فیزیولوژی ورزشی شماره۳۲، زمستان ۱۳۹۵. صص ۲۰۰-۱۸۵

تعیین نقش پپتید مرتبط با ژن کلسی تونین در اکسیداسیون چربی حین تمرین استقامتی در رت‌های نر نژاد ویستار

نجمه سادات حسینی[۱]، روح‌الله نیکویی[۲]، داریوش مفلحی[۳]

۱. کارشناس ارشد گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه شهید باهنر کرمان
۲. دانشیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه شهید باهنر کرمان*
۳. استادیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۱۵

چکیده

هدف از پژوهش حاضر، تعیین نقش پپتید مرتبط با ژن کلسی تونین در اکسیداسیون چربی حین تمرین استقامتی در رت‌های نر نژاد ویستار بود. بدین‌منظور، ۳۰ رأس رت نر نژاد ویستار به‌شکل تصادفی به سه گروه کنترل (۱۰ نفر)، تمرینی محض (۱۰ نفر) و تمرین+ CGRP(8-37) (۱۰ نفر) تقسیم شدند. گروه‌های تمرینی محض و تمرین+ CGRP(8-37)، یک جلسه تمرین استقامتی را با سرعت ۲۶ متر بر دقیقه و به‌مدت ۶۰ دقیقه انجام دادند و بلافاصله پس از تمرین، مایع مغزی نخاعی و نمونهٔ خونی آزمودنی‌ها جمع‌آوری گردید. قابل‌ذکر است که پیش از انجام تمرین، گروه تمرین+ CGRP(8-37)، تزریق درون‌صفاقی CGRP(8-37) (منع‌کنندهٔ گیرنده‌های پپتید مرتبط با ژن کلسی تونین) را به‌مقدار (10 µg/kg) دریافت نمودند. شایان‌ذکر است که غلظت پپتید مرتبط با ژن کلسی تونین در مایع مغزی نخاعی و سطوح سرمی آن، غلظت اسید چرب آزاد و تری‌گلیسرید پلاسما با تکنیک الایزا اندازه‌گیری گردید. جهت مقایسهٔ بین گروه‌ها نیز آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌راهه و آزمون تعقیبی توکی مورداستفاده قرار گرفت. یافته‌ها نشان می‌دهند که بلافاصله پس از تمرین، غلظت پپتید مرتبط با ژن کلسی تونین در مایع مغزی نخاعی و سرم در گروه تمرینی صرف ($P<0.01$) و تمرین+ CGRP(8-37) ($P<0.01$) نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری یافته است. علاوه‌براین، سطوح پلاسمایی تری‌گلیسرید کاهش معنادار ($P<0.05$) و اسید چرب آزاد افزایش معناداری ($P<0.01$) را در هر دو گروه تمرینی نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهند. در انتهای جلسهٔ تمرینی نیز تنها مقادیر اسید چرب آزاد در گروه تمرینی محض به‌طور معناداری بالاتر از گروه تمرین+ CGRP(8-37) می‌باشد ($P<0.05$). به‌طورکلی، انجام تمرین استقامتی منجر به افزایش غلظت پپتید مرتبط با ژن کلسی تونین سرم و مایع مغزی که عامل دخیل در آزادسازی اسید چرب آزاد حین تمرین استقامتی است می‌باشد.

واژگان کلیدی: پپتید مرتبط با ژن کلسی تونین، تمرین استقامتی، متابولیسم چربی، هموستاز انرژی

* نویسندهٔ مسئول Email: r_nikooie@uk.ac.ir

مقدمه

پپتید مرتبط با ژن کلسی تونین[1] (CGRP) نروپپتیدی ۳۷، اسیدآمینه‌ای است که به‌طور عمده در بافت عصبی مرکزی و محیطی پستانداران وجود دارد (۱،۲،۳). این پپتید براساس تفاوت در ژن کدکننده، به دو نوع α-CGRP و β -CGRP تقسیم می‌شود (۴،۵). از نظر ساختاری، CGRPخانوادهٔ پپتیدی متشکل از CGRP کلسی تونین، آدرنومدولین[2] و آمیلین است (۵). این ژن و گیرنده‌های آن در سیستم‌های عصبی و سیستم قلبی ـ عروقی قرار دارند و در عملکردهای بیولوژیکی از جمله گشادکردن عروق خونی، مصونیت قلبی، تنظیم‌کردن گردش خون، انبساط عضلهٔ صاف و انتقال درد نقش دارند (۵،۶). در کنار نقش‌های ذکرشده، نقش متابولیکی نیز برای CGRP گزارش شده است. CGRP باعث ایجاد مقاومت انسولین در عضلهٔ اسکلتی و کبدی می‌شود (۷) و تعدیل‌کنندهٔ مهم فیزیولوژیکی در متابولیسم گلوکز درون‌سلولی می‌باشد که درنهایت، منجر به کاهش سنتز گلیکوژن در عضلهٔ اسکلتی می‌گردد (۷). اخیراً نشان داده شده است که CGRPα تأثیر مهمی بر متابولیسم چربی در عضله و کبد دارد؛ اثری که عمدتاً از طریق مسیر AMPK[3] واسطه‌گری می‌شود (۸). اطلاعات در محیط آزمایشگاه[4] نشان می‌دهد که CGRP، دردسترس‌بودن اسیدهای چرب آزاد و استفاده از آن در بافت‌های کلیدی را افزایش می‌دهد (۸). همچنین، این پپتید با افزایش فعالیت مسیر AMPK که به‌شدت اکسیداسیون اسیدهای چرب را از طریق مهار استیل کوآ کربوکسیلاز افزایش می‌دهد، منجر به بهبود اکسیداسیون اسید چرب می‌شود (۸). دراین‌راستا، والکر[5] و همکاران (۲۰۱۴) به وجود مکانیسم‌های سینالینگ مستقل از عملکرد cAMP[6] اشاره نموده و عنوان کرده‌اند که احتمال راه‌اندازی مسیرهای سیگنالینگ دیگر نظیر Ca^{2+}/ IP_3 برای CGRP نیز وجود دارد که مستقل از مسیر cAMP عمل می‌کند؛ لذا، احتمال این‌که نقش CGRP در اکسیداسیون لیپید از طریق این مسیر واسطه‌گری شود وجود خواهد داشت (۹). این اثرات عمدتاً از طریق دو گیرندهٔ متفاوت این پپتید به نام $CGRPR_1$ و $CGRPR_2$ میانجی‌گری می‌شوند که هر دوی این گیرنده‌ها دارای خصوصیات آنتاگونیستی به مادهٔ CGRP8-37 می‌باشند (۶). CGRP (8-37) آنتاگونیست انتخابی گیرندهٔ CGRP بوده که به‌عنوان یک منع‌کنندهٔ اختصاصی گیرنده‌های CGRP عمل می‌کند

1. Calcitonin Gene-Related Peptide
2. Adrenomedulin
3. AMP-Activated Protein Kinase
4. In Vitro
5. Walker CS
6. Cyclic Adenosine Monophosphate

(۶). تأثیر نهایی این ماده، خنثی‌کردن عمل CGRP در بافت‌های پیرامونی است که به کرات در مطالعات پیشین جهت حذف اثرات بیولوژیک CGRP در محیط بدن استفاده شده است (۶).

علاوه‌براین، تری‌گلیسرید بافت چربی یکی از مهم‌ترین منابع انرژی موجود در حین ورزش محسوب می‌شود (۱۰). تسریع لیپولیز و افزایش در میزان دردسترس‌بودن اسیدهای چرب که در حین ورزش رخ می‌دهد، نیازمند همکاری سیستم‌های عصبی، هورمونی و گردش خون است. پژوهش‌های اخیر جایگاه ویژه‌ای را برای سیستم عصبی مرکزی، به‌ویژه مغز در کنترل هموستاز چربی قائل شده‌اند. مغز اثرات خود بر اکسیداسیون لیپید را از دو طریق انجام می‌دهد: ۱. از طریق کنترل فعالیت اعصاب سمپاتیک که به‌صورت مستقیم بافت چربی را عصب‌دهی می‌کند و ۲. از طریق نروپپتیدهایی همانند TGF-β[1]، NPY[2]، CGRP که در پاسخ به تغییرات متابولیک خون از مغز به جریان خون ترشح می‌شوند. سطوح CGRP در خون و عضله در پی تمرین درازمدت تغییر می‌کند و اهداف چندگانه‌ای را دنبال می‌نماید (۱۱،۱۲)؛ به‌عنوان‌مثال، نشان داده شده است که ۷۲ ساعت پس از دویدن در سراشیبی، غلظتCGRP در نرون‌های عضلهٔ دوقلوی میانی افزایش می‌یابد و بعد از چهار هفته به سطوح کنترل برمی‌گردد (۱۲). در پژوهشی دیگر نشان داده شد که ورزش کوتاه‌مدت، سطح CGRP سرم و بیان آن را درگانگلیون ریشهٔ پشتی[3] (DRG) تغییر نمی‌دهد؛ درحالی‌که ورزش طولانی‌مدت به‌طور معناداری غلظت CGRP سرم را افزایش می‌دهد (۱۳). همچنین، در مطالعه‌ای دیگر که در آن تأثیر تمرین بر تغییرات CGRP و آدرنومدولین در ۱۲ نفر از ساکنان سطح دریا پس از پنج روز قرارگرفتن در ارتفاع بررسی شده است، نتایج حاکی از افزایش مقادیر CGRP و آدرنومدولین در پاسخ به تمرین بوده است (۱۱). ساچلر[4] نیز افزایش در غلظت CGRP سرم متعاقب تمرین را در رت نشان داد و عمل فیزیولوژیک این افزایش را به هایپرتروفی قلبی ناشی از ورزش نسبت داد؛ اثری که توسط درمان با آنتاگونیست CGRP (CGRP8-37) هایپرتروفی قلبی ناشی از ورزش به‌طور کامل از بین می‌رود (۱۴). علی‌رغم مشخص‌بودن افزایش سطوح CGRP در خون و عضله در پی تمرین، نقش فیزیولوژیک این افزایش ناشناخته می‌باشد. با توجه به این‌که CGRP پپتیدی است که از مغز ترشح می‌شود و به جریان خون آزاد می‌شود، عاملی است که می‌تواند ارتباط بین دستگاه عصبی مرکزی و گردش خون را حین تمرین برقرار نماید. همچنین، با توجه به نتایج پژوهش‌ها مبنی بر تأثیر CGRP بر اکسیداسیون لیپید، این احتمال وجود دارد که یکی از دلایل افزایش CGRP در حین تمرین، تسهیل و راه‌اندازی اکسیداسیون لیپید باشد. بااین‌وجود،

1. Transforming Growth Factor Beta
2. Neuropeptide Y
3. Drsal Root Ganglion
4. Sachlr

تاکنون مدارک مستقیمی مبنی بر رد یا تأیید این فرضیه به‌دست نیامده است؛ لذا، هدف از پژوهش حاضر، تعیین تغییرات CGRP سرم و مایع مغزی نخاعی در پی تمرین استقامتی و تعیین نقش احتمالی آن در اکسیداسیون لیپید در حین تمرین استقامتی در رت‌های نر نژاد ویستار می‌باشد.

روش پژوهش

تعداد ۳۰ سر رت از نژاد ویستار در سن هشت هفته (با میانگین وزن ۱۹±۲۱۱ گرم) از مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان تهیه شدند و در شرایط دمایی ۳±۲۲ درجهٔ سانتی‌گراد و تحت شرایط ۱۲:۱۲ ساعت تاریکی و روشنایی نگهداری گشتند و با غذای مخصوص رت و آب تغذیه شدند. پس از گذشت یک هفته و آشنایی با محیط آزمایشگاه، رت‌ها به‌صورت تصادفی به سه گروه تمرینی محض (۱۰ نفر)، تمرین(37-8) CGRP +(۱۰ نفر) و کنترل (۱۰ نفر) تقسیم شدند. رت‌های گروه کنترل، در تمام مدت در قفس‌های خود غیرفعال بودند و گروه تمرین+ (37-8) CGRP ده دقیقه قبل از انجام تمرین استقامتی، تزریق درون‌صفاقی (37-8) CGRP را دریافت نمودند. این تزریق به‌منظور منع گیرنده‌های CGRP و خنثی‌کردن عمل CGRP در بافت‌های پیرامونی انجام شد. رت‌های گروه‌های تمرینی محض نیز همین مقدار بافر PBS را دریافت نمودند. سپس، گروه‌های تمرینی پروتکل تمرین را به شرح زیر انجام دادند.

ابتدا، رت‌ها به‌مدت ۱۰ روز با سرعتی معادل ۱۵ متر بر دقیقه و به‌مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه با دویدن روی تردمیل آشنا شدند. در انتهای دورهٔ آشناسازی، سرعت به ۲۶ متر بر دقیقه و مدت نیز به ۶۰ دقیقه رسید. گروه‌های تمرینی پس از دورهٔ آشناسازی، یک هفته استراحت داشتند (به‌منظور ازبین‌بردن اثرات حاد احتمالی آخرین جلسهٔ تمرین) و بعد از آن، یک جلسه تمرین استقامتی را با سرعت ۲۶ متر بر دقیقه و به‌مدت ۶۰ دقیقه انجام دادند.

گروه تمرینی محض بلافاصله پس از انجام تمرین با تزریق درون‌صفاقی کتامین (90 mg/kg) و زایلازین (10 mg/kg) بی‌هوش شدند. پس از اطمینان از بی‌هوشی رت، موهای سر و جمجمه به‌دقت تراشیده شد. سپس، حیوان به دستگاه استریوتاکس انتقال داده شد و سر حیوان با زاویهٔ تقریباً ۷۰ درجه در دستگاه ثابت و بی‌حرکت گردید. در ادامه، بلافاصله برش طولی در وسط ایجاد شد و محل دقیق سیسترنا مگنا[1] با استفاده از راهنمای اطلس مغز رت (پاکسینوس) بین اولین مهرهٔ گردنی و جمجمه و یا حدوداً یک سانتی‌متر و نیم پایین‌تر از لامبدا مشخص گردید.(سیسترنا مگنا نقطه‌ای با مساحت تقریباً یک میلی‌متر مربع وکاملاً شفاف است که از بقیهٔ مکان‌ها قابل‌تشخیص می‌باشد). قابل‌ذکر است که سرنگ پروانه‌ای ۲۳G به یک سرنگ انسولینی متصل بود (شکل شمارهٔ

1. Cisterna Magna

یک) و به‌عنوان ابزار جمع‌آوری مایع مغزی نخاعی استفاده گردید. جهت جلوگیری از ورود خون به مایع مغزی نخاعی، نوک سرنگ به اندازهٔ سه تا چهار میلی‌متر وارد سیسترنا مگنا گردید و عملیات کشیدن مایع توسط شخص دوم به آهستگی و در مدت کمتر از ۳۰ ثانیه تکمیل شد. همچنین، رنگ مایع به‌دقت کنترل می‌گردید تا آلوده به خون نباشد. سپس، مایع مغزی نخاعی جمع‌آوری‌شده (۴۰ تا۹۰ لاندا) در تیوپ‌های ۰/۲ تخلیه گشت و در دمای ۸۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۶،۱۵). بلافاصله پس از جمع‌آوری مایع مغزی نخاعی، نمونهٔ خون به‌صورت مستقیم از قلب حیوان جمع‌آوری گردید، جداسازی سرم انجام گرفت و پلاسما با سانتریفیوژ در دمای چهار درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه و دور ۳۰۰۰g انجام گرفت. گروه تمرین + CGRP(8-37)، ۱۰ دقیقه قبل از انجام تمرین استقامتی، تزریق درون‌صفاقی CGRP(8-37) به مقدار (10 µg/kg) را دریافت نمودند (۱۷). این تزریق به‌منظور منع گیرندهای CGRP و خنثی‌کردن عمل CGRP در بافت‌ها انجام شد. سپس، این گروه همانند گروه تمرینی محض، ادامهٔ کار را تجربه نمود و مشمول جمع‌آوری مایع مغزی نخاعی، سرم و پلاسما پس از انجام تمرین شد.

شکل ۱ـ سرنگ پروانه‌ای ۲۳G متصل به سرنگ انسولینی

اندازه‌گیری مقادیر CGRP به‌وسیلهٔ کیت الایزای مربوط با شماره فروش ۲۶۶۳۷۷ از شرکت مای بیوسورس[1] و به روش الایزا طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. حساسیت کیت در اندازه‌گیری معادل 5pg/ml بود. مقادیر تری‌گلیسرید نیز به‌وسیلهٔ کیت الایزای مربوط با شماره

1. ELISA Kit-96well Rat Calcitonin Gene Related peptide (Mybiosource, USA Cat Number: 266377)

فروش ۱۰۰۱۰۳۰۳ ساخت شرکت کایمن چمیکال[1] طبق دستورالعمل شرکت سازنده اندازه‌گیری گردید. همچنین، اندازه‌گیری مقادیر FFA به‌وسیلهٔ کیت الایزای مربوط از شرکت ابکم[2] طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت.

داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده‌اند. نرمال‌بودن داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیروویلک[3] و همگنی واریانس‌ها با آزمون لوین[4] سنجیده شد. جهت مقایسهٔ بین گروه‌ها نیز آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه تحلیل واریانس یک راهه[5] و آزمون تعقیبی توکی مورداستفاده قرار گرفت.

نتایج

جدول شمارهٔ یک مقادیر مربوط به سطوح CGRP در مایع مغزی نخاعی و پلاسما و سطوح پلاسمایی FFA و تری‌گلیسرید در گروه‌های پژوهش را نشان می‌دهد.

جدول ۱ـ سطوح CGRP در مایع مغزی نخاعی و سرم، سطوح پلاسمایی FFA و تری‌گلیسرید بلافاصله بعد از تمرین

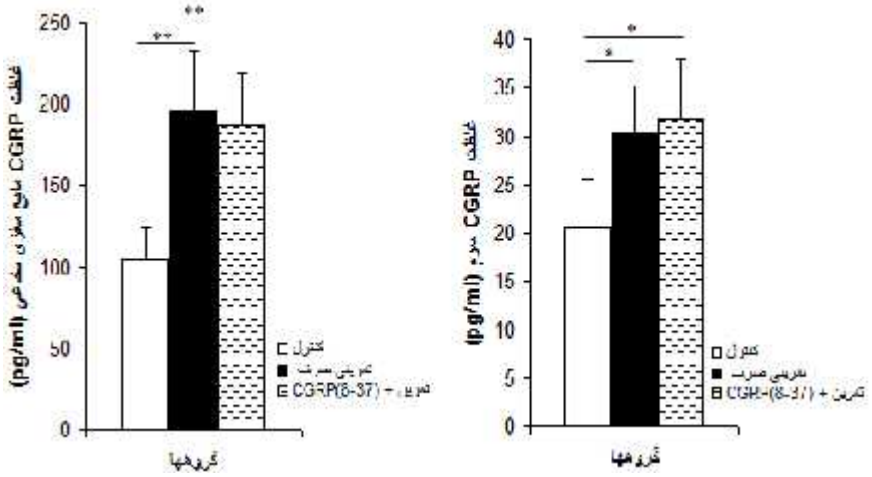
	کنترل	تمرینی محض	تمرین + CGRP (8-37)
غلظت پپتید مرتبط با ژن کلسی تونین مایع مغزی نخاعی (pg/ml)	۱۰۵/۰۸ ± ۱۸/۷۵	۱۹۶/۳۷ ± ۳۵/۹۷	۱۸۷/۳۸ ± ۳۱/۹ *
سطوح سرمی پپتید مرتبط با ژن کلسی تونین (pg/ml)	۲۰/۵۵ ± ۵/۱۵	۳۰/۳۷ ۴± /۹۲*	۳۱/۸۴ ± ۶/۱۴*
سطوح پلاسمایی تری گلیسرید (ng/dl)	۷۹ ± ۲۰/۰۶	۳۶/۶۷ ± ۴/۹۷ *	۳۷/۳۳ ± ۳/۵*
سطوح پلاسمایی اسید چرب آزاد (µM)	۱۸۷/۳ ± ۳۰/۲	۲۹۹/۶ ± ۲۵/۹ *	۲۵۴/۳ ± ۲۸/۷ #*

داده‌ها میانگین ± انحراف معیار هستند. هر داده میانگین ۱۰ رأس حیوان است.

* تفاوت معنادار با گروه کنترل ($P < 0.05$)، # تفاوت معنادار با گروه تمرینی محض ($P < 0.05$).

1. Triglyceride Colorimetric Assay Kit (Cat number: 10010303, Cayman Chemical, USA)
2. Rat Free Fatty Acids Quantification kit (Cat number: ab65341, abcam, USA)
3. Shapiro-Wilk
4. Levene
5. ANOVA

بلافاصله بعد از تمرین استقامتی، غلظت CGRP مایع مغزی نخاعی بین گروه‌های مختلف پژوهش تفاوت معناداری را نشان داد ($F_{(2,27)}$=17.31, P<0.01)؛ بدین‌صورت که غلظت CGRP در گروه تمرینی محض و گروه تمرین+ CGRP(8-37) نسبت به گروه کنترل به‌ترتیب ۸۶ و ۸۷ درصد افزایش را نشان داد (شکل شمارهٔ دو a). بااین‌وجود، اختلاف معناداری بین غلظت CGRP مایع مغزی نخاعی در گروه تمرینی صرف نسبت به تمرین+ CGRP(8-37) مشاهده نشد. همچنین، بلافاصله پس از تمرین استقامتی، غلظت CGRP سرم بین گروه‌های مختلف پژوهش تفاوت معناداری داشت ($F_{(2,27)}$=17.31, P<0.01)؛ بدین‌صورت که سطوح سرمی در گروه تمرینی محض و گروه تمرین+CGRP8-37 نسبت به گروه کنترل به‌ترتیب ۴۷ و ۵۴ درصد افزایش را نشان داد (شکل شمارهٔ دو b)(P<0.01).



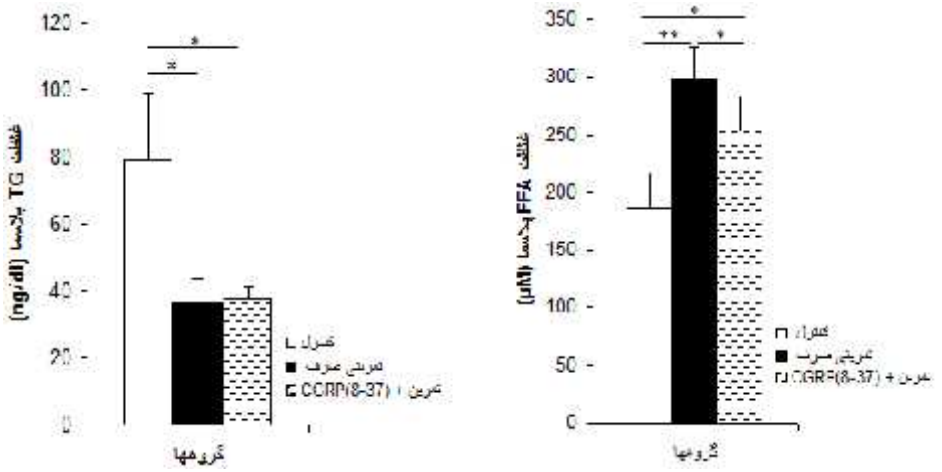
شکل ۲ـ (a): غلظت CGRP مایع مغزی نخاعی (b): سطوح سرمی آن بلافاصله بعد از تمرین استقامتی در گروه‌های پژوهش

کنترل (۱۰ نفر)، تمرینی محض (۱۰ نفر) و تمرین + CGRP (8-37) (۱۰ نفر)

* اختلاف معنادار با گروه کنترل (P < 0.05)، ** (P < 0.01)

بلافاصله بعد از تمرین استقامتی، کاهش معنادار ۵۳/۲ و ۵۲/۴ درصدی در سطوح پلاسمایی تری‌گلیسرید به‌ترتیب در گروه تمرینی محض (P<0.05) و تمرین + CGRP(8-37) (P<0.05) نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (شکل شمارهٔ سه a)، اما اختلاف معناداری بین غلظت پلاسمایی تری‌گلیسرید در گروه‌های تمرینی محض و تمرین+ CGRP(8-37) وجود نداشت (شکل شمارهٔ سه a). علاوه‌براین، بلافاصله بعد از تمرین استقامتی، سطوح پلاسمایی FFA بین گروه‌های پژوهش

تفاوت معناداری را نشان داد (F(2,27)=22.02, P<0.01). غلظت پلاسمایی FFA در گروه‌های تمرینی محض و تمرین+CGRP(8-37) نیز نسبت به گروه کنترل به‌ترتیب نشان‌دهندهٔ افزایش ۵۸/۲ و ۳۵ درصدی بود. همچنین، تفاوت معناداری بین غلظت پلاسمایی FFA در گروه‌های تمرینی و تمرین + CGRP (8-37) مشاهده شد (P<0.05) (شکل شمارهٔ سه b).



شکل ۳ـ (a): سطوح پلاسمایی TG، (b): سطوح پلاسمایی FFA بلافاصله بعد از تمرین استقامتی در گروه‌های پژوهش

کنترل (۱۰ نفر)، تمرینی محض (۱۰ نفر) و تمرین + CGRP(8-37) (۱۰ نفر)

* اختلاف معنادار بین گروه‌های پژوهش ($P < 0.05$)، ** ($P < 0.01$)

بحث و نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر با انجام یک جلسه تمرین استقامتی حاد به‌منظور تعیین نقش CGRP بر اکسیداسیون چربی در رت‌های نر نژاد ویستار انجام گرفت. مهم‌ترین یافتهٔ پژوهش حاضر این بود که بلافاصله پس از تمرین استقامتی، غلظت CGRP افزایش قابل‌توجهی در مایع مغزی نخاعی و پلاسما دارد و این افزایش در مایع مغزی نخاعی نسبت به سطوح پلاسمایی بیشتر است. همچنین، اگرچه منع عملکرد بیولوژیک CGRP در حین تمرین بر سطوح TG پلاسما بدون تأثیر بود، اما باعث کاهش معنادار سطوح FFA پلاسما بلافاصله پس از انجام تمرین استقامتی گردید. این نتایج، اثرات CGRP سرم در آزادسازی و فراهم‌آوردن اسید چرب آزاد در حین تمرین استقامتی را گوشزد می‌کند.

علاوه‌براین، سنجش غلظت CGRP در مایع مغزی نخاعی در پژوهش حاضر به‌دلیل تعیین نقش مغز در افزایش سطوح سرمی این پپتید حین تمرین استقامتی انجام گرفت و مشخص شد که متعاقب انجام تمرین استقامتی، غلظت CGRP در مایع مغزی نخاعی افزایش معناداری داشته است.CGRP در قسمت‌های مختلف مغز نظیر قشر، هیپوتالاموس و هیپوکمپ، بیان گسترده‌ای دارد (۱۸). افزایش بیان CGRP در هرکدام از این قسمت‌ها در حین تمرین می‌تواند دلیل افزایش مشاهده‌شده در غلظت CGRP مایع مغزی نخاعی در پژوهش حاضر باشد. این‌که انجام تمرین چگونه می‌تواند بیان CGRP را در قسمت‌های مختلف مغز تغییر دهد، از دو دیدگاه قابل‌بررسی می‌باشد. دیدگاه اول افزایش فعالیت قسمت‌های مختلف مغز در حین تمرین است. نشان داده شده است که فعالیت قسمت‌هایی از مغز نظیر قشر، مخچه و هیپوتالاموس که با انجام حرکت ارتباط مستقیم دارند در حین تمرین افزایش می‌یابد (۲۰-۱۸)، اما با توجه به این‌که بیان CGRP در بخش‌هایی از مغز که با حرکت درگیر می‌شوند کم است، این عامل به احتمال زیاد نمی‌تواند دلیل افزایش مشاهده‌شده در مایع مغزی نخاعی باشد. دیدگاه دوم، تأثیرات اندوکرین و فاکتورهای متابولیک خون است که در حین تمرین اثرات خود را از طریق دستگاه گردش خون بر مغز اعمال کرده و سبب ایجاد تغییرات مغزی می‌شود که عمده هدف این تغییرات، حفظ هموستاز بدن است (۲۱)؛ به‌عنوان‌مثال، افزایش لاکتات خون در حین تمرین می‌تواند با عبور از سد خونی ـ مغزی، متابولیسم خود مغز را تغییر دهد و سبب راه‌اندازی مسیرهای متابولیک مانند راه‌اندازی اکسیداسیون لیپید شود. این دیدگاه می‌تواند محتمل‌تر از دیدگاه قبل باشد، اما روش پژوهش حاضر به‌گونه‌ای نیست که بتواند عوامل تنظیمی احتمالی را معرفی نماید و مشخص‌شدن این موضوع مستلزم انجام پژوهش‌های دیگری می‌باشد.

در پژوهش حاضر، سطوح CGRP سرم در پی تمرین استقامتی افزایش معناداری داشت. نتایج نشان داد که بیان CGRP در مایع مغزی نخاعی در حین تمرین افزایش چشمگیری دارد. این نتیجه بیان می‌کند که احتمالاً افزایش بیان CGRP در مغز می‌تواند دلیل افزایش سرمی این نروپپتید در حین تمرین باشد. بااین‌وجود، CGRP در اندام‌های دیگر نظیر عضلهٔ اسکلتی و تیروئید نیز بیان می‌شود و این بافت‌ها می‌توانند دلیل افزایش سطوح سرمی CGRP در حین تمرین باشند (۷،۱۲،۲۰)، اما با توجه به این‌که بیان CGRP در تیروئید بسیار کم بوده و بافت تیروئید در حین تمرین استقامتی به‌عنوان یک بافت غیرفعال تلقی می‌شود، احتمال این‌که این بافت در افزایش سطوح CGRP درگیر باشد، بسیار کم است. ازسوی‌دیگر، فعالیت عضلهٔ اسکلتی در حین تمرین افزایش می‌یابد که می‌تواند این بافت را به‌عنوان منبع افزایش CGRP سرم معرفی نماید. بااین‌وجود، مطالعات پیشین نشان داده‌اند که عضلهٔ اسکلتی، توانایی آزادسازی CGRP به درون گردش خون را ندارد که این امر

نقش این بافت را در افزایش سطوح سرمی CGRP در حین تمرین خنثی می‌کند (۱۲). دلیل افزایش سطوح سرمی CGRP در حین تمرین به‌طور کامل شناخته شده نیست، اما CGRP فاکتوری است که در بین عوامل فیزیولوژیکی ناشی از تمرین در اثر عواملی چون هایپوکسی (۲۲) و تغییر در فعالیت سمپاتیک (۲۳) دستخوش تغییر می‌شود. وقوع هایپوکسی در بدن، گسترش بستر عروقی و فعالیت عوامل رگ‌گشا را ایجاد می‌کند (۲۴). حداقل دو مسیر سیگنالینگ متفاوت درزمینهٔ رگ‌گشایی به CGRP نسبت داده شده است: مسیر نیتریک اکسید که در این مسیر CGRP از طریق رهایش نیتریک اکسید عملیات رگ‌گشایی را انجام می‌دهد (۶،۲۵) و مسیر آدنیلات سیکلاز که در آن CGRP با تحریک آدنیلات سیکلاز، سنتز cAMP را افزایش داده و منجر به فعال‌سازی کانال‌های کلسیمی حساس به ATP شده و رگ‌گشایی را تسهیل می‌کند (۶،۲۵). دومین فاکتور احتمالی، افزایش فعالیت سمپاتیک در حین تمرین است. سطوح CGRP سرم با اپی‌نفرین پلاسما ارتباط نزدیکی دارد (۲۳،۲۴). نشان داده شده است که افزایش سطوح اپی‌نفرین پلاسما به مقدار ۶/۴ نانومول در لیتر، منجر به آزادشدنCGRP می‌شود (۲۶،۲۷). با توجه به این‌که مقادیر اپی‌نفرین پلاسما در حین تمرین استقامتی به این مقدار نزدیک می‌باشد؛ لذا، این امکان وجود دارد که افزایش سطوح اپی‌نفرین در حین تمرین باعث افزایش CGRP سرم شود. دلیل احتمالی دیگر، افزایش سطوح لاکتات خون در حین تمرین است. اثر مستقیم لاکتات بر آزادسازی CGRP در نخاع شوکی، در مطالعات حیوانی گزارش شده است (۲۸). همچنین، مطالعات نشان داده‌اند که آزادشدنCGRP در ارتفاع و در شرایط هیپوکسی، الگوی مشابهی با آزادشدن لاکتات خون دارد و وجود یک رابطهٔ خطی بین افزایش لاکتات و افزایش CGRP خون در مطالعات پیشین گزارش شده است (۱۱).

در کنار این عوامل احتمالی، در پژوهش حاضر فرضیه‌ای مبنی بر دخالت CGRPدر راه‌اندازی اکسیداسیون لیپید در حین تمرین استقامتی به آزمون گذاشته شد. برای مشخص‌شدن این‌که آیا افزایش CGRP با افزایش اکسیداسیون لیپید در حین تمرین همراه است یا نه، از تزریق درون‌صفاقی CGRP (8-37) به مقدار 10 µg/kg در گروه تمرین+ CGRP (8-37) استفاده شد. CGRP (8-37)یک آنتاگونیست انتخابی گیرندهٔ CGRP است که به‌عنوان یک منع‌کنندهٔ اختصاصی برای گیرنده‌های CGRP عمل می‌کند (۶). تأثیر نهایی این ماده، خنثی‌کردن عمل CGRP در بافت‌های پیرامونی است (۶). اثرات CGRP عمدتاً از طریق دو گیرندهٔ متفاوت به نام‌های $CGRPR_1$ و $CGRPR_2$میانجی‌گری می‌شوند (۶). خصوصیات آنتاگونیستی CGRP (8-37) برای هر دوی این گیرندها گزارش شده است، اما این ماده عمدتاً اثر خود را از طریق گیرندهٔ نوع یک اعمال می‌کند (۶). استفاده از این آنتاگونیست جهت منع فعالیت پیرامونی CGRP به‌کرات در مقالات پیشین گزارش شده است (۱۴،۲۹). علاوه‌براین، پژوهش حاضر نشان داد که سطوح پلاسمایی تری‌گلیسرید

در هر دو گروه تمرینی محض و تمرین + CGRP (8-37) در انتهای تمرین استقامتی نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری داشته است. در این پژوهش، مدت‌زمان تمرین استقامتی ۶۰ دقیقه در نظر گرفته شد تا میزان اکسیداسیون لیپید در حین تمرین درخور توجه باشد. مطالعات نشان می‌دهند که روند افزایشی در اکسیداسیون و به‌کارگیری اسیدهای چرب بعد از گذشت ۳۰ دقیقه از شروع تمرین آغاز می‌شود و از دقایق ۴۰ به بعد، به حداکثر میزان خود می‌رسد (۳۰). همچنین، در پژوهش حاضر از اندازه‌گیری دو شاخص TG و FFA پلاسما به‌عنوان شاخص‌های اکسیداسیون لیپید استفاده شد؛ زیرا، غلظت این سوبسترا (TG) در خون با مصرف چربی بدن در حین تمرین نسبت عکس دارد و این شاخص نمادی از مصرف چربی در بدن می‌باشد. FFA نیز به‌عنوان نمادی از آزادسازی اسید چرب از منابع اسید چرب در بدن در نظر گرفته شد. کاهش معنادار در غلظت TG پلاسما در هر گروه تمرینی محض و تمرین +CGRP (8-37) نشان‌دهندهٔ این است که در پژوهش حاضر، به‌کارگیری چربی در حین تمرین مشهود بوده است. بااین‌وجود، تفاوت معناداری بین غلظت‌های TG پلاسما بین دو گروه تمرین محض و تمرین + CGRP (8-37) دیده نشد که مؤید این نکته است که CGRP در استفاده از چربی‌ها در حین تمرین نقش معناداری ندارد. بااین‌وجود، این تفسیر می‌بایست با احتیاط انجام گیرد؛ زیرا، این احتمال وجود دارد که با توجه به این‌که رت‌های مورداستفاده در پژوهش حاضر رت‌های تمرین‌کرده نبودند، ظرفیت محدود اکسیداسیون لیپید در آن‌ها، اثر CGRP بر اکسیداسیون لیپید را از بین برده باشد؛ به‌عنوان‌مثال، این احتمال وجود دارد که رت‌های گروه تمرینی محض، توان اکسیداسیون لیپید بیشتر از مقادیر مشاهده‌شده را نداشته‌اند و به‌همین‌دلیل، مقادیر یکسانی از اکسیداسیون لیپید (براساس نتایج TG) بین دو گروه مشاهده گردیده است. درگیربودن این مسأله در نتایج پژوهش حاضر زمانی قوت گرفت که مشخص شد رت‌های گروه تمرین + CGRP (8-37) درمقایسه با گروه تمرین صرف، مقادیر FFA پلاسمای کمتری را در پایان تمرین استقامتی داشته‌اند؛ درحالی‌که سطوح TG در دو گروه مشابه می‌باشد. این نتیجه نشان می‌دهد که علی‌رغم فراهم‌بودن FFA بیشتر در گروه تمرینی محض، ظرفیت محدود اکسیداسیون لیپید در این حیوانات منجر به مقادیر یکسان TG (مصرف اسید چرب) در انتهای تمرین شده است. بااین‌وجود، نتایج FFA پلاسما و مقایسهٔ آن بین گروه‌های تمرینی نشان داد که CGRP در محیط بدن و در حین تمرین استقامتی منجر به آزادشدن FFA می‌شود. این‌که چگونه CGRP این عمل را در محیط بدن انجام می‌دهد از نتایج پژوهش حاضر قابل‌استخراج نمی‌باشد و مشخص‌شدن این مهم، مستلزم انجام پژوهش‌های دیگری است، اما با توجه به نتایج مطالعات در محیط آزمایشگاه که در آن‌ها نقش CGRP در متابولیسم چربی مطالعه شده است، این امکان وجود دارد که این امر از طریق عمل CGRP بر بافت‌های چربی و عضلهٔ اسکلتی واسطه‌گری

شود. در حمایت از این موضوع نشان داده شده است کهCGRP با افزایش فعالیت مسیرهای سیگنالینگ مانند cAMP و AMPK در سلول عضلهٔ اسکلتی منجر به بهبود اکسیداسیون لیپید می‌شود (۵). داناهار[1] و همکارن (۲۰۰۸) نیز نشان دادند که CGRP به‌عنوان یک تنظیم‌کنندهٔ مؤثر، دسترسی به اسیدهای چرب آزاد و به‌کارگیری لیپید در بافت‌های مصرف‌کنندهٔ چربی را تسهیل کرده و می‌تواند فراهم‌شدن اسیدهای چرب آزاد درون‌عضلانی را افزایش دهد (۸). همچنین، والکر و همکاران (۲۰۱۴) به وجود مکانیسم‌های سینالینگ مستقل از عملکرد cAMP اشاره کرده و اذعان می‌دارند که احتمال راه‌اندازی مکانیسم‌های دیگری نظیر Ca^{2+}/ IP_3 برای CGRP وجود دارد و اعتقاد دارند که CGRP می‌تواند مستقل از cAMP در اکسیداسیون لیپید مؤثر باشد (۹)؛ لذا، احتمال این‌که نقش CGRP در اکسیداسیون لیپید در حین تمرین از طریق این مسیرها واسطه‌گری شود وجود دارد. علی‌رغم این امر، مشخص‌شدن این موضوع نیاز به پژوهش‌های بیشتری دارد. همچنین، با توجه به این‌که اندازه‌گیری صرف شاخص‌های اکسیداسیون چربی نظیر TG و FFA پلاسما نمی‌تواند به‌طور کامل بازگوکنندهٔ اکسیداسیون لیپید باشد (دیگر منابع موجود نظیر چربی درون‌عضلانی و غیره نیز اشتراک قابل‌توجهی در اکسیداسیون لیپید در حین تمرین دارند)، جمع‌آوری گازهای تنفسی در حین تمرین در کنار شاخص‌های سرمی جهت تعیین هرچه دقیق‌تر نقش CGRP در اکسیداسیون لیپید به پژوهشگران بعدی پیشنهاد می‌شود. در پژوهش حاضر این مهم به‌دلیل نبودن شرایط اندازه‌گیری در مکان انجام پژوهش میسر نشد.

پیام مقاله: پژوهش حاضر نشان داد که انجام تمرین استقامتی با افزایش غلظت CGRP سرم و مایع مغزی نخاعی همراه می‌باشد. همچنین، مشخص شد که تغییرات سطوح سرمی CGRP بر سطوح TG پلاسما بدون تأثیر است، اما باعث افزایش در غلظت‌های پلاسمایی FFA می‌شود. براساس این نتایج، CGRP عاملی دخیل در آزادسازی FFA در حین تمرین استقامتی محسوب می‌شود.

تقدیر و تشکر

این پژوهش با حمایت مالی و آزمایشگاهی مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان انجام شده است و نویسندگان بدین‌وسیله مراتب سپاس و قدرانی خود را از مسئولان این سازمان ابراز می‌دارند.

1. Danaher RN

منابع

1. Brain S D, Cox H M. Neuropeptides and their receptors: Innovative science providing novel therapeutic targets. Br J Pharmacol. 2006; 147(9): 202-11.
2. Esfandyari T, Macnaughton W K, Quirion R, St Pierre S, Junien J L, Sharkey KA et all. A novel receptor for calcitonin gene-related peptide (CGRP) mediates secretion in the rat colon: Implications for secretory function in colitis. FASEB J. 2000; 14(10): 1439-46. (In Persian).
3. Poyner D R, Sexton P M, Marshall I, Smith D M, Quirion R, , Born W, et all. International union of pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. Pharmacol Rev. 2002; 54(2): 233-46.
4. Steenbergh P H, Höppener J W, Zandberg J, Lips C J, Jansz H S. A second human calcitonin/ CGRP gene. FEBS Lett. 1985; 183(2): 403-7.
5. Lerner U H. Deletions of genes encoding calcitonin/ alpha-CGRP, amylin and calcitonin receptor have given new and unexpected insights into the function of calcitonin receptors and calcitonin receptor-like receptors in bone. J Musculoskelet Neuronal Interact. 2006; 6(6): 87-95.
6. Docent H. Calcitonin gene-related peptide. Characterization of binding sites and structure-activity relationships in the eye and effects on intraocular pressure. Master of science Medical University of Tempere; 2004.
7. Rossetti L, Farrace S, Choi S B, Giaccari A, Sloan L, Frontoni S,et all. Multiple metabolic effects of CGRP in conscious rats: Role of glycogen synthase and phosphorylase. Am J Physiol. 1993; 264(1): 1-10
8. Danaher R N, Loomes K M, Leonard B L, Whiting L, Hay D L, Xu LY, et all. Evidence that alpha-calcitonin gene-related peptide is a neurohormone that controls systemic lipid availability and utilization. Endocrinology. 2008; 149(1): 154-60.
9. Walker C S, Hay D L, Fitzpatrick S M, Cooper G J, Loomes K M. A-calcitonin gene relate peptide (a-CGRP) mediated lipid mobilization in 3T3-L1 adipocytes. Peptides. 2014; 58(5): 14–9.
10. Achten J, Venables M C, Jeukendrup A E. Fat oxidation rates are higher during running compared with cycling over a wide range of intensities. Metabolism. 2003; 52(6): 747-52.
11. Hasbak P, Lundby C, Olsen N V, Schifter S, Kanstrup I L. Calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin release in humans: Effects of exercise and hypoxia. Regul Pept. 2002; 108(2): 89-95.
12. Homonko D A. Downhill exercise elicits differential changes in the levels of calcitonin gene-related peptide in the intact adult rat neuromuscular system. Doctor of science University of Toronto; 1999.
13. Sun X J, Pan S S. Role of calcitonin gene-related peptide in cardioprotection of short-term and long-term exercise preconditioning. J Cardiovasc Pharmacol. 2014; 64(1): 53-9.
14. Schuler B, Rieger G, Gubser M, Arras M, Gianella M, Vogel O ,et all. Endogenous acalcitonin-gene-related peptide promotes exercise-induced, physiological heart hypertrophy in mice. Acta Physiol. 2014; 211(1): 107–21.

15. Pegg C C, He C, Stroink A R, Kattner K A, Wang C X. Technique for collection of cerebrospinal fluid from the cisterna magna in rat. J Neurosci Methods. 2010; 187(1): 8-12.
16. Liu L, Duff K. A technique for serial collection of cerebrospinal fluid from the Cisterna Magna in Mouse. Published Online. 2008; 10(21): 3791-960.
17. Zşbil Büyükcoşkun N, Güleç G, Cam Etöz B, Ozlük K. Central effects of glucagon-like peptide-1 on cold-restraint stress-induced gastric mucosal lesions. Turk J Gastroenterol. 2007; 18(3): 150-6.
18. Wyon Y, Hammar M, Theodorsson E, Lundeberg T. Effects of physical activity and acupuncture on calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in different parts of the rat brain and in cerebrospinal fluid, serum and urine. J Appl Physiol. 2000; 162(4): 517-22.
19. Brain S D, Grant A D. Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. Physiol Rev. 2004; 84(3): 903-34.
20. Bell D, McDermott B J. Calcitonin gene-related peptide in the cardiovascular system: Characterization of receptor populations and their (patho) physiological significance. Pharmacol Rev. 1996; 48(2): 253-88.
21. Hongbao M A. Calcitonin gene-related peptide (CGRP). Doctoral of science Department of Medicine, Michigan State University, East Lansing, Michigan; 2004.
22. Keith I M[1], Ekman R. Dynamic aspects of regulatory lung peptides in chronic hypoxic pulmonary hypertension. Exp Lung Res. 1992; 18(2): 205-24.
23. Goadsby P J, Edvinsson L, Ekman R. Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache. Ann Neurol. 1990; 28(2): 183-7.
24. Hansen P B, Schnermann J. Vasoconstrictor and vasodilator effects of adenosine in the kidney. Am J Physiol Renal Physiol. 2003; 285(4): 590-9.
25. Kawase T[1], Okuda K, Burns D M. Immature osteoblastic MG63 cells possess two calcitonin gene-related peptide receptor subtypes that respond differently to [Cys(Acm) (2,7)] calcitonin gene-related peptide and CGRP (8-37). Am J Physiol Cell Physiol. 2005; 289(4): 811-8.
26. Tidgren B, Theodorsson E, Hjemdahl P. Renal and systemic plasma immunoreactive neuropeptide Y and calcitonin gene-related peptide responses to mental stress and adrenaline in humans. Clin Physiol. 1991; 11(1): 9-19.
27. Trasforini G, Margutti A, Valentini A, Ambrosio M R, Bondanelli M, Rossi R ,et all. Interrelationships between calcitonin gene-related peptide and sympathoadrenomedullary system: Effects of administration of epinephrine and norepinephrine in healthy man. Regul Pept. 1996; 63(1): 57-61.
28. Wang X, Fiscus R R. Lactic acid potentiates bradykinin- and low-pH-induced release of CGRP from rat spinal cord slices. Am J Physiol. 1997; 273(1): 92-8.
29. Hindiyeh N A, Krusz J C, Cowan R P. Does exercise make migraines worse and tension type headaches better? Curr Pain Headache Rep. 2013; 17(12): 380.
30. Jeppesen J, Kiens B. Regulation and limitations to fatty acid oxidation during exercise. J Physiol. 2012; 590(5): 1059-68.

استناددهی

سادات حسینی نجمه، نیکویی روح‌الله، مفلحی داریوش. تعیین نقش CGRP در اکسیداسیون چربی حین تمرین استقامتی در رت‌های نر نژاد ویستار. فیزیولوژی ورزشی. زمستان ۱۳۹۵؛ ۸(۳۲): ۲۰۰-۱۸۵.

Sadat Hossini. N, Nikooie. R. A, Moflehi. D. Determination of CGRP Role in Lipid Oxidation During Endurance Exercise in Male Wistar Rats. Sport Physiology. Winter 2017; 8 (32): 185-200.

Determination of CGRP Role in Lipid Oxidation during Endurance Exercise in Male Wistar Rats

N. Sadat Hossini[1], R. Nikooie[2], D. Moflehi[3]

1. M.Sc. of Shahid Bahonar University of kerman
2. Associate Professor, Shahid Bahonar University of kerman*
3. Assistance Professor, Shahid Bahonar University of kerman

Received: 2016/01/18 **Accepted: 2016/03/05**

Abstract

Energy homeostasis during exercise is a complex interaction of neuronal and hormonal inputs that are integrated at the level of the central nervous system (CNS). The aim of the present study was to investigate the role of calcitonin gene related peptide (CGRP) in fat oxidation during acute exercise in male Wistar rats. Thirty animals were randomly divided into three groups: control (C; n = 10), training (T; n = 10) and training + CGRP (8-37) (T+CGRP8-37; n = 10). The animals from T and T+CGRP8-37 groups performed a single bout of endurance exercise at 26 m/min for 60 min. Cerebrospinal fluid (CSF) and blood samples were collected immediately after exercise .The animals from T+CGRP8-37 group received CGRP (8-37) (an antagonist of CGRP receptor, 10 µg/kg; IP) before endurance exercise. CGRP concentrations in the cerebrospinal fluid and serum, FFA, and triglyceride concentrations were measured by ELISA. The difference between groups were evaluated with one-way ANOVA test and Tukey's post-hoc test. CGRP concentrations in the cerebrospinal fluid and serum were significantly higher in the animals from T ($P<0.01$) and T+CGRP8-37 ($P<0.01$) in comparison to C group. In both trained groups, plasma levels of triglycerides significantly decreased ($P<0.05$) and plasma FFA was significantly higher compared to that of the animals from C group ($P<0.01$). At the end of the exercise, only plasma FFA concentration was significantly higher in the animals from T group compared to T+CGRP8-37 group ($P<0.05$). In summary, endurance exercise leads to an increase in CGRP concentrations in serum and CSF, which is a contributing factor in FFA release during endurance training.

Keyword: Calcitonin Gene-Related Peptide, Endurance Training, Energy Homeostasis, Fat Oxidation

*Corresponding Author Email: r_nikooie@uk.ac.ir