اندازه‌گیری میزان پروتئین و بیان ژن لپتین در پاسخ به یک جلسه تمرین استقامتی در موش صحرایی

سید علیرضا حسینی کاخک [۱]، میترا خادم الشریعه [۲]، محمدرضا حامدی نیا [۳]، طیبه امیری پارسا [۲]

[۱] استادیار گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده تربیت بدنی، دانشگاه تربیت معلم سبزوار

[۲] دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی ورزش، دانشگاه تربیت معلم سبزوار

[۳] دانشیار گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده تربیت بدنی، دانشگاه تربیت معلم سبزوار

نشانی نویسنده مسؤول: سبزوار، توحید شهر، دانشگاه تربیت معلم سبزوار، دانشکده تربیت بدنی، دکتر سیدعلیرضا حسینی کاخک
E-mail: hosseini18@yahoo.com

وصول:۹۰/۳/۱۲، اصلاح:۹۰/۵/۱۸، پذیرش:۹۰/۶/۱۶

چکیده

زمینه و هدف: لپتین یکی از هورمون‌های مهم در فرایند متابولیسم چربی و هموستاز انرژی می‌باشد که اثر یک جلسه تمرین ورزشی بر آن کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر یک جلسه تمرین استقامتی بر میزان پزوتئین و بیان ژن لپتین در موش صحرایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، تعداد ۲٤ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در شرایط استاندارد محیطی نگهداری و به‌طور تصادفی به دو گروه تجربی و کنترل تقسیم شدند. تمرین شامل دویدن روی تردمیل (شدت ۱۸ متر/ دقیقه، مدت ۱۲۰ دقیقه) بود. موش‌ها بلافاصله، دو و ۲٤ ساعت پس از تمرین بیهوش شده، نمونه‌گیری خون، عضله سولئوس و چربی انجام شد. غلظت لپتین در عضله، چربی و پلاسما اندازه‌گیری شد. بیان ژن لپتین در بافت‌ها توسط روش RT-PCR بررسی گردید. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 و آزمون آنالیز واریانس با اندازه-گیری مکرر (Repeated Measures) در سطح معناداری p<۰/۰۵ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج تحقیق نشان داد که در پاسخ به تمرین بیان ژن لپتین در بافت عضله در دو ساعت [(۵۱ درصد) از ۱۰/۳٦±۱٦۹/۱۵ به ۱۱۲/۷۱± ۳٤۹/۱۳] و ۲٤ ساعت [(٤۸ درصد) از۸/۲۱±۱۸۵/۱٤ به ۱٤/۷۷±۳۵۹/۰۱] و در بافت چربی در ۲٤ ساعت [(٤۹ درصد) از ۲۱/٤۲±۱۸۱/٦۹ به ۱٦/۸۰±۳٦۱/٦٦] پس از تمرین افزایش معنادار یافت (P<۰/۰۵). اما غلظت لپتین نه در بافت چربی، نه در بافت عضله و نه در پلاسما در هیچ یک از زمان‌ها تغییر معناداری پیدا نکرد (P>۰/۰۵). همچنین بین لپتین پلاسما، گلوکز و انسولین در سه زمان بین گروه کنترل و تجربی تفاوت معناداری وجود نداشت (P>۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: تمرینات کوتاه مدت ورزشی می‌تواند بیان ژن لپتین را در بافت عضله و چربی افزایش دهد، البته احتمالاً تمرینات با شدت و حجم بالاتر بتواند مؤثرتر باشد. *(مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی سبزوار، دوره ۱۸/شماره ۴/ صص۲۷۱-۲۶۰).*

واژه‌های کلیدی: *لپتین؛ ژن؛ تمرین؛ موش صحرایی*

مقدمه

در سال های اخیر بشر به پیشرفت‌های چشمگیری در شناخت مبانی مولکولی و ژنتیکی تنظیم وزن بدن نایل شده است (۱,۲). در شرایط وزنی طبیعی، علیرغم فراز و نشیب‌های روزمره در دریافت و مصرف انرژی، ثبات وزن در طی ماه‌ها و حتی سال‌ها توسط سیستم پیچیده‌ای به خوبی حفظ می‌شود. پپتیدها، هورمون‌ها، مسیرهای آنابولیک و کاتابولیک و اندام‌های متعددی در این برقراری و حفظ تعادل انرژی دخالت دارند (۱). یکی از مهم‌ترین این پپتیدها لپتین است.

لپتین یک سایتوکین مشتق از بافت چربی ۱۶ کیلودالتنی است که از بافت چربی ترشح و آزاد و از ژنی به نام ژن ob تولید می‌شود. لپتین به‌صورت مرکزی در هیپوتالاموس پپتیدهای ضد اشتها (مثل POMC، CART) را تحریک و پپتیدهای اشتهاآور (مثل NPY و AGRP) را مهار می‌کند. شواهد قوی نشان می‌دهد که لپتین به‌عنوان سیگنال گرسنگی عمل می‌کند، به‌طوری‌که سطح آن در حین ناشتایی به سرعت کاهش می‌یابد. بنابراین، کمبود لپتین به‌عنوان حالتی از گرسنگی شدید ادراک (تلقی یا برداشت) می‌شود که منجر به پاسخ جبرانی از قبیل پراشتهایی، کاهش میزان متابولیسم و تغییر در سطوح برخی هورمون‌ها می‌شود تا تعادل انرژی حفظ شود (۳). هر چند منبع اصلی تولید و ترشح لپتین، بافت چربی می‌باشد ولی گیرنده‌های لپتین در بافت‌های مختلف بیان می‌شود که نشان‌دهنده آن است که لپتین علاوه بر عملکرد مرکزی به‌صورت محیطی نیز عمل می‌کند. بافت عضلانی و چربی به‌عنوان دو بافت بسیار فعال و مهم متابولیکی از اهداف عمل لپتین در بدن می‌باشند (۷-٤). نشان داده شده است که لپتین در عضله اسکلتی، سطح لیپیدهای داخل سلولی را کاهش می‌دهد و از این طریق حساسیت انسولینی را بهبود می‌دهد (۳). همچنین در بافت چربی لپتین لیپولیز را تحریک و از تجمع چربی جلوگیری می‌کند (۸).

عوامل مختلفی می‌تواند بیان ژن و سطح لپتین پلاسمایی را تحت تأثیر قرار دهد که یکی از آن‌ها تمرین و فعالیت بدنی است (۹). تأثیر فعالیت بدنی بر بیان ژن و غلظت لپتین همواره مورد بحث محققان بوده است و نتایج تحقیقات درباره پاسخ لپتین به تمرین متناقض است، به‌طوری که برخی کاهش (۱۲-۱۰)، برخی عدم تغییر (۹,۱۳) و برخی نیز افزایش (١٤) آن را در اثر یک جلسه تمرین گزارش کرده‌اند. در مطالعه‌ای تمرین دویدن روی تردمیل در موش‌های صحرایی تا حد واماندگی به مدت ۸۵ دقیقه تغییری در mRNA بافت چربی اپیدیدیم بلافاصله پس از تمرین ایجاد نکرد، البته mRNA لپتین در بافت چربی پشت مغبنی (Retroperitoneal) کاهش یافت (۱۵).

در تحقیقی دیگر، ٦۰ دقیقه تمرین با شدت پایین در موش‌های صحرایی باعث کاهش لپتین سرم ٤۸ ساعت پس از تمرین گردید (۱۰). گوردون و همکاران (۲۰۰۷) مشاهده کردند که یک جلسه تمرین روی تردمیل تا حد واماندگی در اسب‌ها غلظت لپتین پلاسما را تنها ٢٤ ساعت بعد از تمرین، ۲۰ درصد کاهش داد و تأثیری بر غلظت لپتین در حین تمرین نداشت (١٦). پاگانو و همکاران (۱۹۹۹) گزارش کردند که یک جلسه تمرین شنای ۳۰ دقیقه‌ای در موش‌های ماده لاغر و چاق ژنتیکی، سبب کاهش ۳۰ درصدی لپتین پلاسما در موش‌های لاغر شد ولی موش‌های چاق را تحت تأثیر قرار نداد؛ همچنین این محققان نشان دادند که بیان ژن ob در بافت چربی اطراف تخمدان در هر دو گروه با تمرین تغییر نکرد (۱۷). نتایج مطالعه ژنگ و همکارانش (۱۹۹٦) نیز نشان داد که انجام یک جلسه تمرین دویدن یک ساعته در موش‌های نر و دو ساعته برای موش‌های ماده، روی تردمیل بیان ob mRNA را در هر دو بافت چربی، بلافاصله و سه ساعت بعد از تمرین کاهش داد (۱۸). در حالی‌که در مطالعه فیشر و همکاران (۲۰۰۱) تمرین ٤۱ دقیقه‌ای روی دوچرخه ارگومتر باعث تغییر معناداری در لپتین سرم بلافاصله پس

از تمرین نشد، ولی ۹۰ دقیقه پس از تمرین افزایش معناداری مشاهده شد (۱٤).

بنابراین به‌علت اهمیت شناخت لپتین و پاسخ آن به فعالیت بدنی و نیز مکانیسم‌های درگیر در تنظیم بیان ژنتیکی و غلظت فیزیولوژیکی و عملکردهای متابولیکی آن مطالعات بیشتری مورد نیاز است (۱۹). ضمناً در این مطالعه از برنامه تمرین طولانی مدت‌تری در مقایسه با سایر تحقیقات مشابه استفاده شد، چرا که تحقیقات عموماً نشان می‌دهند که تمرینات کمتر از ٦۰ دقیقه بر لپتین تأثیر ندارند (۱۰). به‌علاوه، مطالعات انجام شده عمدتاً لپتین سرم را مورد اندازه‌گیری و ارزیابی قرار داده‌اند و به‌نظر می‌رسد تا کنون تحقیقی در خصوص پاسخ حاد و تأخیری لپتین (در سطح ژن و پروتئین و در دو بافت متفاوت) به یک جلسه تمرین در موش‌های صحرایی انجام نشده باشد.

مواد و روش‌ها

در یک تحقیق تجربی با طرح دو گروهی کنترل و تجربی، تعداد ۲٤ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار (وزن ۳۸۸±۳۱ گرم) از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. موش‌ها در شرایط استاندارد (دما : C° ۲±۲۲، چرخه تاریکی – روشنایی ۱۲:۱۲ ساعت و رطوبت نسبی ۵۰ درصد و دسترسی آزاد به آب و غذا) نگهداری شدند. موش‌ها پس از یک هفته آشنایی با فضای آزمایشگاه و دستکاری توسط محقق، ابتدا توسط ترازو به دقت وزن شده و سپس به‌طور تصادفی در دو گروه مساوی از لحاظ میانگین وزنی (گروه کنترل:۱۲ سر و گروه تجربی: ۱۲ سر) تقسیم شدند، به‌طوری‌که بر اساس تجزیه و تحلیل آماری این دو گروه از لحاظ وزن، تفاوت معناداری با یکدیگر نداشتند.

تمرین شامل دویدن روی تردمیل ویژه جوندگان آزمایشگاهی بود. موش‌ها پس از چند جلسه تمرین آشنایی و رعایت اصل اضافه بار، با سرعت ۱۸ متر بر دقیقه به‌مدت ۱۲۰ دقیقه روی تردمیل دویدند. برای همسان‌سازی موش‌ها به فضای آزمایشگاه و تردمیل، گروه کنترل نیز در طی دو هفته آشنایی، سه بار روی تردمیل قرار گرفتند و با سرعت هشت متر بر دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه روی تردمیل راه رفتند. ضمناً چهار ساعت قبل از تمرین، غذا از قفس موش‌ها برداشته شد تا خونگیری موش‌ها در حالت ناشتایی نسبی انجام شود.

بلافاصله پس از اتمام جلسه تمرین، چهار سر موش از گروه تجربی و چهار سر از گروه کنترل به وسیله تزریق داخل صفاقی(ip) پنتوباربیتال سدیم (6 mg/100 g body mass) بیهوش شدند و نمونه‌گیری خون و عضله انجام شد. دو ساعت بعد نیز چهار سر دیگر از گروه کنترل و چهار سر از گروه تجربی بیهوش و نمونه‌گیری انجام شد. در مرحله سوم، ۲٤ ساعت بعد نیز چهار سر از گروه کنترل و چهار سر از گروه تجربی بیهوش و نمونه-گیری انجام گردید. خونگیری از طریق سوراخ کردن مستقیم قلب و توسط سرنگ انجام شد. بافت عضله سولئوس نیز به سرعت جدا، به میکروتیوب‌های RNAase free و DNAase منتقل و در نیتروژن مایع منجمد گردید. نمونه‌های خونی در لوله‌های فالکون حاوی EDTA سانتریفیوژ شده و به همراه نمونه‌های بافت تا زمان اندازه‌گیری در یخچال ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

برای اندازه‌گیری لپتین در بافت چربی و عضله، ۵۰ میلی‌گرم از هر یک از بافت‌ها جدا، با استفاده از بافر PBS هموژنایز و سانتریفیوژ گردید. سپس مایع رویی (سوپرناتانت) جهت اندازه‌گیری مورد استفاده قرار گرفت. لپتین در سرم و مایع رویی بافت با استفاده از روش الایزا، کیت شرکت USCN Life Science، ساخت کشور چین با درجه حساسیت ۰/۰۷۸ نانوگرم در میلی‌لیتر و ضریب تغییرات درون گروهی ٦/۹ درصد، اندازه‌گیری شد. انسولین سرم به روش الایزا نوع sandwich، کیت شرکت Mecrodia ساخت کشور سوئد با درجه حساسیت ۰/۰۷

میکروگرم در لیتر و ضریب تغییرات درون گروهی ٤/٢ درصد اندازه‌گیری شد. گلوکز سرم با استفاده از روش رنگ‌آمیزی آنزیمی، کیت گلوکز شرکت پارس آزمون ساخت کشور ایران با درجه حساسیت ۵ میلی گرم در دسی‌لیتر و ضریب تغییرات درون گروهی ۲/۱ درصد اندازه‌گیری شد.

به‌منظور بررسی بیان ژن، واکنش semi-quantitative RT-PCR روی بافت‌های کنترل و تجربی صورت گرفت. حدود ۲۰ میلی‌گرم از بافت‌ها جداسازی و برای واکنش استخراج RNA به‌کار گرفته شد. تخلیص RNAبا استفاده از کیت شرکت MN (کشور آلمان) به‌صورت زیر انجام گرفت. ابتدا بافت‌ها توسط افزودن ۳۵۰µl محلول RA1 و ۳/۵µl مرکاپتواتانول لیز شدند. سپس محلول بافت‌ها به همراه بافر لیز به داخل ستون (دارای حلقه قرمز رنگ) افزوده و در دور ۱۱۰۰۰ به‌مدت یک دقیقه سانتریفوژ شد. محلول عبور کرده از ستون در یک میکروتیوب جمع‌آوری شد. سپس شرایط، برای چسبیدن RNA با افزودن الکل ۷۰ درصد به میزان ۳۵۰ میکرولیتر مناسب و در این مرحله چند بار با پیپت، ترکیب خوب مخلوط شد. محلول هموژنیزه شده فوق، به ستون تخلیص RNA (دارای حلقه آبی رنگ) اضافه و در دور ۱۱۰۰۰ به‌مدت ۳۰ ثانیه سانتریفوژ گردید. سپس µl ۳۵۰ بافر MDB افزوده و در دور ۱۱۰۰۰ به‌مدت یک دقیقه سانتریفوژ شد. با استفاده از µl ۹۵ محلول DNase و زمان انکوباسیون ۱۵ دقیقه‌ای، DNA های همراه با RNA که به غشاء متصل شده‌اند، از بین رفتند. سپس ۲۰۰µl محلول RA2 و در ادامه µl ٦۰۰ محلول RA3 به ستون افزوده و در دور ۱۱۰۰ به مدت ۳۰ ثانیه سانتریفیوژ گردید.

در مرحله بعدی µl ۲۵۰ محلول RA3 افزوده و در دور ۱۱۰۰ به مدت دو دقیقه سانتریفیوژ شد. به ستون µl ٦۰ آب RNase free افزوده و در دور ۱۱۰۰ به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ و در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. میزان کمّی RNA استخراج شده با قرائت جذب نوری (OD) آن، در nm ۲٦۰ در بیوفتومتر مشخص گردید. به منظور ساخت cDNA در یک لوله فاقد RNase، ۱۰۰ تا ng ٤۰۰ از RNA توتال اضافه شد و µg ۰/۵ از پرایمر الیگو dT به آن اضافه گردید. حجم نهایی توسط آب مقطر فاقد RNase به µl ۱۱رسید. مجموعه در ۷۰ درجه سانتیگراد، به مدت پنج دقیقه انکوبه گردید و سپس بلافاصله روی یخ، سرد شد. بافر RT(5X)، به حجم µl ٤، dNTPmix(10mM) به میزان µl ۲، (RNasin) Ribonuclease inhibitor ۲۰ واحد اضافه شد و با آب مقطر فاقد RNase به حجم نهایی µl ۱۹رسانده و به مدت پنج دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس ۲۰۰ واحد آنزیم ترانس کریپتاز معکوس (M-Mul-V) اضافه و به مدت یک ساعت در ٤۲ درجه انکوبه شد. در مرحله بعدی، ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه قرار گرفت، که سبب غیرفعال شدن آنزیم گردید. سپس بلافاصله به ظرف یخ منتقل شد. محصول cDNA در ۷۰- درجه ذخیره گردید.

با استفاده از نمونه cDNA های تهیه شده در بالا، طبق پروتکل زیر PCR صورت گرفت. در این روند از بتا اکتین به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد و به‌صورت جداگانه برای هر نمونه، یک واکنش PCR نیز با پرایمرهای بتا اکتین صورت گرفت:

FORWARD PRIMER:tgacaccaaaaccctcatca
REVERSE PRIMER:agcccgggaatgaagtcca
Beta actin (in leptin RTPCR)
BA-for:(5'-AGTAGGCTTTGTGGTTGATG-3')
BA-rev:(5'-CTGTCAGGAAAGGAGAAATC-3')
PCR product length:429 bp

برای ارزیابی نتایج PCR از الکتروفورز کردن محصول PCR، روی ژل آگارز و آنالیز با نرم‌افزار UVtech استفاده گردید. برای بررسی اثر تمرین بر بیان ژن لپتین و غلظت بافتی و پلاسمایی آن از آزمون آنالیز واریانس با اندازه‌گیری مکرر، در سطح معناداری $p<۰/۰۵$ و در نرم‌افزار SPSS نسخه ١٦ استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج تحقیق نشان داد که تمرین تأثیر معناداری بر لپتین، انسولین و گلوکز پلاسما بلافاصله، ۲ و ۲٤ ساعت پس از تمرین نداشت، به طوری که بین لپتین پلاسما (P=۰/۳۱ و F=٤/٤۳)، گلوکز (F=۰/۷۵ و P=۰/۵۱) و انسولین (F=۲/۸۹ و P=۰/۱٤) در سه زمان بین گروه کنترل و تجربی تفاوت معناداری وجود نداشت (جدول ۱).

در این تحقیق بیان ژن لپتین در مقایسه با بیان یک ژن کنترل داخلی (بتا اکتین) سنجیده شده است. حرف C روی باندها نشان‌دهنده گروه کنترل و حروف T نشان-دهنده گروه تجربی می‌باشد. بلافاصله پس از تمرین باندها به ترتیب از چپ به راست C1 تا C4 نمونه موش های کنترل و T1 تا T4 نمونه موش‌های تمرین کرده، در زمان ۲ ساعت پس از تمرین نیز C5 تا C8 گروه کنترل و T5 تا T8 گروه تجربی و در زمان ۲٤ ساعت پس از تمرین نیز C9 تا C12 گروه کنترل و T9 تا T12 گروه تجربی می‌باشند. M نیز مارکر وزن مولکولی می‌باشد. وزن باندهای مهم مارکر در شکل ۱ نشان داده شده است. بر اساس نتایج تحقیق، بیان ژن لپتین در بافت عضله بلافاصله پس از تمرین در گروه تجربی افزایش داشته است (شکل ۱) ولی این افزایش از لحاظ آماری معنادار نبود (P>۰/۰۵). اما ۲ و ۲٤ ساعت پس از تمرین بیان ژن لپتین در بافت عضله به‌طور معناداری در گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل افزایش داشت (P<۰/۰۵) (شکل۱).

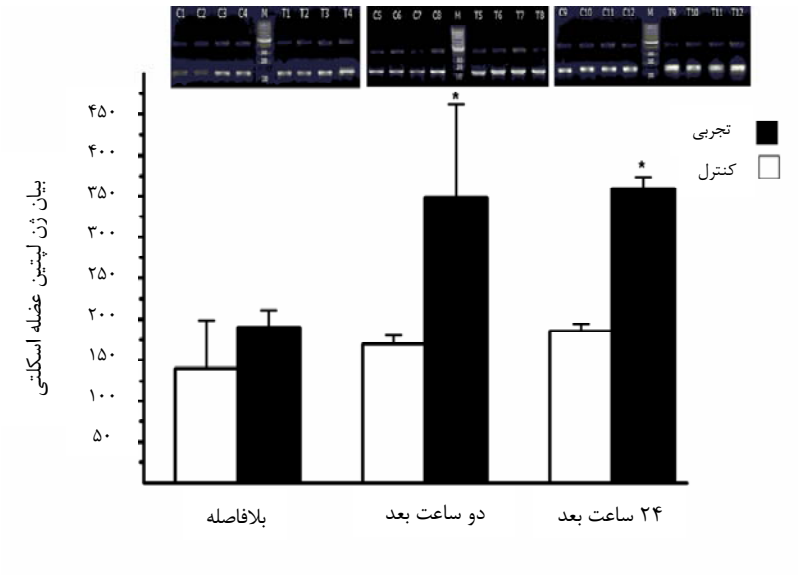
در شکل ۲ نتایج تحقیق در مورد بیان ژن لپتین در بافت چربی نشان داده شده است. بیان این ژن در مقایسه با بیان یک ژن کنترل داخلی (بتا اکتین) سنجیده شده است. حرف C روی باندها نشان‌دهنده گروه کنترل و حروف T نشان‌دهنده گروه تجربی می‌باشد. بلافاصله پس از تمرین، باندها به ترتیب از چپ به راست C1 تا C4 نمونه موش‌های کنترل و T1 تا T4 نمونه موش‌های تمرین کرده می‌باشد. در زمان ۲ ساعت پس از تمرین، C5 تا C8 گروه کنترل و T5 تا T8 گروه تجربی و در زمان ۲٤ ساعت پس از تمرین نیز C9 تا C12 گروه کنترل و T9 تا T12 گروه تجربی می‌باشند. M نیز مارکر وزن مولکولی می‌باشد. وزن باندهای مهم مارکر در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج آزمون آماری نشان داد که بلافاصله پس از تمرین بیان ژن لپتین در بافت چربی در گروه تجربی اندکی کاهش داشت (شکل ۲) که این کاهش از لحاظ آماری معنادار نبود (P>۰/۰۵). همچنین ۲ ساعت پس از تمرین، افزایش اندکی در بیان ژن گروه تجربی مشاهده شد که باز هم از لحاظ آماری معنادار نبود (P>۰/۰۵). اما بیان ژن لپتین در بافت عضله ۲٤ ساعت پس از تمرین در گروه تجربی افزایش معناداری در مقایسه با گروه کنترل داشت (P<۰/۰۵) (شکل ۲).

در تحقیق حاضر، علاوه بر بررسی بیان ژن لپتین در بافت عضله و چربی، غلظت لپتین نیز در بافت چربی و عضله مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج تحقیق در مورد غلظت لپتین در بافت چربی نشان داد که هر چند غلظت لپتین بلافاصله، ۲ و ۲٤ ساعت پس از تمرین در گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل کاهش داشت ولی این کاهش از لحاظ آماری معنادار نبود (P>۰/۰۵) (شکل ۳). به‌عبارتی، تمرین بر غلظت لپتین بافت چربی تأثیر

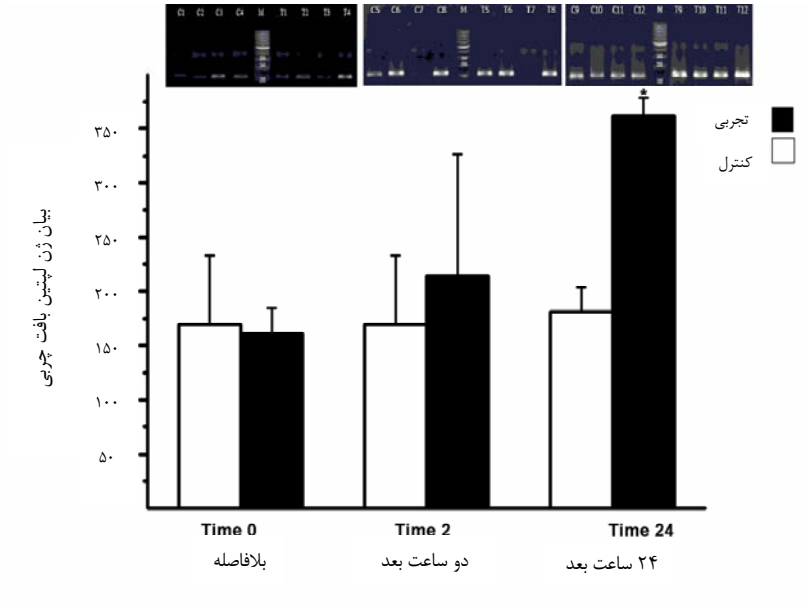
جدول ۱: میانگین میزان لپتین، گلوکز و انسولین گروه کنترل و تمرین به تفکیک زمان‌ها

متغیرها		بلافاصله پس از تمرین انحراف استاندارد±میانگین	دو ساعت پس از تمرین انحراف استاندارد±میانگین	۲٤ ساعت پس از تمرین انحراف استاندارد±میانگین
لپتین پلاسما (ng/ml)	کنترل	۱/۶۳ ±۰/۳۷	۱/۷ ±۷	۱/۸٤± ۰/۵۳
	تجربی	۱/۳۷ ± ۰/۷۱	۲ ±۱	۱/۹ ± ۰/۳۸
انسولین (µg/l)	کنترل	۲/۲۱ ±۰/۲۱	۲/۵۹ ±۰/۹۹	۳/۲۷ ±۱/۱۹
	تجربی	۱/۷۲ ±۰/٤۵	۱/۶۲ ±۰/۳۷	۲/۲۲ ±۰/۸۳
گلوکز (mg/dl)	کنترل	۱۰۶/۲۵ ±٤/۲	۹۵/۷۵ ±۲۲/۶۹	۸۶/۲۵ ±۷/۲۲
	تجربی	۹٤/۷۵ ±۱۸/۹۹	۸۷/۷۵ ±۱۰/۳٤	۱۰٤/۲۵ ±۱۹/۰۵

* P < ۰/۰۵



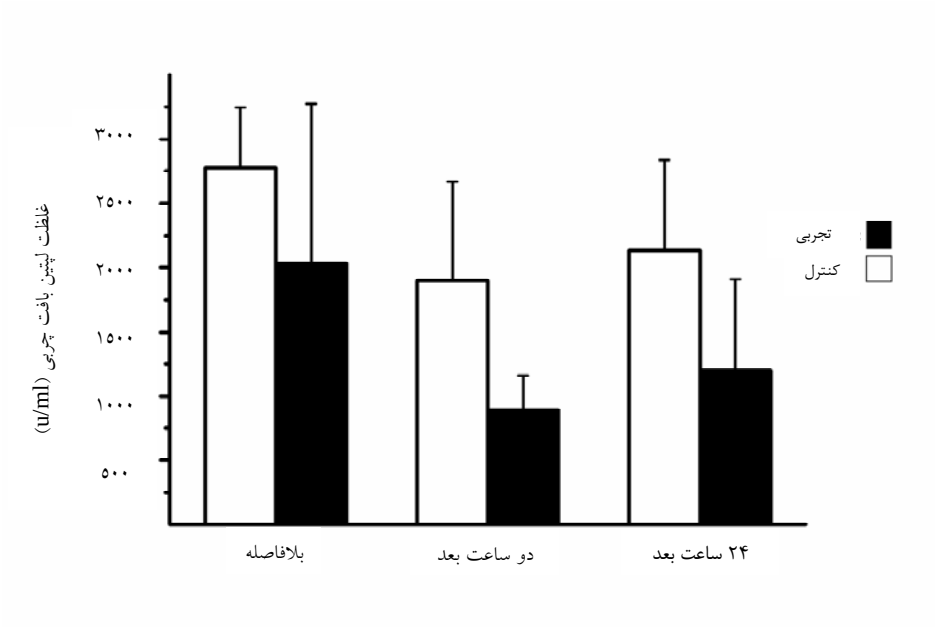
شکل ۱: بیان ژن لپتین در بافت عضله بلافاصله، ۲ ساعت و ۲٤ ساعت پس از تمرین. قسمت فوقانی شکل نتایج الکتروفورز ژل آگارز، RT-PCR برای بررسی تغییرات بیان ژن لپتین را نشان میدهد.
✱ تفاوت معنادار بین گروه کنترل و تجربی (P<۰/۰۵).



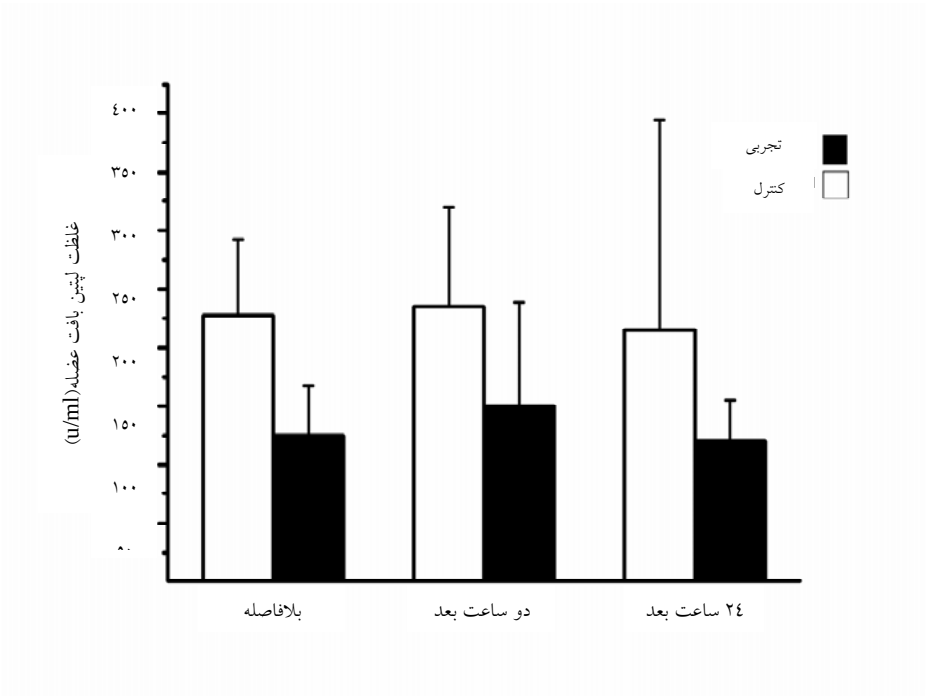
شکل ۲: بیان ژن لپتین در بافت چربی بلافاصله، ۲ ساعت و ۲٤ ساعت پس از تمرین.
قسمت فوقانی شکل نتایج الکتروفورز ژل آگارز، RT-PCR برای بررسی تغییرات بیان ژن لپتین را نشان میدهد.
✱ تفاوت معنادار بین گروه کنترل و تجربی (P<۰/۰۵).

معناداری در هیچ یک از زمان‌های مورد مطالعه نداشت.

همچنین نتایج تحقیق در مورد تاثیر تمرین بر غلظت لپتین بافت عضله نشان داد داد که در این مورد نیز غلظت لپتین بافت عضله در گروه تجربی در مقایسه با کنترل در هر سه زمان کاهش داشت ولی این کاهش از لحاظ آماری معنادار نبود (P>۰/۰۵) (شکل ٤).



شکل ۳: تغییرات غلظت لپتین بافت چربی در گروه کنترل و تجربی در زمان های مختلف



شکل٤: تغییرات غلظت لپتین بافت عضلانی در گروه کنترل و تجربی در زمان های مختلف

بحث

در مطالعه حاضر، تأثیر یک جلسه تمرین استقامتی طولانی مدت بر بیان ژن لپتین و غلظت آن در بافت عضله، چربی و پلاسما در موش‌های صحرایی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج تحقیق نشان داد که در پاسخ به تمرین بیان ژن لپتین در بافت عضله در مدت زمان دو و ۲٤ ساعت و در بافت چربی ۲٤ ساعت پس از تمرین، افزایش معناداری مشاهده شد. اما غلظت لپتین نه در بافت

چربی، نه در بافت عضله و نه در پلاسما تغییر معناداری پیدا نکرد، هر چند تمایل به کاهش غلظت لپتین در بافت عضله و چربی در گروه تجربی در مقایسه با گروه کنترل در تمام مراحل وجود داشت. همچنین تغییرات گلوکز و انسولین معنادار نبود. به‌نظر می‌رسد که این اولین مطالعه‌ای است که با استفاده از چنین پروتکلی در سطح مولکولی به مطالعه تغییرات ژنی و پروتئینی در سطح بافت پرداخته است.

لپتین که محصول ژن چاقی (ob gene) می‌باشد، یک هورمون پپتیدی است که عمدتاً توسط بافت چربی ترشح می‌شود و در رفتار دریافت غذا و هزینه انرژی در جوندگان دخالت دارد. مشخص شده است که لپتین اثرات فوق‌العاده قوی بر روی متابولیسم اسیدهای چرب عضله اسکلتی دارد و منجر به افزایش ظرفیت اکسیداسیون اسیدهای چرب، کاهش ذخایر تری‌گلیسرید عضلانی و کاهش ورود تری گلیسیرید به بافت عضلانی می‌شود. این اثرات به‌ویژه در عضله سولئوس که از ظرفیت اکسیداتیو بالایی برخوردار است، مشاهده می‌شود. تحریک اکسیداسیون اسیدهای چرب توسط لپتین در عضله (بخشی) به‌وسیله فعال‌سازی AMPK انجام می‌شود. البته تحریک AMPK توسط لپتین موقتی و گذرا می‌باشد، به این معنا که پس از گذشت حدود یک ساعت به سطح پایه بر می‌گردد. بنابراین گفته می‌شود که مولکول‌های سیگنالی دیگری غیر از AMPK نیز در اثرات لپتین روی عضله دخالت دارند. یک فرضیه برای لپتین این است که یکی از نقش‌های اساسی لپتین جلوگیری از ذخیره‌سازی بیش از حد چربی یا سمیت چربی در بافت‌های محیطی است. لذا از این منظر، لپتین یک نقش حفاظتی برای بدن ایفا می‌کند (۵). افزایش بیان ژن لپتین در بافت عضلانی و چربی پس از تمرین در این مطالعه بدین معناست که لپتین لیپولیز را در بافت چربی و عضلانی افزایش داده است، چرا که لپتین هم در بافت چربی و هم عضله اسکلتی اکسیداسیون چربی را افزایش و ذخیره چربی را کاهش می‌دهد (۲۰).

نتایج اکثر تحقیقاتی که از برنامه تمرینی طولانی مدت (برای بیش از چند هفته) استفاده کرده‌اند، نشان می‌دهد که بیان ژن و غلظت لپتین در اثر تمرین کاهش می‌یابد که عمدتاً علت و مکانیسم آن کاهش بافت چربی عنوان شده است (۱۳,۲۱)، هر چند نتایج در این زمینه نیز قطعی نیست. به‌عنوان مثال در مطالعه پولاک و همکاران (۲۰۰۶)، ۱۲ هفته تمرین هوازی در زنان چاق علیرغم کاهش وزن بدن و توده چربی باعث تغییرات معناداری در بیان ژن لپتین در بافت چربی زیرجلدی شکمی نشد، هر چند لپتین پلاسما کاهش یافت (۲۲).

اما در مورد تمرینات تک جلسه‌ای همان‌طور که پیش‌تر گفته شد، با وجود تعداد کم مطالعات انجام شده در این زمینه نتایج تحقیقات پراکنده و متناقض است. ضمناً فقط چند مطالعه محدود به بررسی بیان ژن لپتین در بافت‌ها در نمونه‌های حیوانی پرداخته‌اند. در مطالعه گوکبل و همکاران (۲۰۰۵) تمرین دویدن روی تردمیل به مدت ۶۰ دقیقه تا حد واماندگی در موش‌های صحرایی باعث کاهش لپتین پلاسما در گروه تمرین گردید (۱۰). در این مطالعه، کشتن موش‌ها پس از تمرین به فاصله ۴۸ ساعت انجام شد و شاید همین فاصله زمانی زیاد دلیل کاهش در لپتین باشد. در مطالعه حاضر، آخرین مرحله کشتن موش‌ها ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین بود و تغییر معناداری در لپتین پلاسما مشاهده نشد. شاید اگر کشتن موش‌ها تا ۴۸ ساعت پس از تمرین به تعویق می‌افتاد ما می‌توانستیم شاهد تغییرات معناداری در لپتین باشیم، چرا که اصولاً برخی محققین معتقدند پاسخ لپتین به تغییرات متابولیسم (مثل تمرین) با تأخیر و آهسته می‌باشد (۳,۱۰). به‌عنوان مثال، در یک مطالعه مقادیر لپتین پلاسما بلافاصله پس از یک تمرین ۶۰ دقیقه‌ای کاهش نیافت ولی پس از ۴۸ ساعت کاهش معناداری یافت (۲۳). علت و اهمیت فیزیولوژیکی پاسخ تأخیری لپتین مشخص نیست هر چند تغییر در تحریک‌کننده‌های لپتین (مثل

هورمون رشد و انسولین) و مهار کننده‌های آن (تستوسترون و اپی‌نفرین) می‌تواند از جمله مکانیسم‌های احتمالی باشد (۱۰).

نتایج تحقیق حاضر را یافته‌های اسیج و همکاران (۲۰۰۰) تأیید می‌کند. آن‌ها گزارش کردند که بلافاصله پس از دو تمرین مجزای دوی تردمیل با ۷۰ درصد VO2max که به‌ترتیب با هزینه انرژی معادل ۸۰۰ و ۱۵۰۰ کیلو کالری همراه بود، تغییری در مقادیر لپتین پلاسما ایجاد نشد. در مطالعه آنان لپتین دارای پاسخ تأخیری بود به‌طوری که کاهش آن ۲٤ ساعت بعد در تمرین با هزینه انرژی ۱۵۰۰ کیلو کالری و ٤۸ ساعت بعد از هر دو تمرین (۸۰۰ و ۱۵۰۰ کیلوکالری) مشاهده شد در عین حال کاهش انسولین نیز قبل از کاهش غلظت لپتین گزارش شد (۲٤). همچنین ولتمن و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کردند که ۳۰ دقیقه ورزش با شدت و هزینه کالریک متفاوت (از ۱۱±۱۵۰ تا ٤۵±۵۲۹ کیلوکالری) تغییراتی در سطح لپتین پلاسما در طی ورزش و ۳/۵ ساعت ریکاوری پس از آن به‌وجود نمی‌آورد. در مطالعه آن‌ها عنوان شد که شدت و مدت پروتکل تمرینی مورد استفاده برای اثرگذاری بر غلظت لپتین در آزمودنی‌ها کافی نبوده است (۹). در مقابل، یافته‌های کلر و همکاران (۲۰۰۵) نشان داد که پس از ۳ ساعت دوچرخه‌سواری با ٦۰ درصد کار بیشینه، لپتین سرم در ۸ آزمودنی مرد تقریباً ٦۰ درصد کاهش یافت (۱۱) که به‌نظر می‌رسد علت این اختلاف ناشی از تفاوت در نوع آزمودنی‌ها (آزمودنی‌های انسانی در مقابل نمونه‌های حیوانی)، پروتکل تمرین ورزشی مورد استفاده در دو مطالعه و هزینه انرژی بالای پروتکل تمرینی در مطالعه کلر در مقایسه با تحقیق حاضر باشد

افزایش لپتین پلاسما بلافاصله پس از تمرین در مطالعه فیشر و همکاران (۲۰۰۱) به افزایش غلظت کورتیزول در اثر تمرین نسبت داده شده است، چرا که تحقیقات نشان می‌دهند کورتیزول باعث افزایش ترشح لپتین می‌شود. همچنین احتمال دیگر می‌تواند اعمال اثر انسولین بر لپتین باشد (۱٤)

مطالعات گذشته نشان می‌دهند که هزینه انرژی تمرین، عاملی مؤثر بر لپتین می‌باشد (۲۳) و کاهش لپتین سرم همراه با ورزش ممکن است تا حدی با زمان ورزش و یا وضعیت گرسنگی یا سیری آزمودنی‌ها مرتبط باشد که بر اساس این اطلاعات، کاهش شدید هزینه انرژی در اثر ورزش مورد نیاز است تا سطوح لپتین توسط یک جلسه تمرین ورزشی کاهش پیدا کند (۲۵). هیلتون و همکاران (۲۰۰۰) بیان نمودند که مراحل تمرینات حاد و یک جلسه‌ای می‌توانند سطوح لپتین را کاهش دهند، اثری که وقتی تعادل انرژی مثبت است دیده نمی‌شود (۲۵).

پروتکل تمرینی که در تحقیق حاضر مورد استفاده بوده است شامل دوی تردمیل با سرعت ۱۸ متر بر دقیقه بود که به مدت ۲ ساعت انجام شد و با وجود چنین تمرین طولانی مدتی تغییر معناداری در غلظت لپتین مشاهده نشد، اگر چه تمایل به کاهش وجود داشت. لذا اگر زمان ناشتایی آزمودنی‌ها را افزایش می‌دادیم و یا نمونه‌گیری را در ساعات بعدی تکرار می‌کردیم، کاهش معنادار و تأخیری لپتین را مشاهده می‌کردیم. از این رو شاید بتوان احتمال داد که علت عدم مشاهده کاهش معنادار لپتین ناکافی بودن زمان ناشتایی آزمودنی‌ها و یا ناکافی بودن زمان لازم برای مشاهده اثرات تمرین بر لپتین باشد. در عین حال، پروتکل تمرینی مورد استفاده در تحقیق ما نیز طولانی مدت بود و اگر چه در این مطالعه کاهش معنادار لپتین مشاهده نشد اما در مواردی این تغییرات بسیار نزدیک به معناداری بود (بلافاصله پس از تمرین در بافت عضلانی و دو ساعت پس از تمرین در بافت چربی) لذا احتمال دیگری که ممکن است عدم تغییر معنادار لپتین را توجیه کند تعداد آزمودنی‌های مورد مطالعه حاضر می‌باشد که با توجه به کم بودن تعداد آن‌ها به نظر می‌رسد اگر تعداد آزمودنی‌ها افزایش می‌یافت، احتمال مشاهده کاهش معنادار لپتین هم امکان‌پذیر می‌شد.

در مورد تأثیر تمرین بر بیان ژن لپتین مطالعات اندکی وجود دارد. در یک مطالعه، سه ماه تمرین هوازی در زنان چاق باعث عدم تغییر بیان ژن لپتین در بافت چربی زیرجلدی شد (۲۲) که دلیل مشخصی نیز برای این نتیجه ارائه نشده است. هر چند تفاوت در نوع تمرین (تمرین طولانی مدت در برابر تمرین کوتاه مدت) و بافت چربی مورد مطالعه (بافت چربی زیرجلدی در مقابل بافت چربی احشایی) می‌تواند از جمله دلایل تضاد یافته این تحقیق با مطالعه حاضر باشد. همچنین ژنگ و همکاران (۱۹۹٦) در مطالعه‌ای مشابه به بررسی اثر یک جلسه تمرین بر بیان ژن لپتین در موش های صحرایی پرداختند. نتایج مطالعه مذکور نشان داد که بلافاصله و سه ساعت پس از تمرین بیان ژن لپتین در بافت چربی احشایی به میزان ۳۰ درصد کاهش یافت (۱۸). در مطالعه ژنگ بر خلاف مطالعه حاضر موش‌ها با شدت ۳۰ متر در دقیقه و با شیب ۸ درصد دویدند که شدت بالاتری در مقایسه با تمرین حاضر می‌باشد، لذا علت تناقض یافته‌ها می‌تواند همین تفاوت مشهود در شدت تمرین باشد.

در مطالعات گذشته، فراهم بودن مواد اولیه و دسترسی به آن‌ها و پاسخ‌های هورمونی مانند انسولین می‌توانند لپتین را تحت تأثیر قرار دهند (۲٦,۲۷). انسولین یک تنظیم‌کننده مهم و کلیدی ژن ob محسوب می‌گردد (۲۸) و نقش مهمی در تنظیم مرکزی دریافت انرژی و چاقی بدن دارد (۲۹). مطالعه سلول‌های چربی جدا شده به روشنی نشان داده است که انسولین بیان mRNA و ترشح لپتین را در سلول‌های چربی کشت داده شده انسان و موش تحریک می‌کند (۳۰). در مطالعه حاضر، ورزش تأثیر معناداری بر انسولین سرم نداشت. انسولین سرم بلافاصله، دو و ۲٤ ساعت پس از ورزش کاهش داشت اما مقدار آن معنادار نبود. با این وجود، تغییرات انسولین و لپتین همسو بودند به طوری که هر دو تمایل به کاهش داشتند، بدون آن‌که تغییر معناداری داشته باشند. بررسی رابطه همبستگی بین آن‌ها نیز نشان داد که بلافاصله پس از تمرین در بافت چربی (r=۰/۷۹) و دو ساعت بعد در بافت عضلانی (r=۰/۸۳) و چربی (r=۰/۷۲) همبستگی معناداری و مثبتی بین انسولین و لپتین وجود داشت. این بخش از یافته‌های مطالعه ما توسط اسیج و همکاران (۲۰۰۰) نیز تأیید می‌شود که ارتباط معناداری بین تغییر مقدار غلظت لپتین را با تغییر مقدار انسولین پس از یک جلسه ورزش گزارش کردند (۲٤).

در مجموع، نتایج تحقیق حاضر و مقایسه آن با سایر تحقیقات بیان‌گر آن است که افزایش بیان ژن لپتین در بافت عضله و چربی متعاقب یک جلسه تمرین طولانی مدت هوازی از نقش تنظیمی و هماهنگ این دو عامل در تنظیم تعادل و هموستاز انرژی پس از تمرین حمایت می‌کند و آثار مثبت تمرینات کوتاه مدت را بر متابولیسم چربی‌ها نشان می‌دهد. البته در این مطالعه، نیمرخ لیپیدی پلاسما مورد مطالعه قرار نگرفت که می‌تواند در تحقیقات آینده مدنظر محققین قرار گیرد. همچنین احتمالاً استفاده از شدت‌های تمرینی بالاتر با تعداد نمونه بیشتر بتواند بینش دقیق‌تری در این زمینه به دست دهد.

تشکر و قدردانی

از گروه بیوتکنولوژی پزشکی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران به‌خاطر همکاری و به‌ویژه از سرکار خانم دکتر فاطمه رهبری‌زاده به‌خاطر همکاری در انجام آزمایشات بیوشیمایی و RT-PCR و آقای دکتر مهدی جباری به‌خاطر مشاوره آماری قدردانی می‌گردد.

References

1. Schwartz MW, Woods SC, Seeley RJ, Barsh GS, Baskin DG, Leibel RL. Is the energy homeostasis system inherently biased toward weight gain? Diabetes. 2003;52(2):232-8.

2. Woods SC, Seeley RJ. Adiposity signals and the control of energy homeostasis. Nutrition. 2000;16(10):894-902.
3. Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E. The endocrine function of adipose tissue: an update. Clin Endocrinol (Oxf). 2006;64(4):355-65.
4. Mohamed-Ali V, Pinkney JH, Coppack SW. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. Int J Obes Relat Metab Disord. 1998;22(12):1145-58.
5. Dyck DJ. Leptin sensitivity in skeletal muscle is modulated by diet and exercise. Exerc Sport Sci Rev. 2005;33(4):189-94.
6. Ceddia RB, William WN Jr, Curi R. The response of skeletal muscle to leptin. Front Biosci. 2001;6:D90-7.
7. Havel PJ. Role of adipose tissue in body-weight regulation: mechanisms regulating leptin production and energy balance. Proc Nutr Soc. 2000;59(3):359-71.
8. Harris RB. Leptin--much more than a satiety signal. Annu Rev Nutr. 2000;20:45-75.
9. Weltman A, Pritzlaff CJ, Wideman L, Considine RV, Fryburg DA, Gutgesell ME, et al. Intensity of acute exercise does not affect serum leptin concentrations in young men. Med Sci Sports Exerc. 2000;32(9):1556-61.
10. Gökbel H, Baltaci AK, Uçok K, Okudan N, Mogulkoç R. Changes in serum leptin levels in strenuous exercise and its relation to zinc deficiency in rats. Biol Trace Elem Res. 2005;106(3):247-52.
11. Keller P, Keller C, Steensberg A, Robinson LE, Pedersen BK. Leptin gene expression and systemic levels in healthy men: effect of exercise, carbohydrate, interleukin-6, and epinephrine. J Appl Physiol. 2005;98(5):1805-12.
12. Torjman MC, Zafeiridis A, Paolone AM, Wilkerson C, Considine RV. Serum leptin during recovery following maximal incremental and prolonged exercise. Int J Sports Med. 1999;20(7):444-50.
13. Bouassida A, Zalleg D, Zaouali M, Gharbi N, Feki Y, Tabka Z. Effets d'un exercice supra-maximal sur les concentrations de la leptine plasmatique. Sci Sports. 2004; 19: 136-8. (French).
14. Fisher JS, Van Pelt RE, Zinder O, Landt M, Kohrt WM. Acute exercise effect on postabsorptive serum leptin. J Appl Physiol. 2001;91(2):680-6.
15. Bramlett SB, Zhou J, Harris RB, Hendry SL, Witt TL, Zachwieja JJ. Does beta(3)-adrenoreceptor blockade attenuate acute exercise-induced reductions in leptin mRNA? J Appl Physiol. 1999;87(5):1678-83.
16. Gordon ME, McKeever KH, Betros CL, Manso Filho HC. Exercise-induced alterations in plasma concentrations of ghrelin, adiponectin, leptin, glucose, insulin, and cortisol in horses. Vet J. 2007;173(3):532-40.
17. Pagano C, Marzolo M, Granzotto M, Ricquier D, Federspil G, Vettor R. cute effects of exercise on circulating leptin in lean and genetically obese fa/fa rats. Biochem Biophys Res Commun. 1999;255(3):698-702.
18. Zheng D, Wooter MH, Zhou Q, Dohm GL. The effect of exercise on ob gene expression. Biochem Biophys Res Commun. 1996;225(3):747-50.
19. Benatti FB, Lanch JAH. Leptin and endurance exercise: implications of adiposity and insulin. Rev Bras Med Esporte. 2007; 13(4): 239e-44e.
20. Argilés JM, López-Soriano J, Almendro V, Busquets S, López-Soriano FJ. Cross-talk between skeletal muscle and adipose tissue: a link with obesity? Med Res Rev. 2005;25(1):49-65.
21. Kraemer RR, Chu H, Castracane VD. Leptin and exercise. Exp Biol Med (Maywood). 2002;227(9):701-8.
22. Polak J, Klimcakova E, Moro C, Viguerie N, Berlan M, Hejnova J, et al. Effect of aerobic training on plasma levels and subcutaneous abdominal adipose tissue gene expression of adiponectin, leptin, interleukin 6, and tumor necrosis factor alpha in obese women. Metabolism. 2006;55(10):1375-81
23. Olive JL, Miller GD. Differential effects of maximal- and moderate-intensity runs on plasma leptin in healthy trained subjects. Nutrition. 2001;17(5):365-9.
24. Essig DA, Alderson NL, Ferguson MA, Bartoli WP, Durstine JL. Delayed effects of exercise on the plasma leptin concentration. Metabolism. 2000;49(3):395-9.
25. Hilton LK, Loucks AB. Low energy availability not exercise stress suppresses the diurnal rhythm of leptin in healthy young woman. Am J Physiol Endocrinol Metab 2000; 278: E48- E49.

26. Saad MF, Khan A, Sharma A, Michael R, Riad-Gabriel MG, Boyadjian R, et al. Physiological insulinemia acutely modulates plasma leptin. Diabetes. 1998;47(4):544-9.
27. Pratley RE, Ren K, Milner MR, Sell SM. Insulin increases leptin mRNA expression in abdominal subcutaneous adipose tissue in humans. Mol Genet Metab. 2000;70(1):19-26.
28. Kolaczynski JW, Considine RV, Ohannesian J, Marco C, Opentanova I, Nyce MR, et al. Responses of leptin to short-term fasting and refeeding in humans: a link with ketogenesis but not ketones themselves. Diabetes. 1996;45(11):1511-5.
29. Benoit SC, Clegg DJ, Seeley RJ, Woods SC. Insulin and leptin as adiposity signals. Recent Prog Horm Res. 2004;59:267-85.
30. Wauters M, Concidine RV, Gaal LFV. Human leptin: from adiposity hormone to an endocrine mediator. Eur J Endocrin. 2000; 143: 293- 311