تأثیر تمرین استقامتی به همراه تزریق آدنوزین بر بیان ژن‌های UCP-1 و MAPK p38 بافت چربی زیرپوستی در رت‌های نر ویستار تغذیه‌شده با رژیم غذایی پرچرب

زهرا اسلامی[۱]، یحیی محمدنژاد پناه کندی[۲]، مهبانو قادری[۳]، عبدالرضا اقبال مغانلو[۴]، شهره شریفیان[۵]، قیصر بیشمی[۶]، سید جواد میرغنی[۷*]

۱-دانشجوی دکتری تخصصی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

۲-دکتری تخصصی،گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اسلامشهر، اسلامشهر، ایران

۳-استادیار، گروه علوم ورزشی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

۴-استادیار، گروه آموزش مربیگری، دانشگاه Esenyurt استانبول، ترکیه

۵-دکتری تخصصی، سازمان مرکزی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۶-کارشناسی ارشد، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق، تهران، ایران

۷-دکتری تخصصی، مرکز تحقیقات علوم ورزشی و پزشکی مولکولی شهید میرغنی، گلستان، ایران

یافته / دوره ۲۵ / شماره ۳ / پاییز ۱۴۰۲ / مسلسل ۹۷

چکیده

دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۹/۳ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۸/۱۵

مقدمه: استراتژی‌های افزایش مصرف انرژی یک رویکرد جذاب برای کاهش ذخیره چربی اضافی و وزن بدن برای بهبود سلامت متابولیک است. هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر تمرین هوازی و آدنوزین بر بیان ژن‌های UCP-1 و MAPK p38 بافت چربی زیرپوستی در رت‌های نر تغذیه‌شده با رژیم غذایی پرچرب می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر ۴۰ سر رت به‌طور تصادفی در چهار گروه ۱-کنترل سالم، ۲-کنترل پرچرب، ۳- رژیم غذایی پرچرب+ - آدنوزین و ۴-رژیم غذایی پرچرب+ تمرین استقامتی+ آدنوزین تقسیم شدند. پس از ۱۳ هفته مصرف رژیم غذایی پرچرب، ۱۲ هفته تمرین استقامتی با شدت متوسط (MIT) اجرا شد. بیان UCP-1 mRNA و MAPK p38 با استفاده از روش RT-PCR اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: در گروه رژیم غذایی پرچرب+تمرین استقامتی+ آدنوزین و گروه رژیم غذایی پرچرب+ آدنوزین افزایش معناداری در میزان UCP-1 نسبت به گروه‌های کنترل سالم و کنترل پرچرب مشاهده شد. همچنین بیان MAPK p38 در گروه‌های رژیم غذایی پرچرب+ تمرین استقامتی+ آدنوزین و رژیم غذایی پرچرب+ آدنوزین کاهش معناداری نسبت به گروه کنترل پرچرب داشت.

بحث و نتیجه‌گیری: تمرین استقامتی و آدنوزین ممکن است به‌عنوان فعال‌کننده‌های بیان ژن UCP-1 عمل کرده و از عوامل لیپولیتیک مؤثر در چاقی به کار گرفته شوند. MAPK p38 می‌تواند باعث افزایش جذب گلوکز توسط انسولین شود و فسفوریلاسیون اکسیداتیو میتوکندری به دنبال رژیم غذایی سالم و فعالیت هوازی را به دنبال داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: تمرین استقامتی، آدنوزین، UCP-1، MAPK p38، چاقی.

*آدرس مکاتبه: گلستان، مرکز تحقیقات علوم ورزشی و پزشکی مولکولی شهید میرغنی.

پست الکترونیک: seyedgavadmirghani@yahoo.com

مقدمه

چاقی و اضافه‌وزن، بیماری فراگیر در سطح جهان است و میزان شیوع و مرگ‌ومیر ناشی از آن به‌طور چشمگیری رو به افزایش است. از راه‌های شایع درمان چاقی استفاده از روش اصلاح تغذیه و مکمل‌های غذایی مناسب است. برخی پژوهشگران استفاده از این روش را برای درمان چاقی کافی نمی‌دانند و توأمان، انجام فعالیت بدنی را نیز پیشنهاد می‌کنند (۱). یکی از این راه‌ها تمرین و مصرف آدنوزین است (۴-۲).

آدنوزین یک پورین نوکلئوتید درون‌زاد است که از سلول‌های آسیب‌دیده یا ملتهب آزاد می‌شود (۵). آدنوزین، یکی از متغیرهای بیولوژیکی مؤثر در مسیرهای فیزیولوژیکی است که اثرات خود را از طریق گیرنده‌های آدنوزین (Adenosine receptors :ARs) به نام A1، A2A، A2B و A3 در بافت‌های مختلف انجام می‌دهد.

رهایی آدنوزین توسط ایسکمی، قرارگیری در معرض کاتکولامین‌ها یا تحریک عصب سمپاتیک افزایش می‌یابد (۶). زمانی که بدن دچار کمبود اکسیژن می‌شود، مصرف گلوکز بیشتر می‌شود و یکی از مکانیسم‌های واسطه کننده پیام‌دهی، آدنوزین است که طی انقباض عضلانی از تجزیه ATP خارج سلولی تشکیل می‌شود (۷, ۸) و در همین مدت زمان میزان آدنوزین افزایش می‌یابد (۸).

A2ARs فراوان‌ترین گیرنده آدنوزین در بافت چربی قهوه‌ای انسان و موش است و افزایش آن، باعث قهوه‌ای شدن سلول‌های چربی سفید و درنهایت تبدیل چربی سفید به‌صورت گرما می‌شود. انهدام فارماکولوژیکی یا ژنتیکی A2ARs در موش‌ها باعث کاهش در گرمازایی وابسته به چربی قهوه‌ای (BAT) شد، درحالی‌که درمان با آگونیست‌های A2A به‌طور معنی‌داری هزینه انرژی را افزایش داد. نتایج نشان داد سیگنالینگ A2ARs، نقش فیزیولوژیکی غیر منتظره‌ای در فعال شدن سمپاتیکی بافت چربی قهوه‌ای دارد (۹).

همچنین، پژوهشگران نشان داده‌اند که موش‌هایی که A2ARS شان از بین رفته بود، وقتی در معرض سرما قرار گرفتند، نقص در ترموژنز، مصرف اکسیژن و لیپولیز را داشتند که نشان‌دهنده اهمیت A2ARs در واسطه کردن پاسخ ترموژنیک است (۱۰).

بافت چربی در تعادل روابط بین تغذیه، تعادل انرژی و سلامتی نقش اساسی دارد (۱۱). دو نوع بافت چربی، سفید (WAT) و قهوه‌ای (BAT) با عملکرد و ساختار متفاوت شناخته شدند. WAT قسمت اصلی بافت چربی بدن است و BAT حاوی مقدار زیادی میتوکندری است و توانایی تولید/ ایجاد گرما و محافظت در برابر چاقی را دارد که با پاک کردن تری گلیسیریدها و کاهش مقاومت به انسولین عمل می‌کند. چربی قهوه‌ای انرژی شیمیایی را از طریق بیان پروتئین غیرجفت کننده-۱ (*UCP-1*) به گرما تبدیل می‌کند (۱۲, ۱۳).

مفهوم گرمازایی تطبیقی این است که براثر سرما، تغذیه و عوامل دیگر، بدن برای سازگاری با شرایط، تولید گرما در بدن را افزایش می‌دهد (۱۴). بخشی از گرمازایی در شرایط تطبیقی (Adaptive Thermogenesis) و متابولیسم پایه، از طریق گرمازایی غیرلرزشی(Non Shivering) بروز می‌کند. گرمازایی غیر لرزشی از طریق پروتئین‌های گرمازا (Thermogenin) یا از طریق پروتئین‌های غیرجفت‌کننده (Uncoupling Protein: UCPs) حاصل می‌شود. پروتئین غیرجفت‌کننده-۱ (*UCP-1*) یکی از پروتئین‌های گرمازای مهم محسوب می‌شود (۱۵).

P38 (p38 mitogen-activated protein kinases) در ماکروفاژهای تحریک‌شده با LPS (lipopolysaccharide stimulated macrophages) یافت شده است (۱۶). *MAPK p38* دارای نقش‌های متعددی است که شامل پاسخ‌های

ایمنی، افزایش بیان سایتوکاین‌های پیش التهابی، مولکول‌های چسبان و دیگر مولکول‌های التهابی و تنظیم تکثیر، تمایز و عملکرد ایمنی سلول است (۱۷).

در حال حاضر، تمرین‌های ورزشی (مدل هوازی) به‌عنوان محرک مناسب برای بیان *UCP-1* در بافت چربی سفید مطرح شده است؛ به‌گونه‌ای که اثر هشت هفته تمرین هوازی بر روی تردمیل به همراه مصرف کپسایسین، با افزایش بیان *PGC-1α* و *UCP-1*، بر مسیر قهوه‌ای شدن بافت چربی احشایی موش‌های HFD مؤثر است (۱۸).

در مطالعه‌ای اثر تمرین استقامتی بر بیان پروتئین UCP-1 در بافت چربی سفید زیرپوستی موش‌های صحرایی نر ویستار نشان داد که تمرین استقامتی باعث افزایش در بیان *UCP-1* می‌شود (۱۹). گیرنده‌های بتا-آدرنرژیک از طریق پروتئین کیناز A، *P38* را تحریک می‌کند و همان‌طور که اشاره شد خانواده میتوژن پروتئین کینازها *(MAPK)* خانواده‌ای از پروتئین‌های درگیر در تنظیم رشد، آپوپتوز، التهاب، تمایز و پیشرفت چرخه سلولی هستند و بیان ژن‌های *UCP-1* را کنترل می‌کنند (۲۰).

بااین‌حال، هیچ‌یک از این بررسی‌های گذشته، اثر تمرین هوازی به همراه مکمل‌دهی آدنوزین را بر بیان این ژن و *MAPK P38* را مطالعه نکرده‌اند. بر این اساس، این سؤال مطرح می‌شود که آیا تمرین هوازی و مصرف مکمل آدنوزین می‌تواند میزان بیان ژن‌های *UCP-1* و *P38 MAPK* را تحت تأثیر قرار دهد. بنابراین، در پژوهش حاضر، اثر هم‌زمان تمرین هوازی و آدنوزین بر بیان ژن-های *UCP-1* و *MAPK P38* در بافت چربی زیرپوستی مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

۴۰ سر موش نر صحرایی نژاد ویستار با میانگین وزن اولیه ۱۲۸/۳۲ گرم خریداری گردید و همه آن‌ها به مدت یک هفته، جهت سازگاری با محیط جدید، شرایط مناسب آزمایشگاهی و چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت با میانگین دمای ۳±۲۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس‌ازآن رت‌ها به چهار گروه، کنترل سالم (تعداد=۱۰)، کنترل پرچرب با ۴۰٪ چربی (تعداد=۱۰)، رژیم غذایی پرچرب+ آدنوزین (تعداد=۱۰) و رژیم غذایی پرچرب+ - تمرین استقامتی+ آدنوزین (تعداد=۱۰) تقسیم شدند. پژوهش حاضر در دو مرحله، شامل ۱۳ هفته مرحله چاق کردن و ۱۲ هفته مرحله تمرین انجام گردید.

رژیم غذایی نرمال حاوی ۴/۳۰ کیلوکالری در گرم انرژی بود که شامل ۳/۸۷٪ چربی (روغن سویا)، ۱۷/۴۶٪ پروتئین کازئین، ۶۸/۷٪ کربوهیدرات، ۸/۹۷٪ مواد معدنی و ویتامین ۱٪ بود. هر گرم رژیم غذایی پرچرب نیز حاوی ۵/۸۱ کیلوکالری انرژی بوده است که شامل ۴۰٪ چربی (۲۰٪روغن سویا و۲۰٪روغنی دنبه و پی حیوانی)، ۱۴/۱٪ پروتئین کازئین، ۳۶/۵۸٪ کربوهیدرات، مینرال ۸/۴٪ و ویتامین ۰/۷۲٪ بود. محتویات دارونما از یک ماده بی‌اثر (سالین) استفاده شد و تلاش شد دارونما نزدیک‌ترین شکل و اندازه را نسبت به مکمل اصلی استفاده شده داشته باشد.

تمامی رت‌ها تا زمانی که در سن ۶-۵ هفته به وزن اولیه ۱۲۸/۳۲ گرم برسند از رژیم غذایی نرمال استفاده می‌کردند که پس از تقسیم‌بندی گروه‌ها، تمامی رت-های گروه کنترل سالم و کنترل پرچرب تا نیمه مرحله دوم (پایان هفته ششم از مرحله تمرینی) به‌صورت آزادانه غذا و آب دریافت کردند. مقدار غذای مصرفی رت‌ها در گروه‌های مصرف‌کننده رژیم غذایی پرچرب در آخرین روز از هفته ششم محاسبه و میانگین غذای مصرفی رت‌ها بدست آمد که همه گروه‌ها از ابتدای هفته هفتم تا پایان مرحله تمرینی به‌طور یکسان از این میزان غذا استفاده نمودند.

در ۶ هفته اول از مرحله تمرین در گروه‌های تحت مداخله با آدنوزین، آدنوزین روزی یک‌بار با دوز ۰/۲ Mg/Kg برای هر رت به‌صورت درون صفاقی، ۳ ساعت قبل از تمرین، تزریق می‌شد. پس از ۶ اول هفته تمرین، به‌منظور بررسی میزان اثربخشی در یک طرح هم‌عرض، آدنوزین روزی یک‌بار با دوز Mg/Kg ۰/۴ از ابتدای هفته هفتم تا پایان مرحله تمرین ادامه یافت (۲۱).

رت‌های گروه تمرینی قبل از شروع برنامه ورزشی اصلی و بعد از یک هفته تمرین، با سرعت‌های ۶، ۸ و ۱۰ متر بر دقیقه به‌عنوان مرحله آشنایی با نوارگردان و الگوی دویدن، با استفاده از پروتکل استاندارد تعیین حداکثر سرعت، حداکثر سرعت دویدن در هر رت تا رسیدن به واماندگی ثبت شد به دلیل چاق بودن رت‌ها پروتکل با شیب صفر به پایان رسید. پس از ثبت حداکثر سرعت رسیدن به واماندگی در هر رت میانگین سرعت در تمامی رت‌ها گروه‌های تمرین ثبت شد و مبنای طراحی شدت تمرین هوازی با ۶۰-۶۵٪ میانگین حداکثر سرعت رت‌ها طراحی گردید (جدول ۱) (۲۱).

جدول۱. پروتکل ۱۲ هفته تمرین استقامتی با شدت متوسط(MIT)(متربردقیقه)

مسافت	زمان (دقیقه)	بار (متر بر دقیقه)	دور	هفته
۴۰۲	۱۵:۲۱	۲۰	۱	اول
۴۴۸	۱۷:۳۹	۲۰	۱	دوم
۴۹۴	۱۹	۲۱	۱	سوم
۵۵۵	۲۱:۵۴	۲۱	۱	چهارم
۶۱۶	۲۳:۴۱	۲۲	۱	پنجم
۶۶۰	۲۴:۳۴	۲۳	۱	ششم
۷۴۳	۲۷	۲۴	۱	هفتم
۷۶۳	۲۷:۵۰	۲۴	۱	هشتم
۷۹۲	۲۹:۳	۲۴	۱	نهم
۸۱۱	۲۹:۵۰	۲۴	۱	دهم
۸۳۱	۳۰:۳۸	۲۴	۱	یازدهم
۸۷۰	۳۱	۲۵	۱	دوازدهم

پس از ۲۴ ساعت استراحت و ۱۲-۱۰ ساعت ناشتایی، رت‌ها از طریق تزریق پنتوباربیتال سدیم (۴۰ میلی-گرم/کیلوگرم، داخل صفاقی) بیهوش شدند (۲۲)، پس از بیهوشی کامل، بافت چربی زیرپوستی رت‌ها پس از تشریح و شستشو با محلول سالین، در نیتروژن مایع قرار داده شد و به‌منظور استخراج RNA و آنالیز ژنی به فریزر ۸۰- منتقل گردید. توالی پرایمر ژن‌های مطالعه در جدول زیر نشان داده شده است (جدول ۲).

جدول۲. توالی پرایمر ژن‌های موردمطالعه

ژن	توالی پرایمر*	اندازه (bp)
UCP-1	For: GCC TCT ACG ATA CGG TCC AA Rev: CTG ACC TTC ACC ACC TCT GT	20
MAPK P38	For: GCT TAC CGA TGA CCA CGA TC Rev: TTC ATT CAC AGC GAG GTT GC	20
GAPDH	For: CAT ACT CAG CAC CAG CAT CAC C Rev: AAG TTC AAC GGC ACA GTC AAG G	22

*توالی پرایمرها توسط **Primer-BLAST** طراحی شده است.

ساخت cDNA

مراحل سنتز cDNA طبق پروتکل کیت شرکت سازنده انجام شد. پرایمرهای ژن‌های موردنظر طراحی و ازنظر ویژگی و اختصاصیت بررسی شدند. از RNA تام بافتی، بر اساس توالی پرایمرهای UCP-1، MAPK P38، cDNA به روش رونویسی معکوس سنتز شد. بیان ژن‌ها به روش کمی با استفاده از تکنیک کمی Real-time PCR و تغییرات بیان ژن با استفاده از روش استاندارد $2^{-\Delta\Delta CT}$ مورد ارزیابی قرار گرفت.

Real-time PCR

از تکنیک RT-qPCR جهت تائید بیان ژن‌های موردمطالعه به‌صورت کمی استفاده شد. برای این منظور ابتدا با استفاده از محلول کیازول، RNA کل سلول‌ها طبق پروتکل سیناژن استخراج شد و جهت اطمینان از آلودگی با DNA ژنومیک، در معرض DNase I (Fermentas) قرار گرفت. سپس کیفیت RNAهای استخراج‌شده با دستگاه اسپکترفتومتری (DPI-1, Kiagen) مورد ارزیابی قرار گرفت.

جهت تهیه cDNA تک‌رشته‌ای از پرایمر Oligo dt (MWG-Biotech, Germany) و آنزیم نسخه‌برداری معکوس (Fermentas) و بر اساس پروتکل مربوطه انجام شد. هر واکنش PCR با استفاده از PCR master mix (Applied Biosystems) و SYBER Green در دستگاه ABI Step One (Applied Biosystems, Sequences Detection Systems. Focter City, CA) طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت.

۴۰ سیکل برای هر چرخه Real-Time PCR در نظر گرفته شد و دماهای هر سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه، ۶۰-۵۸ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه تنظیم شدند. نمودار Melting جهت بررسی صحت واکنش‌های PCR انجام شده و به‌صورت اختصاصی برای هر ژن و در هر بار از واکنش به همراه نمودار کنترل منفی جهت بررسی وجود آلودگی در هر واکنش مورد ارزیابی قرار گرفت.

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری به منظور بررسی توزیع طبیعی داده‌ها از آزمون کلموگروف-اسمیرنوف و برای بررسی همگنی واریانس‌ها از آزمون لون استفاده شد. با توجه به توزیع طبیعی داده‌ها به‌منظور مقایسه شاخص‌های کمی بین گروه-های مختلف از آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه برای بررسی و در صورت مشاهده تفاوت معنادار آماری از آزمون توکی جهت تعیین محل اختلاف بین گروهی استفاده شد. تمامی محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۷ در سطح معنی‌داری P <۰/۰۵ انجام شد.

یافته ها

قبل از شروع مرحله چاق شدن میانگین وزن رت‌های گروه‌های کنترل سالم (۲۹/۵۲±۱۵۶/۱۱)، کنترل پرچرب (۱۹/۱۴±۱۶۱/۲۱)، رژیم غذایی پرچرب+آدنوزین (۲۵/۲۰±۱۵۸/۵۲) و رژیم غذایی پرچرب+تمرین استقامتی+آدنوزین (۲۱/۷۴±۱۵۷/۹۶) تفاوت معناداری وجود نداشت.

در نمودار ۱ میانگین و انحراف معیار وزن موش‌ها قبل، بعد از ۱۳ هفته مصرف غذای استاندارد و غذای پرچرب و بعد از ۱۲ هفته تمرین استقامتی نشان داده شده است. وزن رت‌ها بعد از ۱۳ هفته در گروه‌های کنترل سالم، کنترل پرچرب، رژیم غذایی پرچرب+آدنوزین و رژیم غذایی پرچرب+تمرین استقامتی+آدنوزین به ترتیب برابر ۱۴/۳۲±۳۵۶/۴۳، ۱۴/۳۱±۴۲۴/۱۲، ۲۰/۱۴±۴۲۰/۳۳ و ۱۸/۰۹±۳۹۰/۱۲ گرم بود و تفاوت معناداری بین گروه کنترل پرچرب و گروه رژیم غذایی پرچرب+آدنوزین و رژیم غذایی پرچرب+تمرین استقامتی+آدنوزین با گروه کنترل سالم مشاهده شد.

بعد از ۱۲ هفته تمرین تفاوت معنادار بین وزن گروه کنترل پرچرب و گروه رژیم غذایی پرچرب+تمرین استقامتی+-آدنوزین مشاهده شد (جدول ۳). آزمون ناپارامتریک کلموگروف- اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov) نشان داد که میزان فعالیت و بیان ژن‌های موردبررسی از توزیع نرمال برخوردار بودند.

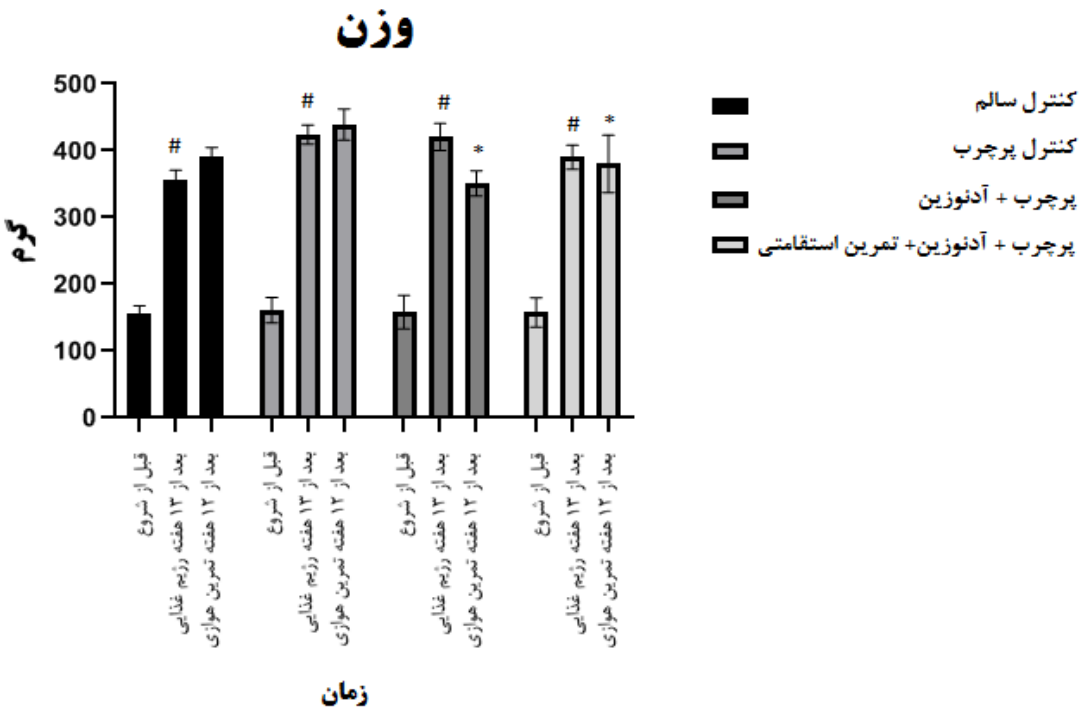
آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه برای مقایسه میانگین متغیرهای موردمطالعه در بین گروه‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفت و در صورت مشاهده معناداری آزمون تعقیبی توکی به کار گرفته شد.

جدول ۳. میانگین و انحراف معیار وزن رت‌ها قبل، بعد از ۱۳ هفته مصرف غذای استاندارد و غذای پرچرب و بعد از ۱۲ هفته تمرین استقامتی

گروه	قبل از شروع میانگین ± انحراف معیار	بعد از ۱۳ هفته رژیم غذایی میانگین ± انحراف معیار	بعد از ۱۲ هفته تمرین استقامتی میانگین ± انحراف معیار
کنترل سالم	۱۵۶/۲۹±۱۱/۵۲	۳۵۶/۴۳±۱۴/۳۲	۳۹۰/۴۳±۱۴/۳۲
کنترل پرچرب	۱۶۱/۲۱±۱۹/۱۴	۴۲۴/۱۲±۱۴/۳۱	۴۳۸/۹۲±۲۳/۴۰
رژیم غذایی پرچرب+آدنوزین	۱۵۸/۵۲±۲۵/۲۰	۴۲۰/۳۳±۲۰/۱۴	۳۵۰/۷۴±۱۸/۹۸
رژیم غذایی پرچرب+تمرین استقامتی+آدنوزین	۱۵۷/۹۶±۲۱/۷۴	۳۹۰/۱۲±۱۸/۰۹	۳۸۰/۱۹±۴۳/۰۵
P–مقدار	۰/۱۲۱	۰/۰۰۱*	۰/۰۰۱>*

*وجود اختلاف معنادار در سطح خطای ۵ درصد

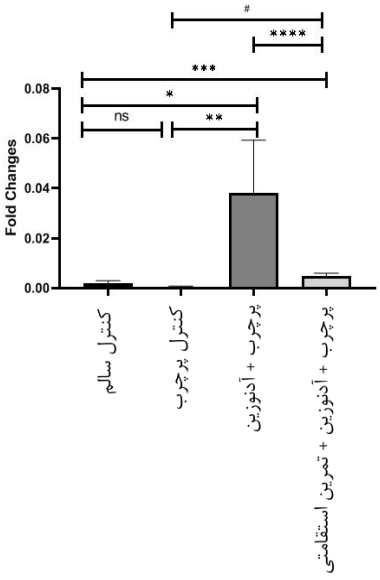
نتایج نشان داد بیان *UCP-1* و متغیر *MAPK P38* بین گروه‌ها تفاوت معنادار وجود دارد (نمودار ۲ و ۳) و این تفاوت‌ها با توجه به نتایج آزمون تعقیبی توکی در میزان بیان *UCP-1* بین گروه کنترل سالم و گروه کنترل پرچرب وجود نداشت. از سویی دیگر بین گروه‌های کنترل پرچرب و رژیم غذایی پرچرب+ آدنوزین تفاوت معناداری مشاهده شد. میزان بیان *UCP-1* در گروه رژیم غذایی پرچرب+آدنوزین بیشتر بود. بین گروه رژیم غذایی پرچرب+ تمرین استقامتی+ آدنوزین و رژیم غذایی پرچرب+ آدنوزین تفاوت معناداری مشاهده گردید. در گروه رژیم غذایی پرچرب+ آدنوزین میزان بیان UCP-1 بالاتر بود. همچنین نتایج آزمون توکی در میزان *P38 MAPK* بین گروه‌ها تفاوت معناداری وجود داشت که میزان *MAPK P38* در گروه کنترل پرچرب از سایر گروه-ها بیشتر بود.



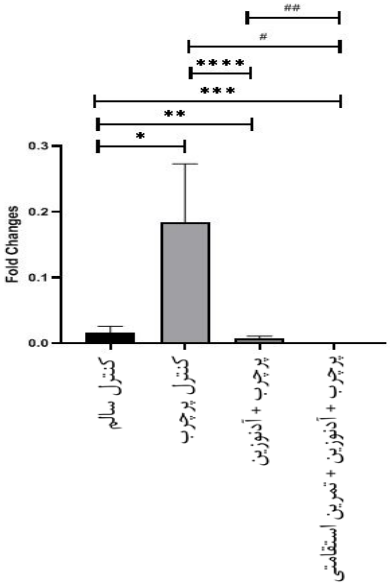
نمودار ۱. میانگین و انحراف معیار وزن موش‌ها قبل، بعد از ۱۳ هفته مصرف غذای استاندارد و غذای پرچرب و بعد از ۱۲ هفته تمرین استقامتی(میله خطا نشان‌دهنده انحراف معیار است)

#افزایش معنادار نسبت به قبل از شروع

* کاهش معنادار نسبت به بعد از ۱۳ هفته رژیم پرچرب



نمودار۲. مقایسه بیان UCP-1 در گروه‌ها(میله خطا نشان‌دهنده انحراف معیار است) (ns = غیر معنادار، *#= معنادار)



نمودار۳. مقایسه بیان MAPK P38 در گروه‌ها(میله خطا نشان‌دهنده انحراف معیار است) (ns = غیر معنادار، *#= معنادار)

بحث و نتیجه‌گیری

هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر تمرین استقامتی به همراه آدنوزین بر بیان ژن‌های UCP-1 و MAPK p38 بافت چربی زیرپوستی در رت‌های نر ویستار تغذیه‌شده با رژیم غذایی پرچرب بود. نتایج نشان داد بیان ژن UCP-1 بین گروه‌ها تفاوت معنادار داشت و این تفاوت با توجه به نتایج آزمون تعقیبی توکی در میزان بیان ژن UCP-1 بین گروه کنترل سالم و گروه کنترل پرچرب وجود نداشت. در بیان ژن *UCP-1* چربی زیرپوستی نتایج تحقیق حاضر با مطالعات نورهیم و همکاران ۲۰۱۴ (۲۳)، استنفورد و همکاران ۲۰۱۵ (۲۴)، افشاری و همکاران ۱۳۹۶ (۲۵) و دانشیار و همکاران ۱۳۹۴ (۲۶) همسو بود. تمرین هوازی و تزریق آدنوزین به‌طور مستقل منجر به افزایش معنادار بیان ژن UCP-1 در بافت چربی زیرپوستی در رت‌های نر گردید که این نتایج هم‌راستا با نتایج مطالعه یزدی ۲۰۱۸ بود (۲). میزان بیان *MAPK P38* بین هر چهار گروه تفاوت معناداری وجود داشت که کاهش معنادار میزان بیان *P38 MAPK* را نسبت به گروه کنترل سالم را نشان داد. همچنین تفاوت معناداری بین گروه‌های کنترل پرچرب و رژیم غذایی پرچرب+ آدنوزین (کاهش میزان بیان*P38 MAPK*) مشاهده شد. از سویی دیگر، میزان بیان*P38 MAPK* بین گروه رژیم غذایی پرچرب+ تمرین استقامتی+ آدنوزین و رژیم غذایی پرچرب+ آدنوزین تفاوت معنادار داشت (کاهش میزان بیان *MAPK P38*) که نتایج حاصله در راستای نتایج مطالعات کوکران و همکاران ۲۰۱۴ (۲۷) و بنگال و همکاران ۲۰۲۰ (۲۸) بود اما لودلو و همکاران ۲۰۱۷ (۲۹) و کومبس و همکاران۲۰۱۵ (۳۰) نتایج متناقضی را نشان دادند. Pekkala و همکاران نیز نشان دادند که تمرینات High intensity training interval و Moderate intensity interval training به مدت ۱۲ هفته در مقابله با افزایش وزن ناشی از ۱۳ هفته رژیم غذایی پرچرب یکسان عمل می‌کنند. از سویی دیگر تزریق آدنوزین می‌تواند از افزایش وزن جلوگیری کند و به‌عنوان درمان چاقی مطرح گردد (۳۱).

از دلایل ناهمسو بودن می‌توان به تفاوت در آزمودنی‌ها و مدت‌زمان تمرین اشاره کرد. رژیم غذایی پرچرب و تمرین هوازی با فعال کردن ژن‌های مسیرهای لیپوژنیک، سنتز لیپیدها را کنترل می‌کند و سیگنالینگ انسولین سنتز اسیدهای چرب و کلسترول را تحریک می‌کند.

چاقی یک بی‌نظمی چندعاملی است. تغییر سبک زندگی ازجمله مصرف رژیم غذایی پرچرب و کاهش فعالیت بدنی از عوامل مهم دخیل در افزایش شیوع چاقی در بسیاری از کشورها می‌باشند (۳۲). ازاین‌رو با اصلاح سبک زندگی به‌ویژه تغییر در رژیم غذایی و تمرین ورزشی، تا حد زیادی می‌توان از بروز و شیوع چاقی جلوگیری کرد. در این راستا به خوبی نشان داده‌شده است که تمرین ورزشی فواید سلامتی زیادی را به همراه داشته و به‌عنوان بخش اساسی در پیشگیری و درمان چاقی و بسیاری از بیماری‌های مرتبط با آن مانند؛ دیابت نوع دو و بیماری‌های قلبی عروقی در نظر گرفته می‌شود (۳۳-۳۵). تمرین ورزشی می‌تواند چاقی و بیماری‌های مرتبط با آن را از طریق کنترل وزن (کاهش وزن و جلوگیری از افزایش وزن) بهبود بخشد و همچنین می‌تواند باعث بهبود نیمرخ متابولیکی افراد چاق شود (۳۶). در مطالعه انجام‌شده در سال ۲۰۱۹ نشان داده شده است که اجرای تمرین مقاومتی به مدت ۱۲ هفته در رت‌های با رژیم غذایی پرچرب، منجر به بهبود شاخص های انتروپومتریکی شده است (۳۷, ۳۸).

در مطالعه حاضر تمرین استقامتی و آدنوزین با افزایش معنی‌دار بیان *UCP-1* چربی زیرپوستی و کاهش بیان *MAPK P38* همراه بود. عوامل محیطی، دارویی و تغذیه‌ای متعددی در القای بیان *UCP-1* در بافت چربی سفید نقش دارند. مهم‌ترین این عوامل، مصرف غذای پرچرب، افزایش هورمون‌های کاتاکولامینی افزایش هورمون تیروئید و افزایش شبه هورمون آیرزین است. آیریزین می‌تواند بیان *UCP-1*را در سلول‌های چربی بدن تنظیم کرده و منجر به افزایش چربی قهوه‌ای شود. فعالیت ورزشی طولانی‌مدت در موش‌ها نیز با افزایش *UCP-1* و قهوه‌ای شدن بافت چربی زیرجلدی همراه بوده است.

فعال شدن *p38* نه‌تنها به نوع محرک بلکه به نوع سلول هم‌بستگی دارد که این باعث طیف وسیعی از پاسخ‌ها و عملکردها می‌شود که این نشان‌دهنده‌ی پیچیدگی مسیر *p38* است. در سلول‌های التهابی معمولاً ایزوفرم آلفا بیان می‌شود. آنزیم *MAPKK* تنظیم‌کننده *p38*، *MKK3* و *MKK6* است. *MKK3* به‌صورت کاملاً انتخابی عمل می‌کند و ایزوفرم‌های آلفا و بتا را فعال می‌کند اما *MKK6* همه‌ی ایزوفرم‌ها را فعال می‌کند. *MKK4* که فعال‌کننده‌ی *JNK* است در سلول‌های خاصی باعث فعال شدن ایزوفرم‌های نوع آلفا و سیگما می‌شود. این موضوع نشان‌دهنده‌ی این است که تنظیم‌کننده‌های مختلفی می‌توانند p38 را کنترل کنند که باعث محدوده وسیعی از عملکردها می‌شوند.

نقش ورزش در کنترل مقادیر *MAPK P38* و فشار اکسایشی مهم است. به‌نحوی‌که برخی از مطالعات به کاهش *MAPK P38* و برخی دیگر به عدم اثر و یا افزایش آنها در اثر ورزش اشاره دارند. شواهد حاکی از آن است که *MAPK P38* در تنظیم جذب گلوکز در پاسخ به محرک‌های مختلف، احتمالاً از طریق تعدیل فعالیت ذاتی *GLUT1* یا *GLUT4* شرکت می‌کند (۳۹, ۴۰). در پژوهش حاضر تمرین استقامتی به همراه آدنوزین باعث کاهش بیان *MAPK P38* گردید که می‌تواند به دلیل کاهش جذب گلوکز باشد (۴۰).

با توجه به نتایج مطالعه حاضر، تمرین استقامتی و آدنوزین می‌توانند به‌عنوان محرک مناسب برای *UCP-1* باشند و از طریق افزایش بیان *UCP-1* در کاهش وزن و جلوگیری از چاقی به دنبال مصرف رژیم غذایی پرچرب نقش داشته باشند. مسیر *MAPK P38* یک شمشیر دو لبه است که باعث افزایش جذب گلوکز به انسولین و

فسفوریلاسیون اکسیداتیو میتوکندری در یک سبک زندگی سالم می‌شود، درحالی‌که در سبک‌های زندگی ناسالم، همان فرآیندهای سیگنالینگ انسولین را مهار می-کند و منجر به سندرم متابولیک می‌شود.

تشکر و قدردانی

مقاله حاصل از طرح پژوهشی بوده که نویسندگان این مقاله کمال تشکر و قدردانی را از مرکز تحقیقات علوم ورزشی و پزشکی مولکولی شهید میرغنی به‌منظور در اختیار قرار دادن امکانات خود را داریم.

تعارض منافع

نویسندگان تصریح می‌کنند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

حمایت مالی

نویسندگان مقاله از هیچ‌گونه حمایت مالی برخوردار نبودند.

مشارکت نویسندگان

همه نویسندگان در نگارش اولیه مقاله یا بازنگری آن سهیم بودند و همه با تائید نهایی مقاله حاضر، مسئولیت دقت و صحت مطالب مندرج در آن را می‌پذیرند.

ملاحظات اخلاقی و درج کد اخلاق

این مطالعه تجربی مورد تائید کمیته اخلاق پژوهشگاه علوم ورزشی با کد IR.SSRI.REC.1395.115 است که سال ۱۴۰۰ و در مرکز تحقیقات علوم ورزشی شهید میرغنی(گلستان) انجام شد.

References

1. Moradi F, Heidari S, Pejhan A. Effect of 12-Week Aerobic Training on Serum Levels of Interleukin-18 and High-Sensitivity C-reactive Protein in Sedentary Obese Men. Journal of Sabzevar University of Medical Sciences. 2016;23(4):714-23. (In Persian).
2. Barjaste Yazdi A, Azarbayjani MA, Matin Homaee H, Peeri M, Torabi F, Ramezani Z. The effect of endurance training and adenosine consumption on the a1ar gene expression in the visceral adipose tissue of obese male rats. Metabolism and Exercise. 2017 Nov 22;7(2):115-24. (In Persian).
3. Orban A, Garg B, Sammi MK, Bourdette DN, Rooney WD, Kuehl K, et al. Effect of High-Intensity Exercise on Multiple Sclerosis Function and Phosphorous Magnetic Resonance Spectroscopy Outcomes. Medicine and science in sports and exercise. 2.6-1380:(7) 51;019.
4. Ballard HJ. ATP and adenosine in the regulation of skeletal muscle blood flow during exercise. Sheng li xue bao : [Acta physiologica Sinica]. 2014;66(1):67-78.
5. Tang Z, Ye W, Chen H, Kuang X, Guo J, Xiang M, et al. Role of purines in regulation of metabolic reprogramming. Purinergic signalling. 2019;15(4):423-38.
6. Eisenstein A, Ravid K. G protein-coupled receptors and adipogenesis: a focus on adenosine receptors. J Cell Physiol. 2014;229(4):414-21.
7. Lynge J, Juel C, Hellsten Y. Extracellular formation and uptake of adenosine during skeletal muscle contraction in the rat: role of adenosine transporters. J Physiol. 2001;537(Pt 2):597-605.
8. Heinonen I, Kemppainen J, Kaskinoro K, Peltonen JE, Sipilä HT, Nuutila P, et al. Effects of adenosine, exercise, and moderate acute hypoxia on energy substrate utilization of human skeletal muscle. American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology. 2012;302(3):R385-90.
9. Gnad T, Scheibler S, von Kügelgen I, Scheele C, Kilić A, Glöde A, et al. Adenosine activates brown adipose tissue and recruits beige adipocytes via A2A receptors. Nature. 2014;516(7531):395-9.
10. Rines AK, Verdeguer F, Puigserver P. Adenosine activates thermogenic adipocytes. Cell research. 20.6-155:(2)25;15.
11. Hall KD, Guo J. Obesity Energetics: Body Weight Regulation and the Effects of Diet Composition. Gastroenterology. 2017;152(7):1718-27.e3.
12. Yang X, Bi P, Kuang S. Fighting obesity: When muscle meets fat. Adipocyte. 2014;3:280-9.
13. Saely CH, Geiger K, Drexel H. Brown versus white adipose tissue: a mini-review. Gerontology. 2012;58(1):15-23.
14. Taylor NA. Human heat adaptation. Comprehensive Physiology. 2014;4(1):325-65.
15. Hara H, Takahashi H, Mohri S, Murakami H, Kawarasaki S, Iwase M, et al. β-Cryptoxanthin Induces UCP-1 Expression via a RAR Pathway in Adipose Tissue.

Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2019;67(38):10595-603.
16. Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. The Biochemical journal. 2010;429(3):403-17.
17. Tomida T, Adachi-Akahane S. [Roles of p38 MAPK signaling in the skeletal muscle formation, regeneration, and pathology]. Nihon yakurigaku zasshi Folia pharmacologica Japonica. 2020;155(4):241-7.
18. Mostafavian M, Abdi A, Mehrabani J, Barari A. Effect of Eight Weeks of Aerobic Progressive Training with Capsaicin on Changes in PGC-1α and UPC-1 Expression in Visceral Adipose Tissue of Obese Rats With Diet. complementary Medicine Journal. 2020;10(2):106-17.
19. Daneshyar S, Kordi M, Kadivar M, Afshari S. Effect of Endurance Training on miR-196a and miR-133a Expression in Subcutaneous White Adipose Tissue of Wistar Rats. Journal of Sport and Exercise Physiology. 2019;12(1):1-12. (In Persian).
20. Inagaki T, Sakai J, Kajimura S. Transcriptional and epigenetic control of brown and beige adipose cell fate and function. Nature reviews Molecular cell biology. 2016;17(8):480-95.
21. Mirghani SJ, Peeri M, Yaghoobpour Yekani O, Zamani M, Feizolahi F, Nikbin S, et al. Role or Synergistic Interaction of Adenosine and Vitamin D3 Alongside High-Intensity Interval Training and Isocaloric Moderate Intensity Training on Metabolic Parameters: Protocol for an Experimental Study. JMIR research protocols. 2019;8(1):e10753.
22. Eslami Z, Mohammadnajad PanahKandi Y, Sharifian S, Eghbal Moghanlou A, Sheikh SR, Mirghani SJ. Evaluation of the effect of aerobic exercise on UCP1 and MAPK p38 heat factor gene expression in subcutaneous adipose tissue in male Wistar rats fed a high-fat diet. Feyz Medical Sciences Journal. 2021;25(4):1020-30.
23. Norheim F, Langleite TM, Hjorth M, Holen T, Kielland A, Stadheim HK, et al. The effects of acute and chronic exercise on PGC-1α, irisin and browning of subcutaneous adipose tissue in humans. The FEBS journal. 2014;281.٤٩-٧٣٩:(٣)
24. Stanford KI, Middelbeek RJ, Goodyear LJ. Exercise Effects on White Adipose Tissue: Beiging and Metabolic Adaptations. Diabetes. 2015;64(7):2361-8.
25. Afshari S, Mohammad-Amoli M, Daneshyar S. Comparison of Moderate and High Volume Aerobic Training on Gene Expression of Uncoupling Protein 1 (UCP-1) in Subcutaneous White Adipose Tissue of Wistar Rats. Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism. 2017;19(1):34-40. (In Persian).
26. Daneshyar S, Kordi MR, Gaeini AA, Kadivar M, Afshari S. The effect of endurance training on gene expression of uncoupling protein 1(UCP-1) in white visceral adipose tissue of retroperitoneal depot of male Wistar rats. Razi Journal of Medical Sciences. 2015;22(136):35-45.

27. Cochran AJ, Percival ME, Tricarico S, Little JP, Cermak N, Gillen JB, et al. Intermittent and continuous high-intensity exercise training induce similar acute but different chronic muscle adaptations. Experimental physiology. 2014;99(5):782-91.
28. Bengal E, Aviram S, Hayek T. p38 MAPK in Glucose Metabolism of Skeletal Muscle: Beneficial or Harmful? International journal of molecular sciences. 2020;21(18).
29. Ludlow AT, Gratidão L, Ludlow LW, Spangenburg EE, Roth SM. Acute exercise activates p38 MAPK and increases the expression of telomere-protective genes in cardiac muscle. Experimental physiology. 2017;102(4):397-410.
30. Combes A, Dekerle J, Webborn N, Watt P, Bougault V, Daussin FN. Exercise-induced metabolic fluctuations influence AMPK, p38-MAPK and CaMKII phosphorylation in human skeletal muscle. Physiological reports. 2015;3(9).
31. Pekkala S, Rafiei MM, Eslami Z, Ghaderi M, Moghanlou AE, Sharifian S, et al. High-intensity interval training and moderate intensity training with exogenous adenosine counteract development of obesity in rats. Science & Sports. 2022;37(5):477-85.
32. Rahmani A, Sayehmiri K, Asadollahi K, Sarokhani D, Islami F, Sarokhani M. Investigation of the Prevalence of Obesity in Iran: a Systematic Review and Meta-Analysis Study. Acta medica Iranica. 2015;53(10):596-607.
33. Arias-Loste MT, Ranchal I, Romero-Gómez M, Crespo J. Irisin, a link among fatty liver disease, physical inactivity and insulin resistance. International journal of molecular sciences. 2014;15(12):23163-78.
34. Besse-Patin A, Montastier E, Vinel C, Castan-Laurell I, Louche K, Dray C, et al. Effect of endurance training on skeletal muscle myokine expression in obese men: identification of apelin as a novel myokine. International journal of obesity (2005). 2014;38(5):707-13.
35. De Feo P. Is high-intensity exercise better than moderate-intensity exercise for weight loss? Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD. 2013;23(11):1037-42.
36. Seyed Javad Mirghani HA-A, Mohammad Ali Azarbayjani, Sajad Arshadi, Ahmad Mazidi, Seyed Ali Mirghani. Effect of 8 weeks concurrent training on blood lipid profile and body mass index in young men. International Medical Journal. 2012;19(3):260-3.
37. Mirghani SJ, Azarbayjani MA, Peeri M, keshtkar A. Investigating Effects of Vitamin D Injection during a Course of Endurance Training On Anthropometrical Parameters of Wistar Rats with High-Fat Diet-Induced Obesity. Medical Laboratory Journal. 2019;13(6):36-43.
38. Mirghani SJ, Azarbayjani MA, Peeri M. Effects of Endurance Training and Isocaloric High Intensity Interval Training on Anthropometric Indices and Insulin

Resistance in High Fat Diet-Fed Wistar Rats. Medical Laboratory Journal. 2018;12(6):12-8.

39. Nicoll JX, Fry AC, Mosier EM, Olsen LA, Sontag SA. MAPK, androgen, and glucocorticoid receptor phosphorylation following high-frequency resistance exercise non-functional overreaching. European journal of applied physiology. 2019;119(10):2237-53.

40. Willkomm L, Gehlert S, Jacko D, Schiffer T, Bloch W. p38 MAPK activation and H3K4 trimethylation is decreased by lactate in vitro and high intensity resistance training in human skeletal muscle. PloS one. 2017;12(5):e0176609.

The effect of endurance training combined with adenosine on the gene expression of UCP-1 and MAPK p38 in subcutaneous adipose tissue of male Wistar rats fed a high -fat diet

Eslami Z[1], Mohammad nezhad panah kandi Y[2], Ghaderi M[3], Eghbal Moghanlou Ar[4], Sharifian Sh[5], Beyshami Gh[6], Mirghani SJ[7*]

1. PhD candidate, Department of Clinical biochemistry, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
2. PhD, Department of Sports Physiology, Islamic Azad University, Islamshahr Branch, Iran
3. Assistant Professor, Department of Sport Sciences, Nahavand Higher Education Complex, BU-Ali Sina University, Hamadan, Iran
4. Assistant Professor, Istanbul Esenyurt University, Physical Education and Sports High School, Coaching Education Department, Istanbul, Turkey
5. PhD, Department of Sport Studies and Planning, Central Organization, Islamic Azad University, Tehran, Iran
6. Msc, Department of Exercise Physiology, Islamic Azad University, East Tehran Branch, Tehran, Iran
7. PhD, Shahid Mirghani Research institute, Golestan, Iran, seyedgavadmirghani@yahoo.com

Received: *2022/11/24* Accepted: *2023/11/6*

Abstract

Background: Strategies to increase energy expenditure are an attractive approach to reduce excess fat storage and body weight to improve metabolic health. The aim of the present study was to investigate the effects of endurance training combined with adenosine injection on the gene expression of UCP-1 and MAPK p38 in the subcutaneous adipose tissue of male rats fed a high-fat diet.

Materials and Methods: Forty rats were randomly divided into 4 groups: 1. normal control, 2. high-fat diet (HFD) control, 3. HFD + adenosine, and 4. HFD + endurance training + adenosine. After 13 weeks of HFD, 12 weeks of endurance training on a moderate-intensity treadmill was performed. UCP-1 and MAPK p38 mRNA levels were measured by RT-PCR.

Results: A significant increase in UCP-1 was observed with in HFD + endurance training + adenosine and HFD + adenosine compared to normal and HFD controls. A significant decrease in MAPK p38 was also observed with HFD + endurance training + adenosine and HFD + adenosine compared to HFD.

Conclusion: Endurance training and adenosine are likely activators of UCP-1 gene expression and can be used as effective lipolytic agents in obesity. The MAPK p38 pathway increases glucose uptake by insulin and also induces oxidative phosphorylation in mitochondria following a healthy diet and aerobic activity.

Keywords: Adenosine, Endurance training, Obesity, Protein-1, P38 Mitogen-Activated Protein Kinase,Uncoupling.

Citation: Eslami Z, Mohammad nezhad panah kandi Y, Ghaderi M, Eghbal Moghanlou Ar, Sharifian Sh, Beyshami Gh, Mirghani SJ. The effect of endurance training combined with adenosine on the gene expression of UCP-1 and MAPK p38 in subcutaneous adipose tissue of male Wistar rats fed a high -fat diet. Yafte. 2023; 25(3):66-79.