



## اثر ۸ هفته تمرین استقامتی بر بیان ژن نسفاتین و غلظت آن در

### هیپوتالاموس موش‌های صحرایی نر

عباس قنبری نیکی<sup>۱\*</sup>، فاطمه حسین پور<sup>۱</sup>، رزیتا فتحی<sup>۱</sup>، علیرضا صفایی کناری<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> گروه بیوشیمی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه مازندران

### چکیده

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

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

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

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

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

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

## مقدمه

نسفاتین-۱ بر دریافت غذا و افزایش وزن اثرگذار است (۵ و ۶). نسفاتین-۱، علاوه بر مهار تحریک ایجاد شده توسط گرلین<sup>۷</sup> و کاهش بافت چربی، در اعمال دیگری از قبیل فعالیت دستگاه گوارش (۷)، و تخلیه معده (۸) دخیل است.

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

در خصوص غلظت بافتی این هورمون و فعالیت بدنی تاکنون تحقیقی انجام نشده است. با این وجود، در تنها مقاله‌ی موجود، قنبری‌نیاکی و همکاران (۲۰۱۰) تغییرات پلاسمایی نسفاتین-۱ را به دو نوع فعالیت بی‌هوای رست (RAST)<sup>۸</sup> و دایره‌ای در یک بوکسورهای جوان بررسی کردند.

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

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

هیپوتالاموس دارای مجموعه‌های نورونی است و نوروپپتیدهای ویژه‌ای را تولید می‌کند که بر روی رفتار دریافت غذا، تنظیم و تعادل انرژی، کنترل وزن و اشتها اثرگذار است. این عمل از طریق نوروپپتیدهای اشتها‌آور (از جمله MCH<sup>۱</sup>، AGRP<sup>۲</sup>، NPY<sup>۳</sup>) و ضد اشتها (از قبیل Nesfatin-1، CART<sup>۴</sup>، POMC<sup>۵</sup>) انجام می‌پذیرد (۱).

نسفاتین-۱ ترکیبی از یک پایانه سیگنالی ۲۴ اسید آمینه‌ای و ساختار پروتئینی حاوی ۳۹۶ اسید آمینه است (۲) که در سال ۲۰۰۶ توسط اوه (Oh) و همکاران کشف گردید (۳). این پروتئین از نوکلئوباندین-۲ (NUCB2)<sup>۶</sup> مشتق شده و در سلول‌های کنترل‌کننده اشتها در هیپوتالاموس و دیگر نواحی مغز موش‌های صحرائی بیان گردیده است (۳ و ۴). اوه (۳) بخش‌های مشتق شده از NUCB2 را به نسفاتین-۱، ۲ و ۳ تقسیم کرده‌اند. در این بین تنها

<sup>۱</sup> Melanin-Concentrating Hormone

<sup>۲</sup> Agouti-Related Protein

<sup>۳</sup> Neuropeptide Y

<sup>۴</sup> Cocaine-and Amphetamine-Regulated Transcript

<sup>۵</sup> Pro-Opiomelanocortin

<sup>۶</sup> Nucleobindin 2

<sup>۷</sup> Gherlin

<sup>۸</sup> Running-based Anaerobic Sprint Test

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

### مواد و روش کار

یازده سرموش صحرائی نر نژاد ویستار (۱۰-۸ هفته، با وزن اولیه ۱۴۵-۱۳۰ گرم) از «انستیتو پاستور شهر آمل» خریداری شد. موش‌ها در آزمایشگاه حیوانات، تحت شرایط کنترل شده نور (۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی)، دما  $22 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد و رطوبت ( $50 \pm 3$  درصد) در قفس‌های مخصوص به ابعاد در  $25 \times 27 \times 43$  سانتی‌متر نگهداری و با غذای استاندارد برای جوندگان از شرکت خوراک دام به‌پرور کرج و با جیره‌ی طبیعی ۱۰ گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن تغذیه شدند.

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

تمرینی شرکت نکرد.

برنامه تمرین به مراحل زیر تقسیم شده بود:

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

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

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

در این مرحله به‌منظور رعایت مسائل اخلاقی، برای وادار کردن موش‌ها به دویدن از شوک الکتریکی استفاده نشد، بلکه این عمل توسط میله‌ای پلاستیکی انجام شد. ده دقیقه‌ی اول و آخر هر جلسه‌ی تمرین به‌ترتیب به گرم و سرد کردن اختصاص یافت. ۷۲ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین هر دو گروه در روز نمونه‌برداری بافتی با تزریق داخل صفاقی ماده بیهوشی ترکیبی از کتامین<sup>۹</sup> (۵۰-۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) و زایلازین<sup>۱۰</sup> (۵-۳ میلی‌گرم در کیلوگرم) بیهوش شدند و هیپوتالاموس جهت تعیین بیان و غلظت نسفاتین-۱ و همچنین گلیکوژن و ATP برداشته، با سرم فیزیولوژی سرد شستشو، تمیز و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد، و برای اندازه‌گیری‌های بعدی در فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. لازم به‌ذکر است که غذا، نه آب، ۴ ساعت قبل از کشته شدن حیوان از قفس

<sup>۹</sup> Ketamine

<sup>۱۰</sup> Xylazine

برداشته شد (۱۴).

### روش تعیین بیان ژن نسفاتین-۱

#### مراحل استخراج RNA و سنتز cDNA تک رشته ای:

ابتدا له کردن بافت‌ها و لیز سلول‌ها در ۱ میلی‌لیتر از محلول RNX با استفاده از دستگاه هموژنایزر در میکروتیوب‌های بدون آنزیم RNase انجام پذیرفت. بعد از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، ۱۵۰ میکرولیتر کلروفرم به هر میکروتیوب اضافه شد. پس از همگن‌سازی مخلوط با سر و ته کردن و انکوباسیون مخلوط در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، سانتریفیوژ میکروتیوب‌ها با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت. با تشکیل سه فاز، RNA موجود در فاز بی‌رنگ بالایی به تیوب جدید منتقل گردید. بعد از اضافه کردن ایزوپروپانل به اندازه‌ی حجم مایع انتقال یافته، مخلوط کردن و انکوباسیون به مدت ۲۰ دقیقه در یخ، سانتریفیوژ نمونه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. تخلیه‌ی فاز روئی، افزودن ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد و ورتکس مخلوط تا کنده شدن رسوب از ته میکروتیوب، سانتریفیوژ نمونه با سرعت ۷۵۰۰ دور در دقیقه، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ دقیقه، تخلیه‌ی محلول رویی و خشک شدن نمونه‌ها در دمای اتاق انجام گرفت. حل نمودن رسوب در آب تیمار شده با DEPC و در نهایت RNA به‌دست آمده برای سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفت. برای سنتز cDNA، ابتدا انتقال ۱ میکرولیتر از RNA به تیوب دیگر و اضافه کردن ۱ میکرولیتر آنزیم DNAase I و ۱ میکرولیتر بافر ۱۰X تا رسیدن به حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر انجام شد.

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

بلافاصله پس از انتقال تیوب‌ها به روی یخ مواد RNasin ۰/۵ میکرولیتر، مخلوط dNTP ۲ میکرولیتر و آب بدون RNase ۰/۵ میکرولیتر به ترتیب اضافه گردید. در مرحله بعدی، انکوباسیون مخلوط واکنش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترمال سایکلر انجام شد. سپس، اضافه کردن یک میکرولیتر آنزیم RT<sup>11</sup>، انکوباسیون مخلوط واکنش به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترمال سایکلر انجام پذیرفت. حرارت دادن در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترمال سایکلر، جهت غیر فعال‌سازی آنزیم RT و دناتوره شدن کمپلکس RNA-cDNA صورت گرفت.

#### مراحل انجام RT-PCR

تکثیر قطعات ژن‌های نسفاتین و بتا اکتین توسط روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز معکوس (RT-PCR) با جفت پرایمرهای طراحی شده (جدول ۱) انجام گرفت. محلول واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، شامل ۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۴۰ پیکومول از هر یک از پرایمرها، ۱/۵ میلی‌مول در لیتر MgCl<sub>2</sub>، ۰/۲ میلی‌مول در لیتر dNTP و ۰/۲۵ واحد

<sup>11</sup> Real Time

درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام پذیرفت. برای تشخیص محصولات RT-PCR، قطعات تکثیر یافته به روش الکتروفورز در ژل آگاروز ۲ درصد قابل تفکیک بودند. پس از الکتروفورز، ژل آگاروز به مدت ۱۰ دقیقه در ۱ میکروگرم در دسی لیتر از محلول اتیدیوم بروماید قرار گرفت و قطعات DNA با دستگاه ژل خوان (شرکت Optico، کشور هلند) بررسی شدند.

از آنزیم Taq پلیمرز تهیه شد. تکثیر قطعه مورد نظر در دستگاه ترموسایکلر (شرکت Corbett، کشور استرالیا) طبق برنامه زیر انجام گرفت. مرحله واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه، مرحله تکثیر (۳۵ سیکل) در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، ۶۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه انجام شد. سپس مرحله طویل سازی نهایی در دمای ۷۲

جدول ۱) توالی پرایمرهای طراحی شده در این مطالعه

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

توسط دستگاه خوانش الیزا (Ststfax، آمریکا) بررسی شد. گلیکوژن با استفاده از کیت تجارتي به روش رنگ سنجی از شرکت (Nanjing JianchengBioengineering Institute) نانجینگ چین اندازه گیری گردید. غلظت ATP نیز با استفاده از کیت بیولومینسنس<sup>۱۳</sup> حساس برای ATP از یک شرکت آلمانی (Bioaffin GmbH & Co KG, Kassel, Germany) تعیین شد.

### روش آماری

در پژوهش حاضر با توجه به ماهیت آن و تعداد گروهها از آمار توصیفی برای دسته بندی داده ها و برای تجزیه و تحلیل داده ها از آزمون تی- غیر وابسته<sup>۱۴</sup>

### نحوه آماده سازی بافتها و روش های تعیین غلظت نسفاتین، گلیکوژن و ATP بافت هیپوتالاموس

ابتدا نمونه هیپوتالاموس (۲۰-۱۵ میلی گرم) در ۰/۲ میلی لیتر بافر فسفات سالین (PBS ۰/۱ مولار)، توسط دستگاه هموژنایزر (Potter Elvehjem) به مدت ۶ ثانیه نمونه با سرعت ۸۰۰ دور در دقیقه سرد شده با یخ، همگن شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه نمونه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه سلسیوس، سانتریفیوژ گردید. پس از آن مایع رویی جدا گشته و جهت اندازه گیری گلیکوژن، ATP و نسفاتین-۱ مورد استفاده قرار گرفت.

غلظت نسفاتین-۱ با استفاده از کیت مخصوص اندازه گیری نسفاتین-۱ به روش الیزا<sup>۱۲</sup> و بر اساس دستورالعمل کارخانه ی سازنده ی کیت (Wuhan, P.R، چین) تعیین گردید. یافته های آزمایش

<sup>13</sup> Bioluminescence

<sup>14</sup> Independent t-test

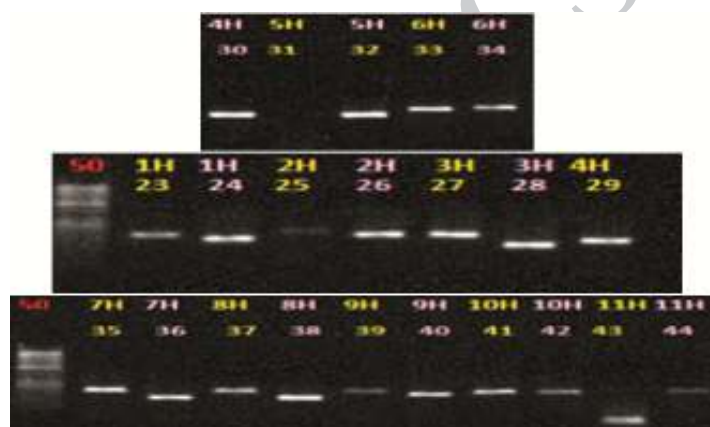
<sup>12</sup> ELISA

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

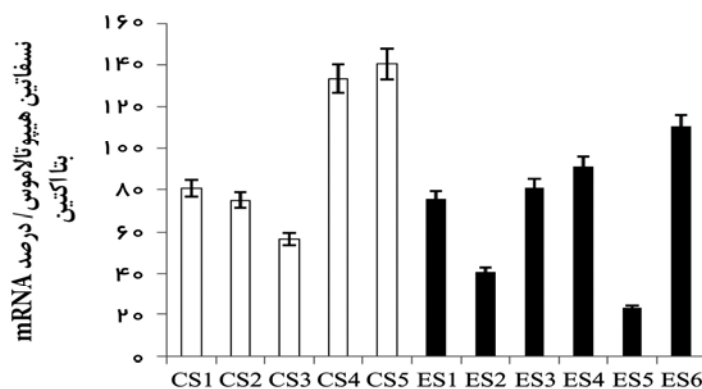
استفاده شد. لازم به‌ذکر است نتایج به‌صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شده است. برای محاسبه داده‌ها از نرم‌افزار SPSS (USA, IL, Chicago, Inc) ویرایش ۱۵ استفاده شد. اختلاف معنی‌داری آماری در سطح  $P < 0.05$  تعیین گردید.

### یافته‌ها

در این مطالعه بیان ژن نسفاتین-۱ بر روی ژل آگاروز در شکل ۱ آورده شده است. تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از آن نشان داد که مقدار بیان نسفاتین-۱ هیپوتالاموس در



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



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

جدول ۲) تغییرات نسفاتین-۱ و سایر متغیرهای پژوهش در گروه‌های تمرین و شاهد

پس از ۸ هفته فعالیت ورزشی

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

اعداد به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند (p&lt;۰/۰۵).

## بحث

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

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

براساس اطلاعات ما تاکنون پژوهشی بر روی تأثیر فعالیت بدنی بر بیان نسفاتین-۱ و غلظت آن در بافت‌های مختلف انجام نشده است. در تنها پژوهش

چاپ شده که بر نمونه انسانی انجام شده، غلظت پلاسمایی نسفاتین به یک دوره فعالیت با شدت کم (فعالیت دایره‌ای بر پایه فنون بوکس چینی (کیک بوکسینگ<sup>۱۵</sup>)) ابتدا افزایشی و سپس کاهش یافته است. اما پاسخ همین پپتید به فعالیت با شدتی بالاتر (رست<sup>۱۶</sup>) ابتدا کاهش و سپس روندی افزایشی داشته است (۱۳). به نظر می‌رسد که شدت فعالیت بدنی عامل قابل ملاحظه‌ای بر پاسخ نسفاتین باشد.

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

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

<sup>15</sup> Kick boxing<sup>16</sup> Running-based anaerobic Sprint Test (RAST)

گلیکوژن و ATP کبد موش‌های تمرین کرده و تمرین نکرده، مشاهده کردند. اتیونین، اتیل آنالوگ متیونین<sup>۲۱</sup> است که تزریق آن به موش، منجر به برهم زدن متابولیسم کبدی و کاهش فعالیت گلوکونئوز<sup>۲۲</sup> می‌شود که در نتیجه آن، گلوکاگون<sup>۲۳</sup> پلاسما، مصرف غذا و لیپید پلاسما افزایش می‌یابد. به دنبال تزریق اتیونین سطح پلاسمایی گرلین (پپتید اشتها آور) در مقایسه با ابستاتین<sup>۲۴</sup> (پپتید ضد اشتها) افزایش معنی‌داری نشان داده است (۲۱).

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

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

بیان شده است که کاهش ذخایر گلیکوژن سبب

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

بررسی‌ها از کاهش معنی‌دار سطوح ATP و گلیکوژن در کبد و عضله اسکلتی و نیز کاهش برخی پپتیدهای مهم در تنظیم انرژی از قبیل گرلین<sup>۱۷</sup>، AgRP<sup>۱۸</sup> و NPY<sup>۱۹</sup> متعاقب یک جلسه فعالیت هوازی و یا فعالیت بی‌هوازی در موش‌های ناشتا و سیر حکایت دارد (۲۳-۲۶). هوکتون (Houghton) و همکاران نشان دادند که ۱۰ دقیقه دویدن با شدت ۲۷ متر در دقیقه منجر به کاهش ۴۰ و ۲۵ درصدی در سطوح ATP کبد موش‌های ماده تمرین نکرده و کرده ناشتا (۴۸ ساعت) گردید (۲۷).

قنبری‌نیاکی و همکاران (۲۰۱۰) به دنبال تزریق یک نوبت محلول اتیونین<sup>۲۰</sup>، کاهش فراوانی در سطوح

<sup>21</sup> Methionine

<sup>22</sup> Gluconeogenesis

<sup>23</sup> Glucagon

<sup>24</sup> Obestatin

<sup>17</sup> Ghrelin

<sup>18</sup> Agouti-Related Protein

<sup>19</sup> Neuropeptide Y

<sup>20</sup> Ethionine



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

#### سپاس و قدردانی

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

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

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

اگر چه براساس نتایج پژوهش حاضر نمی‌توان با قطعیت بر تأثیر تحلیل منابع انرژی بر بیان و غلظت

#### References:

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

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

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

Archive of SID

Original Article

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

A. Ghanbari-Niaki<sup>1</sup>, F. Hosseinpour<sup>2</sup>, R. Fathi<sup>1</sup>, A. Safai-Kenari<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Exercise Biochemistry, Faculty of Physical Education & Sport Sciences, University of Mazandaran, Mazandaran, IRAN

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

*Abstract*

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

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

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

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

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

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