پژوهش در علوم ورزشی
شمارهٔ شانزدهم، ص‌ص ۶۹-۷۹
دریافت ۸۵/۱۰/۱۷
پذیرش ۸۶/۹/۲۹

تمرین استقامتی سبب افزایش بیان ژن AGRP در عضله، اسکلتی موش‌های صحرایی نر می شود

دکتر سید علیرضا حسینی کاخک[1]، دکترعباس قنبری نیاکی[2]، دکتر فاطمه رهبری‌زاده[3]، اعظم رحیم پور[4]

۱.استادیار دانشگاه تربیت معلم سبزوار، ۲. استادیار دانشگاه تربیت مدرس، ۳. استادیار دانشگاه تربیت مدرس، ۴. دانشجوی دکتری بیوشیمی‌بالینی پزشکی استتیتو پاستور ایران

چکیده

پروتئین وابسته به آگوتی (AGRP)، یک پپتاید قوی اشتهاآور است که بیشتر از بخش میانی هسته‌های کمانی هیپوتالاموس ترشح می‌شود و نقش مهمی در کنترل مرکزی رفتار دریافت غذا دارد و نشان داده شده که در تنظیم وزن بدن دخالت داشته ودر گردش خون موش‌های صحرایی وجود دارد. در شرایطی چون ناشتایی و چاقی، سطح این پروتئین در پلاسما افزایش می یابد.AGRP در بافت‌هایی چون مغز، آدرنال، بافت چربی، ریه و بیضه چندین گونه شناسایی شده است.

هدف از تحقیق حاضر،بررسی اثر یک دوره تمرین استقامتی بر بیان ژن AGRP در عضلهٔ اسکلتی (راست‌رانی) موش‌های صحرایی نر بود.بدین منظور، ۲۰ سر موش صحرایی نر از نژاد ویستار با وزن ۲۰ ± ۲۸۰ گرم به‌طور تصادفی به دو گروه شاهد و تجربی تقسیم شدند. گروه تجربی با شدت ۳۸ متر در دقیقه، هر جلسه به مدت ۶۰ دقیقه، ۵ روز در هفته و در مجموع به مدت ۱۰ هفته، به تمرین روی نوار گردان پرداختند. ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسهٔ تمرین و پس از یک شب کامل ناشتایی ،موش‌ها بیهوش شدند و بافت عضلهٔ راست‌رانی به‌سرعت جدا شد و بیان ژن در آن به کمک روش نیمه‌کمی RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت.

نتیجهٔ تحقیق حاکی از آن بود که تمرین استقامتی با شدت یادشده ،به تنظیم افزایشی ژن AGRP در عضلهٔ اسکلتی منجر شد و این افزایش نسبت به گروه شاهد معنی‌دار بود($p<0.001$).

نتیجهٔ این تحقیق ،نقش AGRP را در تعادل و هموستاز انرژی سلول تایید می‌کند، به‌طوری که تمرین سبب کاهش سطح ذخایر انرژی سلول عضله شده و این خود سبب پراشتهایی موضعی در عضله می‌شود که به موجب آن بیان ژن مذکور افزایش می‌یابد تا با اثر مرکز اصلی تنظیم تعادل انرژی در هیپوتالاموس به بازیافت و تامین انرژی کمک کند. شاید از این منظر AGRP به‌عنوان بخشی از سازوکار فراجبرانی گلیکوژن درعضله نیز مطرح باشد.

واژه های کلیدی: AGRP ، موش صحرایی، بیان ژن، تمرین، RT-PCR.

مقدمه

مواردی همچون تعادل بیرونی و درونی انرژی[۱]، تنظیم وزن، رفتار دریافت غذا[۲] و هزینهٔ انرژی[۳]، همواره از موضوع‌های مهم و مورد علاقهٔ محققان در حوزهٔ فیزیولوژی ورزش و همچنین فارماکولوژی، پاتولوژی و بهداشت بوده است(۶، ۱۱، ۱۲، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۷، ۸، ۹، ۱۰). تعادل انرژی[۴] را می‌توان پایهٔ این مباحث دانست که براساس آن همواره باید تعادلی بین دریافت و هزینهٔ انرژی وجود داشته باشد تا وزن طی دورهٔ زمانی به‌نسبت طولانی ثابت باقی بماند. در غیر این‌صورت، این موازنه به هم خواهد خورد و وزن افزایش یا کاهش خواهد یافت(۴، ۵، ۱۵). دور شدن ارگانیسم (و از جمله انسان) از وزن طبیعی و مطلوب ،ممکن است مخاطراتی را به‌وجود آورد یا حتی سبب مرگ شود(۶، ۱۴).

عدم موفقیت افراد در کنترل وزن، محققان را مدت‌هاست به این فکر واداشته است که چه سازوکارهایی در این پدیده دخالت دارند (۴).بررسی‌های مختلف در حوزه‌های تعادل انرژی، چاقی و روابط این دو،نقش مهم دستگاه عصبی مرکزی و به‌ویژه هیپوتالاموس را در این موضوع،مشخص کرده و عوامل مهمی را به‌عنوان میانجی برای تاثیرگذاری بر روند تعادل انرژی معرفی کرده است.هیپوتالاموس دارای مجموعه‌های نرونی است که دو دستهٔ اصلی نروپپتایدهای اشتهاآور و

---

۱. Energy homostasis
۲. Food intake behavior
۳. Energy expenditure
۴. Energy equilibrium

ضداشتها را تولید می کنند. یکی از مهم‌ترین پپتایدهای اشتهاآور(و شاید مهم‌ترین آنها)، پروتئین وابسته به آگوتی یا[1] AGRP است(۱۲،۱۰).

AGRP اولین بار در سال ۱۹۹۷ توسط شاتر کشف شد. AGRP انسانی یک ژن به‌نسبتاکوتاه به طول 1.1 kb است که بر روی کروموزوم 16 q 22 (و در موش بر روی کروموزوم $8D_1$-D_2) قرار دارد(۱۷)، نقش AGRP در بسیاری از حیوانات در هموستاز انرژی مشخص شده است (۱۷). ولی نقش آن در بافت‌های محیطی از جمله عضلهٔ اسکلتی هنوز به خوبی روشن نیست. AGRP یک ژن کاندید برای چاقی انسان و یک پپتاید موثر و قوی در تحریک اشتها شناخته شده است(۲۱ ،۲۰) که در رفتار دریافت غذا، انتخاب غذا، تنظیم وزن و هموستاز انرژی نقش مهمی را دارد (۲۲،۲۳)، به‌طوری که سطح پلاسمایی آن در افراد چاق بیشتر از افراد معمولی است (۱۸). در موش‌های تراریخته که دارای تظاهر بیش از حد AGRP هستند پرخاشگری، چاقی و ابتلا به دیابت افزایش می‌یابد (۲۵،۲۶). AGRP نقش بسیار مشابهی را در انسان و رت بازی می کند و در گردش خون عمومی بدن و پلاسمای انسان و رت قابل تشخیص است (۱۸).

در تلاش برای شناسایی سازوکارهای AGRP تحقیقاتی صورت گرفته، اما سازوکار دقیق آن به‌ویژه در بافت‌های محیطی ناشناخته مانده است (۱۷).

تعادل انرژی درسلول از عوامل مختلفی مانند تمرین و فعالیت بدنی تاثیرمی‌پذیرد. تمرین با ایجاد تغییرات متابولیکی از راه بر هم زدن شارژ انرژی سلولی، تقاضای سوخت سلول را در جهت تامین انرژی مورد نظر برای ادامهٔ حیات سلول افزایش می‌دهد. بافت‌های مختلف بدن، هر یک به نحوی در این فرایند دخالت دارند، اما با توجه به اینکه عضلهٔ اسکلتی از لحاظ سوخت وساز بافتی بسیار فعال است و بیش از ۴۰ درصد وزن انسان و بیشتر پستانداران را تشکیل می‌دهد، ازاین نظر، منحصر به فرد است. امروزه به‌خوبی پذیرفته شده است که تمرینات استقامتی موجب کاهش وزن می شوند. بنابراین برپایهٔ آنچه دربارهٔ AGRP و تمرین در زمینهٔ تعادل انرژی وتنظیم وزن ذکر شد، این تحقیق طراحی شد تا نشان دهد که آیا تمرین استقامتی می‌تواند به‌عنوان یک محرک، تغییراتی را در mRNA AGRP در بافت عضلهٔ اسکلتی موجب شود؟ پاسخ به این پرسش با بررسی بیان ژن در سطح mRNA (اولین سطحی که تغییرات در آن روی می‌دهد) امکان‌پذیر می‌شود. به‌نظر می‌رسد تا کنون

۱.Agouti-related protein

تحقیقی که اثر دویدن روی نوار گردان را بر بیان ژنAGRP در عضلهٔ اسکلتی موش‌های صحرایی بررسی کرده باشد،انجام نشده است. با این حال به‌احتمال فقط یک تحقیق در زمینهٔ تمرین وجود دارد، به‌طوری که ریجک و همکاران(۲۰۰۵) اثر دویدن داخل چرخ را بر نظام AGRP و NPY در هیپوتالاموس موش‌های صحرایی بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که فعالیت اختیاری داخل چرخ سبب افزایش بیان AGRP در هیپوتالاموس می‌شود(۳۱).بنابراین همان‌گونه که گفته شد، اثر دویدن روی نوار گردان بر بیان ژن یادشده در عضلهٔ اسکلتی مشخص نیست و این پژوهش در صدد است تا(شاید) برای اولین بار این مسئله را به بوتهٔ آزمایش بگذارد.

مواد و روش ها

حیوانات (موش‌ها)

۲۰ موش نر سفید از نژاد ویستار (Wistar rat)، به سن ۵ ماه و وزن ۲۰±۲۸۰ گرم درشرایط کنترل‌شدهٔ نور (۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی)، دما (۱ ± ۲۳ درجهٔ سانتیگراد) و رطوبت (۳ ± ۵۰ درصد) در قفس‌های مخصوص نگهداری شدند. موش‌ها آزادانه به آب و غذای استاندارد دسترسی داشتند و در سرتاسر دورهٔ تحقیق، توسط یک نفر جابه‌جا و دستکاری می شدند. موش‌ها پس از یک هفته آشنایی با فضای آزمایشگاه و دستکاری توسط انسان، به‌طور تصادفی به دو گروه شاهد و تجربی همسان از لحاظ وزن تقسیم شدند.

طرح تحقیق و برنامهٔ تمرین

این تحقیق از نوع تجربی با گروه شاهد و تجربی است. برنامهٔ تمرینی بدین صورت بود که پس از تقسیم موش‌ها به دو گروه شاهد و تجربی، گروه تجربی در ابتدای دورهٔ تمرینی، روزانه به مدت ۱۰ دقیقه با شدت ۱۲ متر بر دقیقه بر روی نوار گردان(تریدمیل) ویژهٔ موش‌های صحرایی(ساخت ایران، گروه صنعتی آرین) تمرین را آغاز کردند. در مدت ۲ هفته، به‌تدریج زمان فعالیت به ۶۰ دقیقه در روز و شدت فعالیت به ۲۸ متر در دقیقه افزایش یافت، به‌طوری که در انتهای هفتهٔ دوم (جلسهٔ دهم تمرینی) موش‌ها قادر بودند به مدت ۶۰ دقیقه و با شدت ۲۸ متر در دقیقه روی تریدمیل بدوند. گفتنی است که این تمرین ،شدید و به‌طور تقریبی معادل ۷۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی است. از این مرحله به بعد، موش‌ها به مدت ۸ هفته، هر هفته ۵ روز متوالی، هر روز یک جلسه و هر جلسه ۶۰ دقیقه بین

ساعت ۱۲-۹ صبح روی نوار گردان دویدند.(۳۲).در این مرحله، به‌دلیل رعایت مسائل اخلاقی، برای وادار کردن موش‌ها به دویدن، از شوک الکتریکی استفاده نمی‌شد، بلکه این کار توسط میله‌ای پلاستیکی انجام می گرفت.ده دقیقهٔ اول و آخر هر جلسهٔ تمرینی به ترتیب به گرم کردن و سرد کردن اختصاص داده شد(32).میانگین مسافت دویده‌شده توسط موش‌ها در هر جلسه ۲۰±۱۶۰۰متر بود.برای همسان‌سازی موش‌ها به فضای آزمایشگاه و گروه کنترل، گروه شاهد نیز هفته‌ای سه جلسه و هر جلسه به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲ متر در دقیقه روی تریدمیل راه می‌رفتند.

تهیهٔ نمونه‌های خون و بافت عضلهٔ اسکلتی

۲۴ساعت پس از آخرین جلسهٔ تمرین، ۱۰ موش (۵موش از گروه شاهد و ۵ موش از گروه تجربی) در حالی که یک شب کامل ناشتا بودند،بین ساعت ۱۲-۱۱ صبح به‌وسیلهٔ تزریق داخل صفاقی(ip) مخلوط کتامین(۵۰ - ۳۰ mg/kg im) و زایلزین(۵ - ۳ mg/kg im) بیهوش شدند. پی‌درنگ پس از بیهوشی، خون موش‌ها به‌طور مستقیم توسط سرنگ از قلب کشیده شده و بافت عضلهٔ راست‌رانی به‌سرعت جدا و در نیتروژن مایع منجمد شد. نمونه‌های خونی و بافتی تا زمان اندازه‌گیری در فریزر در۸۰- درجهٔ سانتیگراد نگهداری شدند.

تخلیص mRNA و بررسی بیان ژن به‌وسیلهٔ RT-PCR

۵۰ میلی گرم از بافت منجمد عضله، با روش هموژنیزه کردن سرد، پودر شده و برای تخلیص mRNA استفاده شد. با استفاده از روش گوانیدینیوم تیوسیانات[۱]، RNA بافتی محافظت و جداسازی شد(۱۹) و به‌منظور جداسازی mRNA، کیت تخلیص mRNA شرکت Roche که با استفاده از ذرات مغناطیسی[۲] پوشیده‌شده با اولیگو dT[۳] با درجهٔ خلوص زیاد و کیفیت مناسب قادر به جداسازی mRNA است، براساس دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. از هر یک از موش‌ها، یک میکروگرم mRNA برای ساختن اولین رشتهٔ cDNA به‌کار رفت. در این تحقیق برای ساخت cDNA از آغازگر (پرایمر[۴]) اولیگو dT که مکمل دم‌های Poly A در mRNA

۱. Guanidinium thiocyanate method
۲. Magnetic particles
۳. Oligo (dT)
۴. Primer

است و دمای ۴۲ درجهٔ سانتیگراد به‌مدت یک ساعت استفاده شد. کیت مزبور از شرکت Fermentase آلمان خریداری شد. سطح نسبی mRNA ژن AgRP در عضله با روش RT-PCR نیمه‌کمی[۱] اندازه گیری شد. این روش به کمک پرایمرهای ویژه AgRp شامل

AgRP -Forward: 5′-AGA AGA CAG CAG CAG ACC GAG-3′
AgRP -Reverse: 5′-TGA AGA AGC GGC AGT AGC ACC-3′

که یک قطعهٔ ۱۸۶ جفت بازی را در این ژن تکثیر می‌کنند، انجام شد. پرایمرهای ویژهٔ β – actin برای تکثیر این ژن به‌عنوان کنترل به‌کار رفت. این پرایمرها شامل

β – actin -Forward: 5′-TCC TGC GGC ATC CAT GAA ACT-3′
β – actin -Reverse: 5′-ATC GTG CAC CGC AAA TGG TTC-3′

بود که یک قطعهٔ ۳۱۵ جفت بازی از ژن بتاکتین را تکثیر می کنند. بتاکتین یک ژن همیشه بیان‌شونده[۲] است و شاهد خوبی برای بررسی کل فرایند تخلیص mRNA است. مراحل PCR شامل ۳۵ تکرار از سه مرحله: ۱)دناتوراسیون[۳] ۹۴ درجهٔ سانتیگراد به‌مدت ۳۰ ثانیه؛ ۲) دمای جفت شدن[۴] ۶۰ درجهٔ سانتیگراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و ۳)دمای طویل شدن[۵] ۷۲ درجهٔ سانتیگراد به مدت ۵۰ ثانیه بود.

برای به‌دست آوردن بهترین غلظت cDNA الگو، غلظت‌های مختلف از cDNA بررسی و سرانجام بهترین غلظت برای PCR نهایی به‌کار گرفته شد. آزمون‌های این تحقیق ، دست‌کم سه بار تکرار شد. بررسی نیمه‌کمی باندها با کمک دانسیومتر رایانه‌ای(Kodak , CT) انجام و سطح بیان mRNA نسبت به بیان ژن بتاکتین محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل آماری

بررسی تأثیر تمرین بر بیان mRNA ژن مزبور با کمک نرم‌افزار آماری SPSS و به‌روش t-test مستقل در سطح معنی‌داری $p<0.001$ انجام شد.

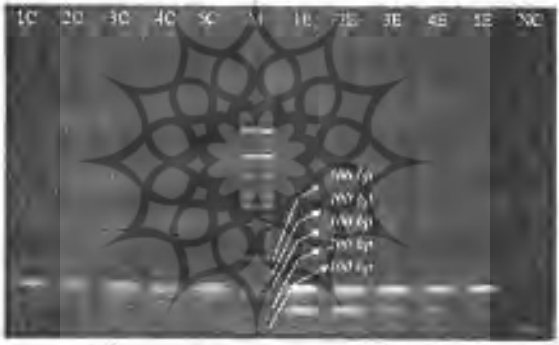
---

۱. Semiquantitative PCR
۲. House keeping gene
۳. Denaturation
۴. Annealing
۵. Extension

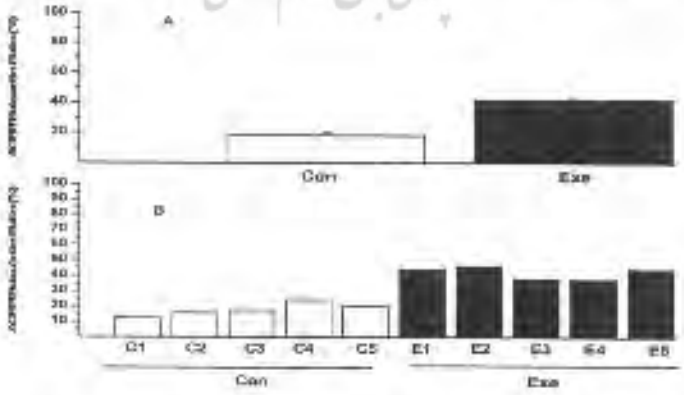
نتایج تحقیق

بررسی بیان ژن AgRP در عضلهٔ اسکلتی

همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، باندهای مربوط به وزن ۱۸۶ در گروه تمرین کرده نسبت به گروه شاهد،به‌خوبی افزایش بیان را نشان می‌دهد. به عبارتی ژن AgRP در نتیجهٔ تمرین، دچار افزایش نظاهر شده‌است.



شکل ۱. از چپ به راست ستون های ۱ تا ۵ گروه شاهد، ستون M مارکر (Ladder)، ستون های ٦ تا ۱۰ مربوط به گروه تمرین کرده و ستون ۱۱ کنترل منفی PCR است.



شکل ۲. بیان ژن AgRP در گروه‌های شاهد و تجربی که تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد.

A. مقایسهٔ بیان ژن AgRP در گروه‌های کنترل و تجربی؛ B. مقایسهٔ بیان ژن AgRP در هر یک از نمونه‌های کنترل و تجربی، C1 تا C5 گروه کنترل و E1 تا E5 گروه تجربی است.

بحث و نتیجه‌گیری

هدف از تحقیق حاضر، بررسی اثر ۱۰ هفته تمرین استقامتی با شدت ۲۸ متر در دقیقه روی تریدمیل مخصوص موش‌های صحرایی بر بیان ژن AGRP در عضلهٔ راست‌رانی بود. بهره‌گیری از روش RT-PCR نشان داد که دویدن بر روی تریدمیل با شدت یادشده، که معادل ۷۵ تا ۸۰ درصد VO_2max است، بیان ژن AGRP را افزایش می‌دهد. نتایج تحقیق حاضر با نتیجهٔ پژوهش ریجک و همکاران(۲۰۰۵) همخوانی دارد، به طوری که آنان نیز به این نتیجه رسیدند که فعالیت موش های صحرایی در داخل چرخ سبب افزایش بیان AGRP در هیپوتالاموس می‌شود. البته باید یادآورشد که فعالیت داخل چرخ با دویدن روی نوار گردان متفاوت است، چرا که فعالیت داخل چرخ ، کاملا ارادی است و از لحاظ ماهیت، نوع و شدت نیز، کاملا با دویدن اجباری روی نوار گردان تفاوت دارد، ولی به هر حال با توجه به اینکه موش‌ها در حالت ناشتایی کشته شدند، ناشتایی و تمرین،تعادل منفی انرژی به‌وجود آورد و در نتیجه سبب ترشح AGRP شد. این بحث توسط ریجک و همکاران نیز تأیید شده‌است(۳۱). از طرفی نتایج بررسی‌ها نشان می‌دهند که تمرینات ورزشی طولانی‌مدت با کاهش گلیکوژن و ATP عضله و کبد همراه است (۲۸،۲۹،۳۰)؛بنابراین تمرین و فعالیت بدنی، تعادل و هموستاز انرژی در داخل سلول عضلانی را به‌هم می‌زند و تقاضای انرژی سلول را افزایش می‌دهد به‌طوری که بیان شده در تمرینات طولانی مدت با شدت ۶۰ تا ۸۰ درصد VO_2max، به‌ویژه اگر به مدت یک یا چند هفته تکرار شوند، ذخایر انرژی سلول (شامل ATP و گلیکوژن) دچار کاهش و تخلیه می‌شوند که علت آن هم، در مورد کاهش ATP، از دست دادن مداوم پورین‌ها از عضله عنوان شده است (۲۸،۲۹). از طرف دیگر، باید به‌یاد داشت که موش‌ها پس از یک شب کامل ناشتایی کشته شدند و این ناشتایی خود می‌تواند سبب کاهش ذخایر انرژی سلول عضله شود و به افزایش بیان ژن AGRP بینجامد(۳۳). ازاین‌رو می‌توان به نحوی نتیجه گرفت که افزایش AGRP به‌عنوان سازوکارجبرانی در ارسال پیام به مراکز بالا در راستای تنظیم انرژی بافت‌های محیطی عمل می‌کند. شاید بتوان گفت که ازدیاد AGRP بخشی از سازوکار فراجبرانی گلیکوژنی نیز است که درپی تمرین شدید روی می‌دهد.

تحقیق حاضر برای اولین بار نشان داد که تمرین استقامتی بر روی تردمیل منجر افزایش تظاهر ژن AGRP در عضلهٔ اسکلتی موش‌های صحرایی نر می‌شود، البته با توجه به شدت تمرین به کار رفته و همچنین متوالی بودن روزهای تمرین از یک طرف، و کوتاه بودن فاصلهٔ بین آخرین جلسهٔ تمرین و کشتن موش‌ها از طرف دیگر، که به احتمال بازیافت کامل ذخایر انرژی عضله را با تاخیر مواجه می‌سازد، انتظار می‌رود چنانچه تمرین از شدت یا حجم کمتری برخوردار باشد یا فاصلهٔ بین آخرین جلسهٔ تمرین و کشتن موش‌ها بیشتر باشد، شاهد رفتار متفاوتی از AGRP باشیم که تایید این نظریه به تحقیقات بیشتری در این زمینه نیاز دارد.

پژوهشگاه علوم انسانی و مطالعات فرهنگی
پرتال جامع علوم انسانی

منابع

1. Shrestha YB, wickwire K, & Giraudo SQ. Role of AgRP on Ghrelin–induced feeding in the hypothalamic paraventricular nucleus. Regulatory Peptides 133, 68–73 (2006).
2. Schwartz MW, Woods SC, Potre Jr D, Seeley RJ, & Baskin DG. Central nervous system control of food intake. Nature 404, 661-671 (2000).
3. Wynne K, Stanley S, McGowan B, & Bloom S. Appetite control. Journal of Endocrinology 184, 291–318 (2005).
4. Woods SC, Benoit SC, Clegg DJ, & Seeley RJ. Regulation of energy homeostasis by peripheral signals. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism 18(4), 497–515 (2004).
5. Sainsbury A, Cooney GJ, & Herzog H. Hypothalamic regulation of energy homeostasis. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism 16(4), 623–637 (2002).
6. Speakman JR. Obesity: the integrated roles of environment and genetics. J. Nutr. 134, 2090S–2105S (2004).
7. Westerterp KR. Alterations in energy balance with exercise. Am. J. Clin. Nutr. 68 (suppl), 970S–4S (1998).
8. Woods SC, Seeley RJ, Porte Jr D, & Schwartz MW. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. Science 280 (5368), 1378–1383 (1998).
9. Lawrence CB, Turnbull AV, & Rothwell NJ. Hypothalamic control of feeding. Curr. Opin. Neurobiol. 9 (6), 778–83 (1999).
10. Woods SC, & Seeley RJ. Adiposity signals and the controle of energy homeostasis. Nutrition 16, 895-902 (2000).
11. Tritos NA, & Maratos–Flier E. Two important systems in energy homeostasis: melanocortins and melanin–concentrating hormone. Neuropeptides 33 (5), 339–349 (1999).
12. Hillebrand JJG, de Wied D, & Adan RAH. Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. Peptides 23, 2283–2306 (2002).
13. Beck B. Neuropeptides and obesity. Nutrition 16, 916-923 (2000).
14.Jequier E, & Tappy L. Regulation of body weight in humans. Physiological Reviews 79 (2), 451–480 (1999).
15.Schwartz MW. Brain pathways controlling food intake and body weight. Exp. Biol. Med. 226 (11), 978–981 (2001).
16.Neary NM, Small CJ, Wren AM, Lee JL, Druce MR, Palmieri C, Frost GS, Ghatei MA, Coombes RC, & Bloom SR. Ghrelin increases energy intake in cancer patients with impaired appetite: acute, randomized, placebo–controlled trail. J. Clin. Endocrin Metab. 89, 2832 – 2836 (2004).
17.Stutz AM, Morrison CD, & Argyropoulos G. The agouti – related protein and its role in energy homeostasis. Peptides 26. 1771–1781 (2005).
18. Katsuki A, Sumida Y, Gabazza EC, Murashima S, Tanaka T, Furuta M, Araki- Sasaki R, Hori Y, Nakatani K, Yano Y, & Adachi Y. Plasam levels of agouti – related protein are increased in obese men. J. clin. Endocrinol. Metab. 86, 1921–1924 (2001).
19.Takeuchi S, Teshigaware K, & Takahashi S. Widespread expression of agouti–related protein (AGRP) in the chicken: a possible involment of AGRP in regulating peripheral

melanocortin systems in the chicken. Biochimica et Biophysica Acta 1496, 261–269 (2000).
20.Inui A. Cancer anorexia–cachexia syndrome: are neuropeptides the key? Cancer Research 59, 4493–4501 (1999).
21.Tamura H, Kamegai J, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, & Oikawa S. The effect of agouti-related protein on growth hormone secretion in adult male rats. Regulatory Peptides 125, 143–149 (2005).
22.Qian S, Chen H, Weingarth D, Trumbauer ME, Novi DE, Guan X, Yu H, Shen Z, Feng Y, Frazier E, Chen A, Camacho RE, Shearman LP, Gopal – Truter S, MacNeil DJ, Van der Ploeg LHT, & Marsh DJ. Neither agouti-related protein nor neuropeptide Y is critically required for the regulation of energy homeostasis in mice. Molecular and cellular Biology 22 (14), 5027–5035 (2002).
23.Brown AM, Mayfield DK, Vukmirovic J, & Argyropoulos G. The gene structure and minimal promoter of the human agouti related protein. Gene 277, 231–238 (2001).
24.Chang G, Karatayev O, Davydova Z, Wortley K, & Leibowitz SF. Glucose injection reduces neuropeptide Y and agouti–related protein expression in the arcuate nucleus: A Possible physiological role in eating behavior. Molecular Brain Research 135, 69–80 (2005).
25 Dunbar J, Lapenowski K, Barnes M, & Rafols J. Hypothalamic agouti – related protein immunoreactivity in food-restricted, obese, and insulin-treated animals: evidence for glia cell localization. Experimental Neurology 191, 184–192 (2005).

26.Charbonneau C, Bai F, Richards BS, & Argyropoulos G. Central and peripheral interactions between the agouti–related protein and leptin. Biochemical and Biophysical Research communications 319, 518–524 (2004).
27.Nijenhuis WAJ, Oosterom J, & Adan RAH. AgRP (83 –132) acts as an inverse agonist on the human–melanocortin-4 receptor. Molecular Endocrinology 15, 164–171 (2001).
28. Broberg S. Sahlin K. Adenine nucleotide degradation in human skeletal muscle during prolong exercise. J. Appl. Physiol. 67(1): 116-122(1989)
29. Hellsten Y, Sjodin B, Richter EA, and Bangsbo J. Urate uptake and lowered ATP levels in human skeletal after high-intensity intermittent exercise. Am. J. Physiol. 274. E600-E606 (1998)
30.Li J, King NC, Sinoway LI. ATP concentrations and muscle tension increase linearly with muscle contraction. J. Appl. Physiol. 95: 577-583(2003)
31. Rijke C E. et al. Hypothalamic neuropeptide expression following chronic food restriction in sedentary and wheel-running rats. Journal of molecular Endocrinology. 35: 381-390(2005)
32. Hongkai Jin, et al. Effects of exercise training on cardiac function, gene expression, and apoptosis in rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol 279: H2994–H3002, 2000
33.Shen C-P, Wu KK, Shearman LP, Camacho R, Tota MR, Fong TM,& Van der Ploeg LHT. Plasma agouti – related protein level: a possible correlation with fasted and fed states in humans and rats. Journal of Neuroendocrinology 14, 607–610 (2002).