

تأثیر تمرین استقامتی شدید بر بیان ژن گرلین (آسیل‌دار) عضله و تغییر سطح سرمی آن در موش‌های صحرایی نر

دکتر رزیتا فتحی^۱، دکتر عباس قنبری نیاکی^۱، دکتر فاطمه رهبری‌زاده^۲، دکتر مهدی هدایتی^۳، احسان قهرمانلو^۴،
زهرا فرشیدی^۴

(۱) دانشکده‌ی تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه مازندران؛ (۲) گروه بیوتکنولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران؛ (۳) مرکز تحقیقات پیشگیری و درمان چاقی، پژوهشکده‌ی علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید بهشتی؛ (۴) گروه تربیت بدنی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس؛
نشانی مکاتبه‌ی نویسنده‌ی مسئول: بابلسر، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی مازندران، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزش، دکتر عباس قنبری نیاکی؛ e-mail: ghanbara@yahoo.ca

چکیده

مقدمه: گرلین یک پپتید ترشح شده از معده است و نقش مهمی در تعادل انرژی، چاقی و رفتار دریافت غذا ایفا می‌کند. این پپتید باعث افزایش اشتها دریافت غذا، و اکتساب وزن می‌شود. هدف از اجرای این پژوهش بررسی اثر یک دوره تمرین استقامتی با شدت بالا بر بیان ژن گرلین در عضله‌ی دوقلو و سرم موش‌های صحرایی نر. مواد و روش‌ها: به این منظور، ۲۰ سر موش نر صحرایی نژاد ویستار با شرایط وزنی و سنی مشابه انتخاب و به طور تصادفی در ۲ گروه مورد و شاهد تقسیم شدند. گروه مورد با شدت ۳۴ متر در دقیقه (معادل $Vo2\ max/85$)، هر جلسه به مدت ۶۰ دقیقه، ۵ روز در هفته و در مجموع به مدت ۱۲ هفته به تمرین روی نوار گردان پرداختند. ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه‌ی تمرین و پس از یک شب کامل ناشتایی، موش‌ها بیهوش شدند و نمونه‌گیری خونی و بافت‌برداری انجام شد. برای اندازه‌گیری بیان ژن گرلین از روش RT-PCR و برای اندازه‌گیری گرلین پلاسما از روش الایزا (ELISA) استفاده شد. یافته‌ها: این پژوهش نشان داد که تمرین طولانی مدت با شدت بالا موجب افزایش بیان ژن گرلین در عضله‌ی دوقلو و افزایش سطح سرمی گرلین شد که این افزایش نسبت به گروه شاهد معنی‌دار بود. همچنین گلیکوژن عضله‌ی دوقلو و کبد در گروه مورد نسبت به گروه شاهد کاهش یافت. نتیجه‌گیری: نتیجه‌ی این پژوهش از نقش گرلین در تعادل و هموستاز انرژی سلول حکایت دارد، به طوری که تمرین باعث کاهش سطح ذخایر انرژی سلول عضله و کبد می‌شود در پاسخ به کمبود انرژی، ترشح گرلین افزایش می‌یابد تا رفتار دریافت غذا را تحریک، منابع از دست رفته‌ی انرژی را تأمین و تعادل انرژی را دوباره برقرار کند. این امر به نوبه‌ی خود باعث یک پراشتهایی موضعی در عضله می‌شود که به موجب آن، بیان ژن مذکور افزایش می‌یابد تا با اثر بر مراکز اصلی تنظیم تعادل انرژی به باز یافت و تأمین انرژی کمک نماید.

واژگان کلیدی: گرلین آسیل‌دار، تمرین (با شدت بالا)، عضله‌ی دو قلو، گلیکوژن، موش‌های صحرایی

دریافت مقاله: ۸۶/۱۰/۲۲ - دریافت اصلاحیه: ۸۷/۲/۲۵ - پذیرش مقاله: ۸۷/۳/۱۳

مقدمه

مورد علاقه‌ی پژوهشگران در حوزه‌ی فیزیولوژی ورزش،
فارماکولوژی، پاتولوژی و بهداشت بوده و می‌باشد.^{۱-۵}

موضوع‌هایی مانند تعادل بیرونی و درونی انرژیⁱ، تنظیم وزن، رفتار دریافت غذاⁱⁱ و هزینه‌کرد انرژیⁱⁱⁱ همواره مهم و

ii -Food Intake Behavior

iii -Energy Expenditure

i -Energy Homostasis

معادله‌ی انرژیⁱ را می‌توان پایه‌ی این مباحث دانست که براساس آن همواره باید تعادلی بین دریافت و هزینه‌کرد انرژی وجود داشته باشد تا وزن طی یک دوره‌ی زمانی نسبت طولانی ثابت باقی بماند. در غیر این صورت این موازنه به هم خورده، اضافه یا کاهش وزن رخ خواهد می‌دهد.^{۴-۶}

گرلین یک پپتید اشتها آور است که نقش کلیدی و مهمی در تنظیم تعادل انرژی به عهده دارد. این پپتید ۲۸ اسید آمینه‌ای نخستین بار در سال ۱۹۹۹ توسط کوجی‌ما و همکاران^{۱۷} به جهان پپتیدها معرفی شد. گرلین به طور عمده از معده^۸ و از سلول‌های غده‌ی اکسینتیک موکوس فوندوسⁱⁱ ترشح می‌شود. البته گرلین به مقادیر زیاد در روده‌ی کوچک، بیضه‌ها، هیپوفیز و بافت‌های متعدد دیگر نیز مشاهده شده است.^۷ گرلین در خون به دو شکل متفاوت: آسیل‌دارⁱⁱⁱ (ان-اُکتانویل^{iv}) و بدون آسیل^v وجود دارد^۱ که قسمت اعظم گرلین موجود در خون (۹۰-۸۰٪) گرلین بدون آسیل است.^{۱۷،۸} شکل آسیل‌دار آن از نظر زیستی فعال بوده، از اهمیت ویژه‌ای در تنظیم و تعادل انرژی برخوردار است. همچنین به نظر می‌رسد که گرلین در شکل آسیل‌دارش برای رهایش هورمون رشد ضروری است. با وجود این برای شکل غیر آسیلی گرلین نیز وظایفی مانند حفظ و ادامه‌ی حیات دستگاه قلبی - عروقی قایلند.^۷

در پژوهش‌ها نشان داده شده که این پپتید از طریق فیدبک معده‌ای - مغزی موجب تنظیم هورمون رشد و تعادل انرژی می‌شود.^{۹،۱۰} گرلین باعث افزایش اشتها، دریافت غذا و اکتساب وزن می‌شود و نقش کلیدی در تنظیم مرکزی اشتها دارد.^{۱۱،۱۲} مطالعه‌ها نشان داد که سطح سرمی گرلین در برخی شرایط تغذیه‌ای و تعادل انرژی تغییر می‌کند. در حقیقت سطح سرمی گرلین در شرایط تعادل مثبت انرژی کاهش و در شرایط تعادل منفی انرژی افزایش می‌یابد.^{۱۲،۱۳} به طور مثال سطح سرمی گرلین در چاقی مزمن، پس از تزریق انسولین، بعد از دریافت غذا و پس از مصرف مواد قندی (گلوکز و فروکتوز) کاهش و در مواردی از قبیل سوءتغذیه، محرومیت غذایی، کاهش قندخون، کم‌وزنی مزمن و کاهش

وزن (تغذیه‌های یا ترکیب غذایی و تمرین بدنی) افزایش می‌یابد.^{۱۴،۱۵} تعادل انرژی سلولی می‌تواند از عوامل مختلفی مانند تمرین و فعالیت بدنی متأثر شود. تمرین با ایجاد تغییرات متابولیک از طریق بر هم زدن شارژ انرژی سلولی تقاضای سوخت سلول را در جهت تأمین انرژی مورد نظر برای ادامه‌ی حیات سلول افزایش می‌دهد. بافت‌های مختلف بدن هر یک به شکلی در این فرایند دخالت دارند اما با توجه به این‌که عضله‌ی اسکلتی از نظر سوخت و ساز بافتی، بسیار فعال است و بیش از ۴۰٪ وزن انسان و اغلب پستانداران را تشکیل می‌دهد از این منظر منحصر به فرد است.

در خصوص این هورمون و فعالیت بدنی تحقیقاتی انجام شده که اغلب آن‌ها سطح سرمی گرلین را بررسی کرده‌اند. در این پژوهش‌ها یافته‌های ضد و نقیضی در خصوص پاسخ گرلین به تمرین ورزشی به دست آمده است، به گونه‌ای که در برخی از پژوهش‌ها میزان گرلین پلاسمایی افزایش و در برخی دیگر کاهش یافته بود.^{۱۶-۲۳} تحقیقات گذشته اغلب پاسخ تمرین کوتاه مدت را بر سطح سرمی گرلین بررسی کرده‌اند^{۲۴-۲۶} و مطالعه‌های کمی برای بررسی اثر متقابل تمرین طولانی مدت و پاسخ سطح سرمی گرلین در انسان^{۲۷،۲۸} انجام شده است. لیدی^{vi} و همکاران^{۲۵} تغییرات گرلین را در طول ۳ ماه در زنانی که فعالیت بدنی انجام دادند، بررسی کردند. در آن مطالعه، افرادی که کاهش وزن داشتند در مقایسه با افرادی که وزنشان تغییر نکرده بود، میزان گرلین سرمی بیشتری داشتند. فوستر شوبرت و همکاران^{vii} نیز تأثیر ۱۲ ماه فعالیت بدنی هوازی را در ۱۷۳ زن یائسه‌ی فاقد فعالیت بدنی استقامتی که دارای اضافه وزن بودند، بررسی کردند. آن‌ها مشاهده نمودند در افرادی که بیش از ۳ کیلوگرم کاهش وزن داشتند، سطح سرمی گرلین به میزان ۱۸٪ افزایش می‌یابد.^{۲۷} ایبال و همکاران^{viii} نیز تأثیر ۵ هفته تمرین مقاومتی را بر سطح سرمی گرلین موش‌های صحرایی بررسی کردند. آن‌ها گزارش کردند که موجب کاهش وزن به میزان ۴/۶٪ و کاهش سطح سرمی گرلین می‌شود.^{۲۶} به هر حال تا کنون میزان سطوح گرلین به دنبال فعالیت بدنی طولانی با شدت بالا انجام نشده است. با توجه به نقش کلیدی و مهم این پپتید در هموستاز و تنظیم وزن ضرورت دارد که

i -Energy Equilibrium

ii- Fundus Mucosa

iii- Acylated

iv -N-octanoylated

v-Unacylated (des-acylated)

vi- Leidy et al

vii- Foster-Schubert et al

viii- Ebal et al

تأثیر تمرین به عنوان یک عامل مهم و اثر گذار بر تعادل انرژی و تنظیم وزن علاوه بر سطح سرمی در سطح ژنومیک نیز بررسی شود.

امروزه به خوبی پذیرفته شده است که تمرین‌های استقامتی سبب کاهش وزن می‌شوند. بنابراین بر پایه‌ی آنچه درباره‌ی گرلین و تمرین در خصوص تعادل انرژی و تنظیم وزن گفته شد، این پژوهش انجام شد تا نشان دهد که آیا تمرین استقامتی می‌تواند به عنوان یک محرک تغییراتی را در mRNA گرلین در بافت عضله اسکلتی و سطح سرمی گرلین موجب شود؟ پاسخ‌گویی به این سؤال با مطالعه‌ی بیان ژن در سطح mRNA (یعنی اولین سطحی که تغییرات در آن روی می‌دهد) و سطح سرمی آن می‌تواند میسر شود.

مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر، ۲۰ سرموش صحرایی نر نژاد ویستار از «موسس سرم سازی رازی کرج» خریداری شد. آزمودنی‌ها پس از ۳ روز آشنایی با محیط آزمایشگاه و آشنایی با محیط جدید و نحوه‌ی فعالیت روی نوارگردان به طور تصادفی به دو گروه کنترل و تمرینی تقسیم شدند. حیوانات در دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و چرخه‌ی محیطی روشنایی به تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت و رطوبت ۵٪ نگهداری شدند.

غذای آزمودنی‌های این پژوهش، تولید شرکت خوراک دام پارس بود که بر اساس وزن‌کشی 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.

از آنجا که انتقال حیوانات باعث استرس و در نتیجه تغییر شرایط فیزیولوژیکی در آن‌ها می‌شود، حیوانات پس از انتقال از مرکز پرورش و تکثیر به محیط پژوهش، به مدت ۲ هفته تحت شرایط جدید نگهداری شدند. در هفته‌ی دوم، همه‌ی حیوانات با نحوه‌ی فعالیت روی نوارگردان آشنا شدند. نوار گردان ویژه‌ی موش‌های صحرایی، ساخت ایران، دارای ۱۰ محفظه‌ی شیشه‌ای از جنس پلکسی‌گلاس و به ابعاد طول ۹۰ سانتی‌متر، عرض ۱۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۱۵ سانتی‌متر دارای شوکر دستی و اتومات، شیب مثبت و منفی قابل تنظیم، دارای صفحه‌ی نمایشگر سرعت، مسافت، زمان و

ولتاژ شوکر). برنامه‌ی آشنایی شامل ۵ جلسه راه رفتن و دویدن با سرعت ۵ تا ۸ متر در دقیقه و شیب صفر و به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه بود. برای تحریک به دویدن، شوک الکتریکی ملایمی در عقب دستگاه تعبیه شد. برای جلوگیری از اثر احتمالی شوک الکتریکی بر یافته‌های پژوهش، در مرحله‌ی آشناسازی حیوانات با فعالیت روی نوارگردان، به روش شرطی‌سازی با صدا به حیوانات آموزش داده شد تا از نزدیک شدن و استراحت در بخش انتهایی دستگاه خودداری کنند.

طول دوره‌ی تمرینی موش‌ها ۱۲ 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 ۱۰ متر در دقیقه بر روی نوار گردان راه رفتند.

مرحله‌ی دوم (مرحله‌ی اضافه‌بار): در این مرحله موش‌ها ابتدا به مدت ۱۵ دقیقه و با سرعت ۱۲ متر در دقیقه روی نوار گردان راه رفته و به تدریج در طول مدت ۲ هفته، شدت فعالیت افزایش یافت تا به میزان نهایی تعیین شده برای هر گروه برسد و زمان فعالیت نیز به ۶۰ دقیقه در روز افزایش یافت.

مرحله‌ی سوم (مرحله‌ی حفظ یا تثبیت): طی این مرحله موش‌ها به مدت ۹ هفته با تمرین با شدت متوسط معادل ۳۴ متر در دقیقه (معادل $85\% \text{V}_{O_2 \text{ max}}$) به مدت ۶۰ دقیقه بر روی نوار گردان دویدند. به علاوه، از مجموع زمان فعالیت، ۵ دقیقه برای گرم کردن و ۵ دقیقه برای سردکردن موش‌ها در نظر گرفته شد.

پس از اتمام دوره‌ی تمرین، گروه مورد و کنترل پس از یک شب ناشتایی (۱۲ ساعت) و ۳۶ ساعت پس از آخرین نوبت تمرینی با ترکیبی از کتامینⁱ (۳۰-۵۰ mg/Kg) و زایلازینⁱⁱ (۳-۵ mg/Kg) بیهوش شدند. سپس خون موش‌ها به طور مستقیم از طریق قلب تهیه شد و در لوله‌های حاوی EDTA ریخته و به سرعت سانتریفوژ (۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰) و برای اندازه‌گیری بعدی در فریزر -۸۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

i- Ketamine
ii- Xylazine

-Reverse: 5'-ATC GTG CAC CGC β - actin
AAA TGC TTC-3'.

بود و یک قطعه‌ی ۳۱۵ جفت بازی از ژن بتا اکتین را تکثیر می‌کنند. بتا اکتین یک ژن همیشه بیان‌شونده^{vi} است و می‌تواند شاهد خوبی برای بررسی کل فرایند تخلیص mRNA باشد. مراحل PCR شامل ۳۰ تکرار از سه مرحله‌ی (۱) دناتوراسیون^{vii} ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (۲) دمای جفت شدن^{viii} ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و (۳) دمای طویل شدن^{ix} ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه بود.

برای به دست آوردن بهترین غلظت cDNA الگو، غلظت‌های مختلف از cDNA بررسی و در نهایت بهترین غلظت برای PCR نهایی به کار گرفته شد. آزمون‌های این مطالعه حداقل سه بار تکرار شد. بررسی نیمه کمی باندها با کمک دانسیومتر کامپیوتری (Kodak, CT) انجام و سطح بیان mRNA نسبت به بیان ژن بتا اکتین محاسبه شد.

محاسبه‌های آماری توسط نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۳ انجام شد. از آمار توصیفی برای دسته‌بندی داده‌ها و برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون تی مستقل استفاده شد. اختلاف معنی‌داری آماری در سطح $p \leq 0.05$ تعیین شد.

یافته‌ها

در این مطالعه تغییرات مربوط به سطح سرمی و بافتی و در نمودار ۱ آورده شده است. همان گونه که در نمودار مذکور مشاهده می‌شود میزان غلظت گرلین سرم و بافت در گروه تمرین کرده به طور معنی‌داری افزایش یافته است. در نمودار ۲ نیز مشاهده می‌شود که تغییرات گلیکوژن عضله دو قلو و کبد در گروه تمرین کرده به طور معنی‌داری کاهش یافته است.

همچنین در نمودار ۱ مشاهده می‌شود که بیان ژن گرلین در عضله‌ی دو قلو گروه تمرین کرده افزایش یافته است. به عبارت دیگر، ژن گرلین در نتیجه‌ی تمرین، دچار افزایش تظاهر شده است.

غلظت گرلین سرم با استفاده از کیت مخصوص اندازه‌گیری گرلین آسیل‌دار به روش الایزا و بر اساس دستورالعمل کارخانه‌ی سازنده‌ی کیت (SPI-BIO، فرانسه) تعیین شد. گلیکوژن نیز با استفاده از کیت Glycogen Colorimetric kit, Nanjing) چین) اندازه‌گیری شد. یافته‌های آزمایش‌ها توسط دستگاه خوانش الایزا (Ststfax، آمریکا) بررسی شد.

مقدار ۵۰ میلی‌گرم از بافت منجمد عضله با روش هموژنیزه کردن سرد پودر و برای تخلیص mRNA استفاده شد. با استفاده از روش گوانیدینیوم تیوسیاناتⁱ، RNA بافتی محافظت و جداسازی شد و به منظور جداسازی mRNA، کیت تخلیص mRNA شرکت Roche که با استفاده از ذرات مغناطیسیⁱⁱ پوشیده شده با اولیگو dTⁱⁱⁱ با درجه‌ی خلوص بالا و کیفیت مناسب، قادر به جداسازی mRNA است، طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. از هر یک از موش‌ها، یک میکروگرم mRNA برای سنتز اولین رشته cDNA به کار رفت. در این مطالعه برای ساخت cDNA از آغازگر (پرایمر^{iv}) اولیگو dT که مکمل دم‌های Poly A در mRNA است و دمای ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک ساعت استفاده شد. کیت مزبور از شرکت Fermentase آلمان خریداری شده بود. سطح نسبی mRNA ژن گرلین در عضله با روش RT-PCR نیمه کمی^v اندازه‌گیری شد. این روش به کمک پرایمرهای ویژه‌ی گرلین شامل

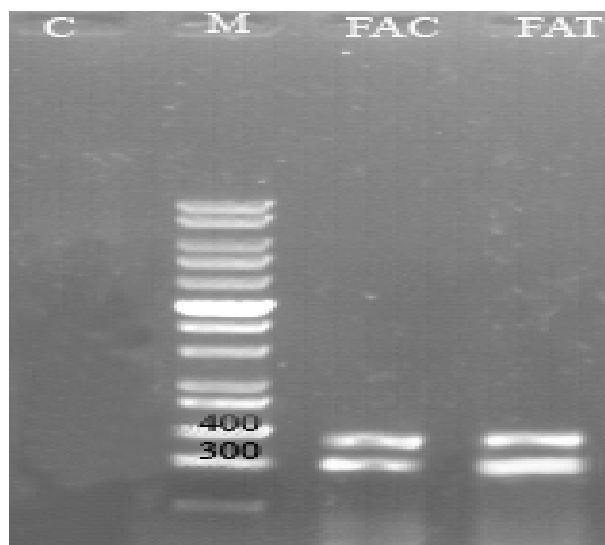
ghrelin-Forward: 5'-
TTGAGCCCAGAGCACCAGAAA
ghrelin-Reverse: 5'-ACT TGT TAG CTG
GCG CCT CTT TG-3'

که یک قطعه‌ی ۳۴۶ جفت بازی را در این ژن تکثیر می‌کنند، انجام شد. پرایمرهای ویژه‌ی β -actin برای تکثیر این ژن به عنوان کنترل به کار رفت. این پرایمرها شامل

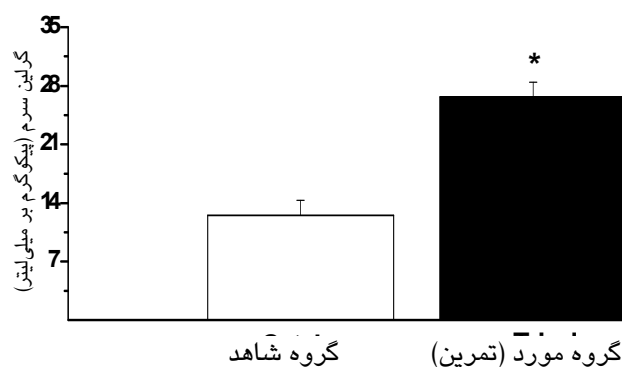
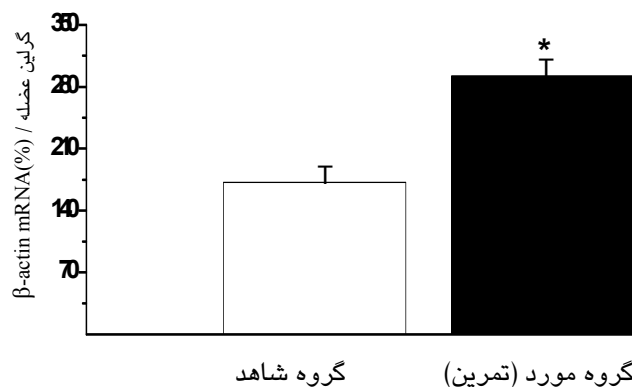
-Forward: TCC TGT GGC ATC β - actin
CAT GAA ACT-3'

vi - House keeping gene
vii-Denaturation
viii-Annealing
ix -Extension

i - Guanidinium thiocyanate method
ii -Magnetic particles
iii - Oligo (dT)
iv -Primer
v -Semiquantitative PCR



شکل ۱- بیان ژن گرلین روی ژل آگاروز: از چپ به راست، ستون M مارکر (Ladder)، ستون مربوط به گروه‌های شاهد و ستون مربوط به گروه‌های مورد (تمرینی) است.



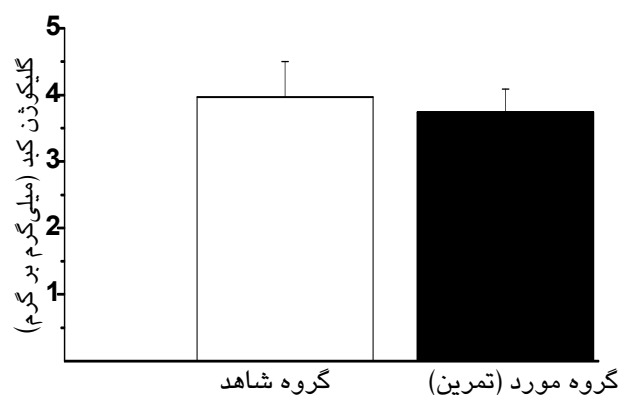
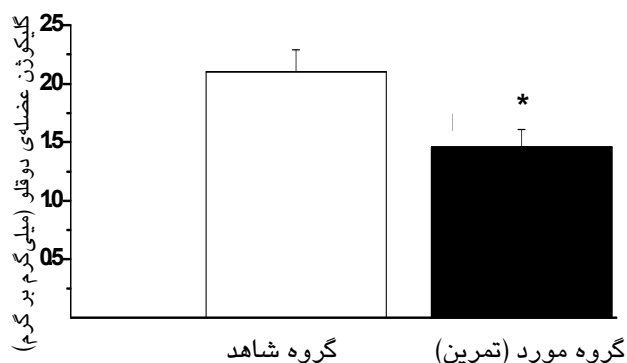
نمودار ۱- تغییرات بیان ژن گرلین عضله‌ی دو قلو و تغییرات

گرلین سرم در گروه مورد (تمرینی) و شاهد * $p < 0.01$

بحث

هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی اثر ۱۲ هفته تمرین استقامتی با شدت ۳۴ متر در دقیقه روی نوار گردان بر بیان ژن گرلین (آسیل‌دار) عضله‌ی دو قلو و تغییرات سطح سرمی گرلین بود. یافته‌ها از افزایش بیان ژن گرلین آسیدل‌دار و همچنین افزایش مقدار گرلین آسیدل‌دار سرم متعاقب تمرین استقامتی شدید بود. علاوه بر تغییرات فوق کاهش معنی‌داری در ذخیره‌ی گلیکوژن عضله‌ی دو قلو را می‌توان ذکر کرد. تغییرات گلیکوژن کبد نیز اگرچه تمایل به کاهش داشت، این کاهش از نظر آماری معنی‌داری نبود.

بررسی‌ها نشان می‌دهد که ناشتایی یکی از عوامل مؤثر در ایجاد تعادل منفی انرژی است و در تحریک پپتیدهای اشتهاآور مانند گرلین نقش دارد. ناشتایی و مواردی از قبیل سوءتغذیه، کاهش قندخون، کم‌وزنی مزمن، کاهش وزن (متعاقب رژیم غذایی)، بولیمیا، فعالیت بدنی و تمرین‌های ورزشی سطح گرلین تام را افزایش می‌دهند. در پژوهش حاضر نیز مشاهده شد که گرلین سرم موش‌ها متعاقب ناشتایی در گروه مورد افزایش



نمودار ۲- تغییرات گلیکوژن عضله‌ی دو قلو و کبد در گروه مورد (تمرینی) و شاهد * $p < 0.01$

یافت. همچنین در پژوهش‌هایی که به بررسی اثر فعالیت بدنی بر تغییرات سطوح گرلین سرم پرداخته‌اند، یافته‌های متناقضی در خصوص گرلین سرم به دست آمده است. در برخی از مطالعه‌ها میزان گرلین پلاسمایی افزایش^{۲۳،۲۱} و در برخی دیگر کاهش یافته بود.^{۲۴،۲۶} یافته‌های مطالعه‌ها گذشته اغلب پاسخ گرلین را در یک جلسه فعالیت مورد ارزیابی قرار دادند.^{۲۴،۲۹} همچنین اطلاعات بسیار کمی درباره‌ی تأثیر یک دوره‌ی تمرین (کوتاه یا طولانی‌مدت) بر پاسخ سطح سرمی گرلین^{۲۵،۲۷} موجود است. با این حال طبق بررسی‌های محققان پژوهش حاضر تاکنون پژوهشی در خصوص این شدت و با این دوره‌ی تمرینی انجام نشده است. در واقع این پژوهش برای اولین بار به بررسی تأثیر تمرین طولانی‌مدت با شدت بالا بر تغییرات غلظت گرلین پرداخته است، با این وجود به نظر می‌رسد که پاسخ گرلین به تمرین‌های مختلف بدنی (حاد و مزمن) با روش‌های مختلف تمرینی متفاوت باشد و احتمالاً حجم تمرین می‌تواند نقش بسیار مهمی در این زمینه ایفا داشته باشد.

یکی دیگر از سازوکارهایی که در خصوص گرلین سرم می‌توان به آن اشاره کرد بحث در مورد تنظیم متابولیسم انرژی است. بررسی‌ها نشان می‌دهند که تمرین‌های ورزشی طولانی مدت با کاهش گلیکوژن و ATP عضله و کبد همراه است.^{۳۲} بنابراین تمرین و فعالیت بدنی تعادل و هموستاز انرژی در داخل سلول عضلانی را به هم زده، تقاضای انرژی سلول را افزایش می‌دهد به طوری که بیان شده در تمرین‌های طولانی‌مدت با شدت ۶۰ تا ۸۰٪ VO_{2max} ، به ویژه اگر به مدت یک یا چند هفته تکرار شوند، ذخایر انرژی سلول (شامل ATP و گلیکوژن) دچار کاهش و تخلیه می‌شوند. در واقع از دیگر دلایل احتمالی بالا بودن گرلین سرم می‌تواند ایجاد تعادل منفی انرژی ناشی از ناشتایی به علاوه، تمرین باشد. ترکیب این دو عامل شارژ انرژی سلولی را تغییر داده و روند کاتابولیسم را با توجه به نظریه‌ی آتکینسون (۱۹۷۷) و عطا الاخانوف و ویتویتسکی (۲۰۰۲) افزایش می‌دهد. این امر به نوبه‌ی خود کاهش ATP سلول و متعاقب آن تحلیل منابع انرژی لازم در بازسازی را موجب می‌شود.^{۲۱،۳۳-۳۷} از طرفی دیگر بررسی‌های انجام شده با استفاده از عوامل کاهنده‌ی ATP کبدی (اتیونین، دی‌ال فروکتوز و ۲-۵ دی آنیدرو دی مانیتول) نشان داده که رفتار دریافت غذا و پپتیدهای اشتهاآور در موش‌ها افزایش می‌یابد^{۳۳} که علت آن هم در مورد کاهش ATP، از دست دادن

مداوم پورین‌ها از عضله عنوان شده است.^{۳۲} در این مطالعه کاهش معنی‌داری در میزان گلیکوژن عضله‌ی دوقلو گروه مورد (تمرینی) در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد. کاهش گلیکوژن عضلانی در اثر چنین شدت تمرینی که یک تمرین استقامتی با شدت بالا تلقی می‌شود می‌تواند تعادل منفی انرژی در عضله را نشان دهد. احتمالاً تغییر در تعادل انرژی و تخلیه‌ی گلیکوژن و عدم بازسازی کامل ذخیره‌ی مرتبط با ساخت ATP موجب ترشح گرلین و افزایش رفتار دریافت غذا و جبران ذخایر از دست‌رفته‌ی گلیکوژن می‌شود. نتیجه‌ی این اطلاعات در مجموع نظریه‌ی تخلیه‌ی ذخایر انرژی و افزایش گرلین را تأیید می‌کند. گزارش‌های تحقیقی مرتبط با بیان ژن گرلین حاکی از آن است که این پپتید در گونه‌های مختلف جانوران در بافت‌هایی مثل آدرنال، کبد، بیضه و عضله بیان می‌شود.^{۳۰} از طرفی پژوهش‌ها نشان داده‌اند که بیان این ژن در هسته‌های کمانی هیپوتالاموس در شرایطی مانند گرسنگی و تحلیل انرژی افزایش یافته، می‌تواند در سرم نیز تظاهر یابد.^{۳۰} در مورد اثر تمرین بر تظاهر ژن گرلین می‌توان گفت که شاید پس از تمرین گرلین شروع به افزایش می‌کند تا با سرکوب هزینه‌ی انرژی اضافی پس از تمرین روند کاتابولیسم متعاقب تمرین را متوقف کرده و شرایط را برای آنابولیسم فراهم کنند. با این کار ذخایر انرژی از دست رفته در تمرین شروع به جبران و بازسازی می‌شود و این کار به بازسازی ذخایر کربوهیدرات کمک خواهد کرد. بنابراین مطالعه‌ی حاضر برای اولین بار نشان داد که تمرین استقامتی روی نوار گلان باعث افزایش تظاهر ژن گرلین در عضله‌ی اسکلتی و افزایش سطح سرمی گرلین موش‌های نر صحرایی می‌شود. البته با توجه به شدت تمرین به کار رفته و همچنین متوالی بودن روزهای تمرین از یک طرف، و کوتاه بودن فاصله‌ی آخرین جلسه‌ی تمرین و کشتن موش‌ها از طرف دیگر، که احتمالاً باز یافت کامل ذخایر انرژی عضله را با تأخیر مواجه می‌سازد، انتظار می‌رود چنانچه تمرین از شدت یا حجم کمتری برخوردار باشد و یا اینکه فاصله‌ی آخرین جلسه تمرین و کشتن موش‌ها زیاده‌تر باشد، شاهد رفتار متفاوتی از گرلین باشیم، که خود ادامه‌ی تحقیق در این زمینه را ایجاب می‌کند.

نتیجه‌ی مطالعه‌ی حاضر نشان داد که احتمالاً تمرین باعث تعادل منفی انرژی در بدن موش صحرایی می‌شود و در پاسخ به کمبود انرژی، گرلین ترشح شده تا رفتار دریافت غذا را تحریک، منابع از دست رفته انرژی را تامین و تعادل

نظریه‌ی تخلیه‌ی ذخایر انرژی و افزایش گرلین را تأیید می‌کند.

انرژی را دوباره برقرار نماید. این افزایش گرلین می‌تواند موجب توقف روندهای کاتابولیک متعاقب تمرین و احتمالاً فرا جبرانی گلیکوژن شود. نتیجه‌ی این اطلاعات در مجموع

References

- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth hormone releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402: 656-60.
- Shrestha YB, Wickwire K, Giraudo SQ. Role of AgRP on Ghrelin-induced feeding in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Regul Pept* 2006; 133: 68-73.
- Schwartz MW, Woods SC, Potre Jr D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000; 404: 661-71.
- Wynne K, Stanley S, McGowan B, Bloom S. Appetite control. *J Endocrinol* 2005; 184: 291-318.
- Woods SC, Benoit SC, Clegg DJ, Seeley RJ. Regulation of energy homeostasis by peripheral signals. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2004; 18: 497-515.
- Sainsbury A, Cooney GJ, Herzog H. Hypothalamic regulation of energy homeostasis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2002 16: 623-7.
- Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, Dezaki K, Mondal MS, Hosoda H, et al. Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of human and rat stimulates insulin secretion. *Diabetes* 2002; 51: 124-9.
- St-Pierre DH, Wang L, Taché Y. Ghrelin: a novel player in the gut-brain regulation of growth hormone and energy balance. *News Physiol Sci* 2003; 18: 242-6.
- Arosio M, Ronchi CL, Gebbia C, Cappiello V, Beck-Peccoz P, Peracchi M. Stimulatory effects of ghrelin on circulating somatostatin and pancreatic polypeptide levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 701-4.
- Broglio F, Arvat E, Benso A, Gottero C, Muccioli G, Papotti M, et al. Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in human. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5083-6.
- Broglio F, Benso A, Castiglioni C, Gottero C, Prodam F, Destefanis S, et al. The endocrine response to ghrelin as a function of gender in humans in young and elderly subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 1537-42.
- Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, et al. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001; 409: 194-8.
- Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, et al. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in human. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4753-8.
- Hansen TK, Dall R, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Christiansen JS, et al. Weight loss increases circulating levels of ghrelin in human obesity. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002; 56: 203-6.
- Espelund U, Hansen TK, Højlund K, Beck-Nielsen H, Clausen JT, Hansen BS, et al. Fasting unmasks a strong inverse association between ghrelin and cortisol in serum: studies in obese and normal-weight subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 741-6.
- Knerr I, Gröschl M, Rascher W, Rauh M. Endocrine effect of food intake: insulin, ghrelin, and leptin responses to a single bolus of essential amino acids in humans. *Ann Nutr Metab* 2003; 47: 312-8.
- Robergs RA, Pearson DR, Costill DL, Fink WJ, Pascoe DD, Benedict MA, et al. Muscle glycogenolysis during differing intensities of weight-resistance exercise. *J Appl Physiol* 1991; 70: 1700-6.
- Nieman DC, Davis JM, Brown VA, Henson DA, Dumke CL, Utter AC, et al. Influence of carbohydrate ingestion on immune changes after 2h of intensive resistance training. *J Appl Physiol* 2004; 96: 1292-8.
- Murakami T, Shimomura Y, Fujitsuka N, Sokabe M, Okamura K, Sakamoto S. Enlargement of glycogen store in rat liver and muscle by fructose-diet intake and exercise training. *J Appl Physiol* 1997; 82: 772-5.
- Houghton CRR, Hawkins AR, Williamson DH, Krebs HA. The effect of physical training on metabolic response to short-term severe exercise in rat. *Biochem J* 1971; 124: 57.
- Dohm GL, Newsholme EA. Metabolic control of hepatic gluconeogenesis during exercise. *Biochem J* 1983; 212: 633-9.
- de Vries WR, Abdesselam SA, Schers TJ, Maas HC, Osman-Dualeh M, Maitimu I, et al. Complete inhibition on hypothalamic somatostatin activity is only partially responsible for the growth hormone response to strenuous exercise. *Metabolism* 2002; 51: 1093-6.
- Dall R, Kanaley J, Hansen TK, Møller N, Christiansen JS, Hosoda H, et al. Plasma ghrelin levels during exercise in healthy subjects and in growth hormone-deficient patients. *Eur J Endocrinol* 2002; 147: 65-70.
- Schmidt A, Maier C, Schaller G, Nowotny P, Bayerle-Eder M, Buranyi B, et al. Acute exercise has no effect on ghrelin plasma concentrations. *Horm Metab Res* 2004; 36: 174-7.
- Leidy HJ, Gardner JK, Frye BR, Snook ML, Schuchert MK, Richard EL, et al. Circulating ghrelin is sensitive to changes in body weight during a diet and exercise program in normal-weight young women. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2659-64.
- Ebal E, Cavalie H, Michaux O, Lac G. Effect of a moderate exercise on the regulatory hormones of food intake in rats. *Appetite* 2007; 49: 521-4.
- Foster-Schubert KE, McTiernan A, Frayo RS, Schwartz RS, Rajan KB, Yasui Y, et al. Human plasma ghrelin levels increase during a one-year exercise program. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 820-5.
- Hansen TK, Dall R, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Christiansen JS, et al. Weight loss increases circulating levels of ghrelin in human obesity. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002; 56: 203-6.
- Ghanbari-Niaki A. Ghrelin and glucoregulatory hormone responses to a single circuit resistance exercise in male college students. *Clin Biochem* 2006; 39: 966-70.
- Ghelardoni S, Carnicelli V, Frascarelli S, Ronca-Testoni S, Zucchi R. Ghrelin tissue distribution: comparison between gene and protein expression. *J Endocrinol Invest* 2006; 29: 115-121.
- Kraemer RR, Castracane VD. Exercise and humoral mediators of peripheral energy balance: ghrelin and

- adiponectin. *Exp Biol Med* (Maywood) 2007; 232: 184-94.
32. Li J, King NC, Sinoway LI. ATP concentrations and muscle tension increase linearly with muscle contraction. *J Appl Physiol* 2003; 95: 577-83.
33. Ghanbari-Niaki A, Désy F, Lavoie JM. Effects of phosphate injection on metabolic and hormonal responses to exercise in fructose-injected rats. *Physiol Behav* 1999; 67: 747-52.
34. 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.
35. Houghton CRR, Hawkins AR, Williamson DH, Krebs HA. The effect of physical training on metabolic response to short-term severe exercise in rat. *Biochem J* 1971; 124: 57.
36. Baldwin KM, Fitts RH, Booth FW, Winder WW, Holloszy JO. Depletion of muscle and liver glycogen during exercise: protective effects of training. *Pflugers Arch* 1975; 354: 203-12.
37. Durand RJ, Castracane VD, Hollander DB, Tryniecki JL, Bamman MM, O'Neal S, et al. Hormonal responses from concentric and eccentric muscle contractions. *Med Sci Sports Exerc* 2003; 35: 937-43.

Original Article

The Effect of Exercise on Plasma Acylated Ghrelin Concentrations and Gastrocnemius Muscle mRNA Expression in Male Rats

Fathi R¹, Ghanbari-Niaki A¹, Rahbarizadeh F², Hedayati M³, Ghahramanloo E⁴, Farshidi Z⁴

¹Faculty of Physical Education & Sport Sciences, Mazandaran University; ²Department of Biotechnology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University (TMU); ³Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University (M.C.), Tehran; ⁴Department of Physical Education & Sports Sciences, Faculty of Humanity, Tarbiat Modares University (TMU); I.R.Iran
e-mail: ghanbara@yahoo.ca

Introduction: Ghrelin is a gut hormone predominantly produced by the stomach and, to a lesser extent, by other regions of the gastrointestinal tract. Ghrelin circulates in the bloodstream in two different forms: acylated (or n-octanoylated) and unacylated (or des-octanoylated or des-acylated). The purpose of this study was to examine the effect of 12 weeks training on plasma acylated ghrelin concentrations and gastrocnemius muscle mRNA expression in male rats. **Materials & Methods:** Twenty adult Wistar male rats (8 weeks old, 280±20 g) were used. Animals were randomly divided into experimental (EX, n = 10, V=34m/min) and control (n=10) groups. Training groups were given exercise on a motor-driven treadmill (0% grade, 60min, and 5 days/week for 12 weeks). Gastrocnemius was excised and frozen in liquid nitrogen for extraction of ghrelin; mRNA and plasma acylated ghrelin, were measured. **Results:** Plasma acylated ghrelin was significantly (P<0.01) higher in high intensity trained rats. Also muscle mRNA expression was higher in trained rats compared to control rats. **Conclusion:** Data indicate that higher ghrelin mRNA expression in muscle and higher plasma acylated ghrelin levels could be attributed to metabolic changes (muscle glycogen and ATP depletion are less in endurance trained species). A higher plasma acylated ghrelin in the present study might be attributed to liver and skeletal muscle glycogen and ATP deficiency and incomplete energy sources recovery after the last exercise session along with overnight fast. Lower muscle glycogen levels, as we observed in the present study, might be considered as stimuli for this elevated plasma acylated ghrelin in trained rats.

Keywords: Acylated ghrelin, High intensity training, Gastrocnemius muscle, Glycogen, Rat.