد وجود همان PC باشد. ولی از آنجا که سازوکار دقیق نسفاتین-۱ هنوز مشخص نیست، دلیل قطعی برای عدم تغییرات معنی‌دار نمی‌توان بیان نمود.

به طور کلی، یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که نسفاتین-۱ علاوه بر اینکه در کبد، به عنوان بافت محیطی بیان می‌گردد، بلکه به تمرین استقامتی نیز پاسخ می‌دهد. با توجه به افزایش معنی‌دار گلیکوژن کبد، بیان ژن نسفاتین-۱ در آن و وجود پروهورمون کانورتاز در کبد، این امکان وجود دارد که با انجام پژوهش‌های آینده و دخالت دادن عواملی دیگر در برنامه‌ی تمرینی تغییرات معنی‌داری در نسفاتین کبد رخ دهد.

References

1. Wynne K, Stanley S, McGowan B, Bloom S. Appetite control. J Endocrinol 2005; 184, 291-318.
2. Woods SC, Seeley RJ, Porte D Jr, Schwartz MW. Signals that regulate food intake and energy home-ostasis. Science 1998; 280: 1378-83.
3. Shimizu H, Mori M. The brain-adipose axis: a review of involvement of molecules. Nutr Neurosci 2005; 8: 7-20.
4. Oh S, Shimizu H, Satoh T, Okada S, Adachi S, Inoue K, et al. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. Nature 2006; 443: 709-12.
5. Goebel M, Stengel A, Tache Y, Sachs G, Lambrecht NW. Fasting Decreases Nesfatin-1/NUCB2 Serum Levels in Rats. Gastroenterology 2009; 136: 584.
6. Miura K, Titani K, KurosawaY, Kanai Y. Molecular cloning of nucleobindin, a novel DNA-binding protein that contains both a signal peptide and a leucine zipper structure. Biochem Biophys Res Commun 1992; 187: 375-80.
7. Shimizu H, Oh-I S, Hashimoto K, Nakata M, Yamamoto S, Yoshida N, et al. Peripheral adminstration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: the leptin-independent mechanism. Endocrinology 2009; 150: 662-71.
8. Brailoiu GC, Dun SL, Brailoiu E, Inan S, Yang J, Chang JK, et al. Nesfatin-1: distribution and interaction with a G protein-coupled receptor in the rat brain. Endocrinology 2007; 148: 5088-94.

www.SID.ir

9. Shimizu H, Ohsaki A, Oh-IS, Okada S, Mori M. New anorexigenic protein, nesfatin-1. Peptides 2009; 30: 995-8.
10. Foo KS, Brismar H, Broberger C. Distribution and neuropeptide coexistence of nucleobindin-2 mRNA/n-esfatin-like immunoreactivity in the rat CNS. Neuroscience 2008; 156: 563-79.
11. Price CJ, Samson WK, Ferguson AV. Nesfatin-1 inhibits NPY neurons in the arcuate nucleus. Brain Res 2008; 1230: 99-106.
12. Kohno D, Nakata M, Maejima Y, Shimizu H, Sedbazar U, Yoshida N, et al. Nesfatin-1 neurons in paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus coexpress oxytocin and vasopressin and are activated by refeeding. Endocrinology 2008; 149: 1295-301.
13. Ghanbari-Niaki A, Kraemer R, Soltani R. Plasma nesfatin-1 and glucoregulatory hormone responses to two different anaerobic exercise sessions. Eur J Appl Physiol 2010; 110: 863-8.
14. Ghanbari-Niaki A, Soltani R, Shemshaki A, Kraemer RR. Effects of acute ethionine njection on plasma ghrelin and obestatin levels in trained male rats. Metabolism 2010; 59: 982-7.
15. Ghanbari-Niaki A, Bergeron R, Latour MG, Lavoie JM. Effects of physical exercise on liver ATP levels in fasted and phosphate injected rats. Arch Physiol Biochem 1999; 107: 393-402.
16. Conlee RK, Rennie MJ, Winder WW. Skeletal muscle glycogen content: diurnal variation and effects of fasting. Am Jour Physiol 1976; 231: 614-8.
17. Conlee RK, Lawler RM, Ross PE. Effects of glucose or fructose feeding on glycogen repletion in muscle and liver after exercise or fasting. Ann Nutr Metab 1987; 31: 126-32.
18. Brooks GA, White TP. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. J Appl Physiol 1978; 45: 1009-15.
19. Katsuhiko O, Jian WU, Naohisa N, Toshiaki A, Michio K. Combined intervention of Medium-chain Triacylglycerol Diet and Exercise Reduces Body fat mass and enhance energy expenditure in rats. J Nutr Sci Vitaminal 2008; 54: 136-41.
20. Stengel A, Goebel M, Yakubov I, Wang L, Witcher D, Coskun T, et al. Identification and characterization of nesfatin-1 immunoreactivity in endocrine cell types of the rat gastric oxyntic mucosa. Endocrinology 2009; 150: 232-8.
21. Stengel A, Goebel M, Wang L, Tache Y. Ghrelin, desacyl ghrelin and nesfatin-1 in gastric X/A-like cells: role as regulators of food intake and body weight. Peptides 2010; 31: 357-69.
22. Li QC, Wang HY, Chen X, Guan HZ, Jiang ZY. Fasting plasma levels of nesfatin-1 in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus and the nutrient-related fluctuation of nesfatin-1 level in normal humans. Regul Pept 2010; 72-7.
23. Baldwin KM, Fitts RH, Booth FW, Winder WW, Holloszy JO. Depletion of muscle and liver glycogen during exercise. Protective effect of training. Pflugers Arch 1975; 354: 203-12.
24. James DE, Kraegen EW. The effect of exercise training on glycogen, glycogen synthase and phosphorylase in muscle and liver. Eur J Appl Physiol Occup Physiol 1984; 52: 276-81.
25. Murakami T, Shimomura Y, Fujitsuka N, Sokabe M, Okamura K, Sakamoto S. Enlargement glycogen store in rat liver and muscle by fructose-diet intake and exercise training. J Appl Physiol 1997; 82: 772-5.
26. Nakatani A, Han DH, Hansen PA, Nolte LA, Host HH, Hickner RC, et al. Effect of endurance exercise training on muscle glycogen supercompensation in rats. J Appl Physiol 1997; 82: 711-5.
27. Ghabari-Niaki A, Fathi R, Kakhak A, Farshidi Z, Barmaki S, Rahbarizadeh F, et al. Tredmill exercise's reduction of Agouti-related protein expression in rat liver. Int J Sport Nutr Exerc Metab 2009; 19: 473-84.
28. Huang CC, Lin WT, Hsu FL, Tsai PW, Hou CC. Metabolomics investigation of exercise-modulated changes in metabolism in rat liver after exhaustive and endurance exercises. Eur J Appl Physiol 2010; 108: 557-66.
29. Ghanbari-Niaki A, Jafari A, Abednazari H, Nikbakht H. Treadmill exercise reduces obestatin concentrations in rat fundus and small intestine. Biochem Biophys Res Commun 2008; 372: 741-5.
30. Andersson U, Treebak JT, Nielsen JN, Smith KL, Abbott CR, Small CJ, et al. Exercise in rats does not alter hypothalamic AMP-activated protein kinase activity. Biochem Biophys Res Commun 2005; 329: 719-25.
31. Ghanbari-Niaki A, Desy F, Lavoie JM. Effects of Phosphate Injection on Metabolic and Hormonal Responses to Exercise in Fructose-Injected Rats. PhysioL Behav 1999; 67: 747-52.
32. Kaya O, Kilic M, Celik I, Baltaci AK, Mogulkoc R. Effect of melatonin supplementation on plasma glucose and liver glycogen levels in rats subjected to acute swimming exercise. Pak J Pharm Sci 2010; 23: 241-4.
33. Ghanbari-Niaki A, Jafari A, Moradichaleshtori M, Kramer R. Short, Moderate, and Long term Treadmill Training Protocols Reduce Plasma, Fundus, but not Small Intestine Ghrelin Concentrations in Male Rats. J Endocrinol Invest 2010 Dec 23.
34. Ghanbari-Niaki A, Kraemer R, Abednazari H. Time-course alterations of plasma and soleus agouti-related peptide and relationship to ATP, glycogen, cortisol, and insulin concentrations following treadmill training programs in male rats. Horm Metab Res 2011; 43: 112-6.
35. HOU-GHTON CR, HAwKINS RA, Williamson DH, Krebs H. The effects of physical training on the metabolic respo-nse to short-term severe exercise in the rat. Biochem J 1971; 124: 57.
36. Tzimas GN, Chevet E, Jenna S, Nguyên DT, Khatib AM, Marcus V, et al. Abnormal expression and processing of the proprotein convertases PC1 and PC2 in human colorectal liver metastases. BMC Cancer 2005; 5: 149.

www.SID.ir

Archive of SID

Original Article

Effect of 8 Weeks Endurance Training With Two Different Durations on Plasma HDL and Ghrelin in Male Rats

Ghanbari-Niaki A[1], Hossein pour F[1], Fathi R[1], Daneshpouri M[2], Akhavan Niaki H[3], Zarkesh M[2], Hedayati M[2]

[1]Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Mazandaran University, Sari; [2]Obesity Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences of Tehran; [3]Faculty of Medical Science, Babol University of Medical Sciences, Tehran. I.R. IRAN

e-mail:hedayati@endocrine.ac.ir

Received: 27/12/2010 **Accepted**: 08/02/2011

Abstract

Introduction: Nesfatin-1, a novel anorexigenic protein derived from the Nucleobindin-2 (NUCB2) gene, is expressed in adipose tissue and is found in plasma. The purpose of this study was to examine the effect of an eight-week endurance training regimen on nesfatin gene expression and its concentration in the male rat liver. Materials and Methods: Eleven adult Wistar male rats were used. Animals were randomly divided into the training (TS, n=6) and control (CS, n=5) groups. Training groups were given exercise on a motor-driven treadmill (0% grade, 60 min, and 5 days/week for 8 weeks, 50-55%VO2max). Samples of liver were excised and stored in liquid nitrogen to extract nesfatin-1 mRNA, and to determine its concentration and that of glycogen by RT-PCR, ELISA & colorimetric assay respectively. Results: Although liver nesfatin mRNA expression and its concentration were increased, changes were not significant. Also liver glycogen concentration was significantly higher in trained rats compared to controls. Conclusion: The results of this research showed for the first time that nesfatin-1 is first expressed in the liver as a peripheral tissue and it then changes with endurance training. The insignificant variations of nesfatin-1 in the liver might be attributed to its role in energy balance. It seems that relative improvement in the liver's energy status is influenced by nesfatin gene expression, whereas as an indicator of source ATP, was lower in trained group compared to control group.

Keywords: Nesfatin-1, Nucb2, Anorexigenic Protein, Gene Expression, Male Rat

www.SID.ir