

# Effect of High Fat Diet and Endurance Training on the Gene Expression of Sarco/Endoplasmic Reticulum ATPase2 (SERCA2) and Ryanodine Receptor2 (RYR2) under Near-Thermoneutrality in Inguinal Adipose Tissue of Mice

Saeed Daneshyar<sup>1\*</sup> , Amir Khosravi<sup>1</sup>, Yazdan Fourotan<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dept of Physical Education, Faculty of Humanities, Ayatollah Arozma Boroujerdi University, Lorestan, Iran

<sup>2</sup> Dept of Physical Education, Islamic Azad University, Asad-Abad Branch, Hamadan, Iran

## Article Info

**Article type:**  
Research article

**Article History:**  
Received: 05 December 2020  
Revised: 16 December 2020  
Accepted: 05 July 2021

**\* Correspondence to:**

Saeed Daneshyar  
Dept of Physical Education,  
Faculty of Humanities, Ayatollah  
Arozma Boroujerdi University,  
Lorestan, Iran  
Email: s.daneshyar@abru.ac.ir

## ABSTRACT

**Introduction:** Non shivering thermogenesis is partly yielded by a futile-calcium-cycle mechanism that is regulated by Sarco/Endoplasmic Reticulum ATPase2 (SERCA2) and Ryanodine Receptor2 (RYR2). This study aimed to investigate the effect of a high-fat diet and endurance training under near-thermoneutrality (in which humans live) on the gene expression of SERCA2 and RYR2 in inguinal subcutaneous adipose tissue in mice.

**Material & Methods:** A total of 28 C57BL/6 male mice were assigned into four groups of seven animals per group. The groups included 1) control 2), high-fat diet (HFD), 3) endurance training (ET), and 4) HFD-ET. The environment temperature was set out at 26°C. The mice in the HFD group were fed a high-fat diet (fat=42%) for 12 weeks. The mice in the ET group underwent ET on the treadmill for six weeks. The mice of the HFD-ET had both the HFD and ET. The real-time-PCR method was used to measure the gene expression of SERCA2a, SERCA2b, and RYR2 in adipose tissue.

(Ethic code: ABRU.AC.IR/15664-96.44)

**Findings:** Two-way ANOVA showed that the relative gene expression of SERCA2a, SERCA2b, and RYR2 were not significantly affected by HFD, ET, and HFD-ET ( $P>0.05$ ).

**Discussion & Conclusion:** The HFD and ET did not change the regulatory proteins of the futile-calcium-cycle under near-thermoneutrality in the beige adipose tissue. Therefore, it was speculated that the non-shivering thermogenesis that is induced by these conditions might occur independently of futile-cycle-calcium.

**Keywords:** Beige adipose tissue, Futile cycle, Obesity, Thermogenesis

## ➤ How to cite this paper

Daneshyar S, Khosravi A, Fourotan Y. Effect of High Fat Diet and Endurance Training on the Gene Expression of Sarco/Endoplasmic Reticulum ATPase2 (SERCA2) and Ryanodine Receptor2 (RYR2) under Near-Thermoneutrality in Inguinal Adipose Tissue of Mice. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2022;29(6): 90-101.



## تأثیر غذای پرچرب و تمرین استقامتی تحت دمای نزدیک به خنثی بر بیان ژن های پمپ کلسیم شبکه اندوپلاسمی (SERCA2) و گیرنده ریانودین (RYR2) در بافت چربی زیرپوستی موش

سعید دانش یار<sup>۱\*</sup>، امیر خسروی<sup>۱</sup>، یزدان فروتن<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه تربیت بدنی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه آیت الله العظمی بروجردی (ره)، لرستان، ایران

<sup>۲</sup> گروه تربیت بدنی، دانشگاه آزاد اسلامی همدان، واحد اسدآباد، همدان، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۱۵

تاریخ داوری: ۱۳۹۹/۰۹/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۱۴

**مقدمه:** بخشی از گرمزایی غیرلرزشی در سطح بافت چربی بزرگ از طریق سازوکار چرخه بیهوده کلسیم سلولی به دست می آید که توسط پمپ کلسیم شبکه اندوپلاسمی (Sarco/Endoplasmic Reticulum ATPase2) SERCA2 و گیرنده ریانودین RYR2 (Ryanodine Receptor2) تنظیم می شود. در این پژوهش، اثر غذای پرچرب و تمرین استقامتی تحت شرایط دمای نزدیک به خنثی (دمایی که انسان ها زیست می کنند) بر بیان ژن های SERCA2 و RYR2 در بافت چربی زیرپوستی منطقه رانی موش مطالعه شد.

**مواد و روش ها:** ۲۸ سر موش سوری نر نژاد C57BL/6 به چهار گروه هفت تایی ۱. کنترل، ۲. غذای پرچرب، ۳. تمرین استقامتی و ۴. غذای پرچرب-تمرین تقسیم گردیدند. دمای زیست موش ها روی ۲۶ درجه سانتی گراد تنظیم شد. موش های گروه غذای پرچرب به مدت ۱۲ هفته، غذای پرچرب (۴۵ درصد چربی) مصرف کردند. موش های گروه تمرینی به مدت شش هفته، تحت تمرین استقامتی تداومی روی نوار گردان قرار گرفتند. موش های گروه غذای پرچرب-تمرین در کنار تغذیه با غذای پرچرب، در شش هفته پایانی دوره مداخله، تمرین استقامتی انجام دادند. برای اندازه گیری بیان نسبی ژن های SERCA2b,a و RYR2 از روش Real Time-PCR استفاده شد.

**یافته ها:** آزمون تحلیل واریانس دوطرفه نشان داد بیان نسبی ژن های SERCA2a, SERCA2b و RYR2 متأثر از غذای پرچرب، تمرین استقامتی و غذای پرچرب-تمرین نشد ( $P > 0.05$ ).

**بحث و نتیجه گیری:** رژیم غذای پرچرب و تمرین منظم استقامتی تحت شرایط دمای نزدیک به خنثی، تغییری در بیان تنظیم گرهای چرخه کلسیم در بافت چربی بزرگ نداشت؛ از این رو استدلال می شود که تغییرات گرمزایی غیرلرزشی ناشی از شرایط ذکر شده، احتمالاً مستقل از سازوکار چرخه بیهوده کلسیم است.

**واژه های کلیدی:** بافت چربی بزرگ، چاقی، چرخه بیهوده، گرمزایی

### نویسنده مسئول:

سعید دانش یار

گروه تربیت بدنی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه آیت الله العظمی بروجردی (ره)، لرستان، ایران

Email:

s.daneshyar@abru.ac.ir

**استناد:** دانش یار، سعید؛ خسروی، امیر؛ فروتن، یزدان. تأثیر غذای پرچرب و تمرین استقامتی تحت دمای نزدیک به خنثی بر بیان ژن های پمپ کلسیم شبکه اندوپلاسمی (SERCA2) و گیرنده ریانودین (RYR2) در بافت چربی زیرپوستی موش. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، اسفند ۱۴۰۰؛ ۲۹(۶): ۹۰-۱۰۱.



## مقدمه

چاقی نتیجه بی‌تعادلی طولانی‌مدت میان دریافت انرژی و مصرف انرژی است که در آن، میزان دریافت انرژی از میزان مصرف انرژی تجاوز می‌کند (۱). سبک زندگی مدرن که مشتمل بر مصرف غذای پرکالری و بی‌حرکی است، این تعادل را به نفع دریافت انرژی برهم زده است (۱). در واقع، غذای پرکالری همچون تغذیه پرچرب، از طریق ایجاد تعادل مثبت انرژی و از سوی دیگر، تمرینات ورزشی به‌ویژه تمرینات استقامتی از طریق ایجاد تعادل منفی انرژی، موجب اختلال در این تعادل می‌شوند (۲). جالب‌تر اینکه به‌موازات این اختلال، این دو عامل به‌صورت متضاد می‌توانند آثار سلولی-مولکولی متفاوتی را در بافت‌های متابولیکی بدن برجای بگذارند (۳، ۴). بافت چربی یکی از این بافت‌ها است که از این عوامل تأثیر جدی می‌پذیرد (۵).

بافت چربی به‌صورت کلاسیک به دو نوع تقسیم می‌شود: بافت چربی سفید و بافت چربی قهوه‌ای (۶). بافت چربی سفید قابلیت ذخیره انرژی دارد، درحالی‌که بافت چربی قهوه‌ای دارای قابلیت گرمزایی در بدن است (۷). تا سالیان پیش تصور می‌شد که بافت چربی قهوه‌ای صرفاً در انسان‌های نوزاد (و نه بزرگسال) وجود دارد. بااین‌حال، در سال ۲۰۰۹-۲۰۰۷، تحقیقاتی با استفاده از روش FDG-PET scan نشان دادند که افراد بزرگسال دارای مقدار کمی چربی قهوه‌ای در نواحی خاصی از بدن همچون گردن، بالای ترقوه و اطراف ستون فقرات هستند (۸-۱۲). مطالعات نشان داده‌اند سلول‌های این بخش از بافت چربی ویژگی‌های مولکولی مشابه با سلول‌های شبه‌قهوه‌ای یا سلول‌های چربی بژ (beige) موش دارند (۱۳-۱۵). در واقع، این سلول‌ها سلول‌های مشابه سلول‌های چربی قهوه‌ای هستند که به‌صورت جزیره‌ای در لابه‌لای سلول‌های چربی سفید برخی از نواحی از بافت چربی سفید بدن موش قرار دارند (۱۶). مهم‌ترین بافت چربی در موش‌ها که سلول‌های چربی بژ در آن یافت می‌شود، چربی زیرپوستی ناحیه ران (inguinal) است. از

این حیث، این ناحیه از بافت چربی به بافت چربی بژ معروف است (۱۷، ۱۴). در این متن از این اصطلاح (بافت چربی بژ) به‌جای نام کامل آن (بافت چربی سفید منطقه رانی) استفاده می‌شود.

مطالعات نشان داده‌اند سازوکارهای گرمزایی بافت چربی بژ بر اثر تغذیه غذای پرچرب و تمرین استقامتی، به‌صورت متفاوتی دستخوش تغییر می‌گردد. نشان داده‌شده است که بر اثر مصرف طولانی‌مدت غذای پرچرب، قابلیت گرمزایی بافت چربی بژ کاهش می‌یابد که اصطلاحاً سفید شدن بافت چربی (whitening) نامیده می‌شود (۱۸، ۵). از سوی دیگر، بر اثر تمرینات ورزشی، قابلیت گرمزایی در این بافت افزایش می‌یابد که آن را به‌اصطلاح قهوه‌ای شدن بافت چربی (browning) می‌نامند (۲۴-۱۹). در واقع، بر اثر این دو رخداد یعنی سفید شدن و قهوه‌ای شدن، میزان بیان عوامل گرمزایی غیرلرزشی (non-shivering) به‌ترتیب دچار تنظیم کاهشی و تنظیم افزایشی می‌شوند.

پروتئین غیر جفت‌کننده یک (UCP1) (Uncoupling Protein 1) کلیدی‌ترین عاملی است که در گرمزایی غیرلرزشی در بافت چربی بژ نقش دارد (۲۵)؛ همچنین در سال‌های اخیر مشخص شده است که چرخه بی‌هوده کلسیم (Futile Ca<sup>2+</sup> cycle) می‌تواند در گرمزایی بافت چربی بژ و مقابله با چاقی ناشی از غذای پرچرب نقش مهمی داشته باشد (۲۶). این چرخه گرمزا، توسط پمپ کلسیم اندوپلاسمی (SERCA2) و کانال ریانودین (RyR2) تنظیم می‌شود (۲۷، ۲۶).

SERCA با مصرف ATP، یون‌های کلسیم را از سیتوزول به درون شبکه اندوپلاسمی پمپ می‌کند. از سوی دیگر، کلسیم از طریق RyR شبکه نشت می‌کند و وارد سیتوزول می‌شود. برای بازگرداندن میزان کلسیم سیتوزولی به میزان طبیعی، SERCA مجدداً فعال می‌گردد. این چرخه به‌صورت بی‌هوده تکرار می‌شود؛ در نتیجه، ATP بیشتری مصرف می‌گردد؛ همچنین SERCA دو عملکرد آنزیمی متفاوت یعنی هیدرولیز ATP و پمپ

مداخله‌های غذای پرچرب و تمرین استقامتی در دمای نزدیک به خنثی بر میزان بیان ژن‌های SERCA2 و RYR2 در بافت چربی ناحیه رانی موش‌ها بررسی شد.

### مواد و روش‌ها

این مطالعه به صورت تجربی با اعمال مداخله‌ها بر موش‌های سوری نژاد C57BL/6 صورت گرفت. ۲۸ سر موش سوری نر در سن چهار هفته و با وزن تقریبی ۱۲ گرم از مرکز مطالعات تجربی و مقایسه‌ای دانشگاه علوم پزشکی ایران خریداری شدند. روش نگهداری و اعمال مداخله روی موش‌ها بر اساس آئین‌نامه اجرایی اصول اخلاقی در پژوهش‌های علوم پزشکی (راهنمای اخلاق پژوهش بر حیوانات) برای انجام اهداف علمی و آزمایشگاهی با تأییدیه کمیته اخلاق دانشگاه آیت الله بروجردی با شناسه ABRU.AC.IR/15664-96.44 انجام گردید. نمونه‌ها تحت چرخه خواب و بیداری (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و در دمای  $22 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۴۰ تا ۶۰ درصد نگهداری شدند. در طول نگهداری حیوانات، آب و غذای استاندارد موش (شرکت خوراکی دام به‌پرور کرج) به میزان دلخواه در اختیار آن‌ها گذاشته شد.

برای محاسبه تعداد آزمودنی‌های پژوهش (sample size) از نرم‌افزار G Power vol.3.1.9.2 استفاده گردید. داده‌های توان مطالعه (که ۸۰ درصد در نظر گرفته شد)، خطای آلفای (که ۰/۰۵ منظور شد) و اندازه اثر استاندارد (که ۱/۱ لحاظ گردید)، حجم نمونه هر گروه ۶/۲ به دست آمد؛ بنابراین، هفت موش برای هر گروه و در مجموع ۲۸ سر موش برای این پژوهش تجربی انتخاب شد.

پس از همسان‌سازی وزن، آزمودنی‌ها به صورت تصادفی به چهار گروه هفت‌تایی ۱. کنترل، ۲. غذای پرچرب، ۳. تمرین استقامتی و ۴. غذای پرچرب-تمرین استقامتی تقسیم گردیدند (شکل شماره ۱).

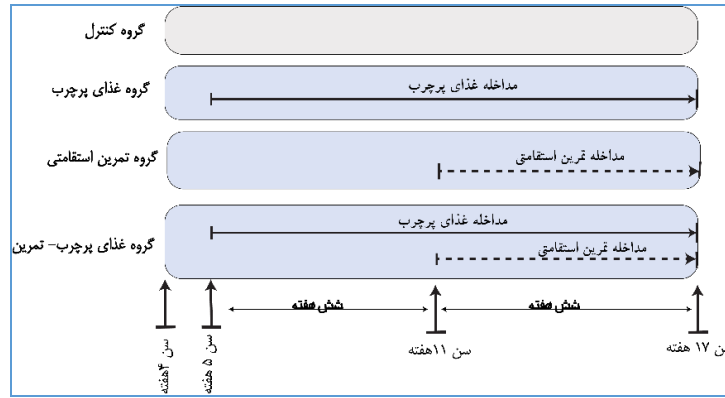
دمای خنثی. بر اساس منابع (۴۴، ۴۰)، به منظور حذف اثر مداخله دمای معمول نگهداری موش‌ها (۲۲ درجه

کلسیم دارد که به صورت همزمان عمل می‌کنند. در برخی شرایط و به علل مختلف، مرحله اول آنزیمی (هیدرولیز ATP) انجام می‌شود؛ اما مرحله دوم آنزیمی یعنی پمپ کلسیم رخ نمی‌دهد؛ در نتیجه، ATP بیهوده هیدرولیز می‌گردد. در مجموع، بر اثر این فعل و انفعالات (چرخه بیهوده)، انرژی به صورت گرما آزاد می‌شود که گرمایزی مستقل از UCPI نامیده می‌شود (۲۹، ۲۸).

درباره عامل گرمایزی UCPI، مطالعات بسیاری تأثیر تغذیه پرچرب و تمرینات ورزش استقامتی را بررسی کرده‌اند (۳۳-۳۰). با این حال، درباره تنظیم گره‌های چرخه کلسیم یعنی SERCA2 و RYR2، مطالعات اندکی انجام شده است. برخی از این مطالعات اثر رژیم غذایی کم پروتئین (۳۴) و اثر تمرین مقاومتی (۳۵) را بر SERCA2 در بافت چربی بررسی کرده‌اند و بعضی دیگر اثر تغذیه پرچرب و تمرین ورزشی را در بافت‌های قلب و کبد مطالعه نموده‌اند (۳۸-۳۶). با این حال، تاکنون اثر تغذیه پرچرب و تمرین استقامتی بر SERCA2 و RYR2 در بافت چربی بزرگ مطالعه نشده است.

مسئله چالش‌برانگیز اینکه مطالعات به تازگی نشان داده‌اند که دمای استاندارد نگهداری موش‌ها (۲۲ درجه سانتی‌گراد) موجب استرس دمایی مزمن بر موش‌ها می‌شود که نتیجه آن تحریک ناخواسته سازوکارهای گرمایزی است (۳۹). این استرس سرمایی موجب تداخل پنهانی در گرمایزی و در نتیجه، سبب انحراف تفسیر درست درباره اثر اصلی مداخله‌های پژوهش بر عوامل گرمایزی می‌گردد (۴۰). این تداخل درباره غذای پرچرب (۴۱) و تمرین ورزشی (۴۳، ۴۲) ثابت شده است؛ همچنین محققان بر این باورند که برای آنکه بتوان نتایج داده‌های مربوط به موش را به انسان تعمیم داد، باید دمای نگهداری موش‌ها خنثی (Thermoneutrality) باشد؛ یعنی ۲۸ الی ۳۰ درجه سانتی‌گراد (۴۴). این پیشنهاد بر این اساس است که انسان‌ها به سبب پوشش، در شرایط دمایی خنثی زندگی می‌کنند (۴۴).

بر اساس علل ذکر شده، در این پژوهش اثر



شکل شماره ۱. روند نمای طرح پژوهش

موش‌های گروه کنترل و گروه تمرین با غذای استاندارد موش‌ها تغذیه شدند که شامل ۱۵ درصد چربی (کیلوکالری)، ۶۵ درصد کربوهیدرات (کیلوکالری) و ۲۰ درصد پروتئین (کیلوکالری) و معادل با ۳/۴۰ کیلوکالری در گرم بود (۴۵).

تمرین استقامتی: موش‌های گروه تمرین و گروه غذای پرچرب-تمرین از سن ۱۱ تا انتهای پروتکل پژوهش (سن ۱۷ هفته)، یعنی به مدت شش هفته، تحت تمرین استقامتی قرار گرفتند (شکل شماره ۱). تمرین استقامتی تجویز شده در این پژوهش دربرگیرنده دویدن تداومی روی نوار گردان ویژه موش (شرکت پیشر و اندیشه صنعت، مدل SDR148، ساخت ایران) با شیب صفر درجه، به مدت شش هفته و هفته‌ای پنج جلسه بود که به تمرین استقامتی تداومی نیز معروف است. این پروتکل تمرینی بر اساس افزایش تدریجی بار تمرینی شامل شدت (سرعت) و حجم (مدت) تمرین طراحی گردید که در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. به‌طور

جدول شماره ۲. پروتکل تمرین استقامتی تداومی روی نوار گردان

سرعت (متر بر دقیقه)	مدت (دقیقه)	هفته
۱۳	۱۵	هفته اول
۱۵	۲۰	هفته دو
۱۶	۲۳	هفته سوم
۱۷	۲۵	هفته چهارم
۱۸	۲۷	هفته پنجم
۲۰	۳۰	هفته ششم

شیب نوار گردان صفر درجه است.

سانتی‌گراد) بر نتایج مربوط به گرمزایی، دمای نگهداری موش‌ها تا  $2 \pm 26$  درجه سانتی‌گراد افزایش یافت.

غذای پرچرب: موش‌های گروه غذای پرچرب و گروه غذای پرچرب-تمرین از سن پنج هفتگی تا انتهای پروتکل پژوهش (سن ۱۷ هفته)، یعنی به مدت ۱۲ هفته، با غذای پرچرب تغذیه شدند (شکل شماره ۱). غذای پرچرب شامل ۴۵ درصد چربی (کیلوکالری)، ۳۵ درصد کربوهیدرات (کیلوکالری) و ۲۰ درصد پروتئین (کیلوکالری) بود؛ معادل با ۴/۶۰ کیلوکالری در گرم (۴۵). به علت نبود پلت‌های آماده غذای پرچرب، قرص‌های غذایی توسط شرکت دام طیور به پرور (کرج) ساخته شد. ترکیب غذای پرچرب در جدول شماره ۱ ارائه گردید.

جدول شماره ۱. ترکیب غذای پرچرب

مواد	مقدار (گرم)
شیر خشک	۲۵
پودر گوشت	۱۶۸
روغن سویا	۶۰
کره حیوانی	۶۰
کنجیده سویا	۱۵۰
گندم	۲۳۵
جو	۱۴۰
ذرت	۴۲
سبوس	۲۰
پودر یونجه	۲۰
نمک	۸
ویتامین	۱۱
مواد معدنی	۱

سنتز گردیدند. مشخصات پرایمرهای سنتز شده در جدول شماره ۳ ذکر شده است.

RNA بافت چربی طبق دستورالعمل کیت ترايزول (TRIzol™ Reagent, Thermo fisher Scientific, ) (US) استخراج گردید. به طور خلاصه، ۵۰ میلی گرم از نمونه بافت چربی، پس از افزودن یک میلی لیتر محلول ترايزول، از طریق دستگاه همزن هموژن شد (Overhead stirrers, AT-analogica, FALC, Italy) بافت هموژن شده در دوره های متفاوت سانتریفوژ گردید (Centrifuge, MIKRO 200R, Hettich, Germany) که محصول آن تشکیل رسوب حاوی RNA بود که پس از اضافه کردن آب دیس ( DEPC-treated Water -Thermo Scientific-US) به مدت ۱۰ دقیقه، درون دستگاه ترموبلاک (Thermoblock, TD 200 P1, FALC, Italy) در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد آنکوبه شد. پس از استخراج، خلوص (در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر) و غلظت (در طول موج ۲۶۰ نانومتر) RNA استخراج شده توسط دستگاه طیف سنجی نور (Ultrospec 3000, pharmacia biotech, Sweden) از طریق فرایند جذب نوری (OD) تعیین گردید. RNA استخراج شده، به روش رونویسی معکوس، توسط دستورالعمل کیت سنتز cDNA (RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit, Thermo fisher Scientific, US) به DNA مکمل تبدیل شد. در طی این مرحله، مواد ذیل به کار رفت: رندم

خلاصه، موش ها در هفته اول، با سرعت ۱۴ متر در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه و در هفته ششم، با سرعت ۲۰ متر در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه دویدند (۴۶، ۴۷).

اندازه گیری وزن: در طول دوره پژوهش، وزن موش ها به صورت هفتگی از طریق ترازوی دیجیتالی با حساسیت ۰/۰۱ (ENTRIS 3202-1S S, Artorius, Germany) اندازه گیری شد و در سه نقطه زمانی، یعنی در مدت و پیش و پس از اعمال مداخله ها گزارش گردید.

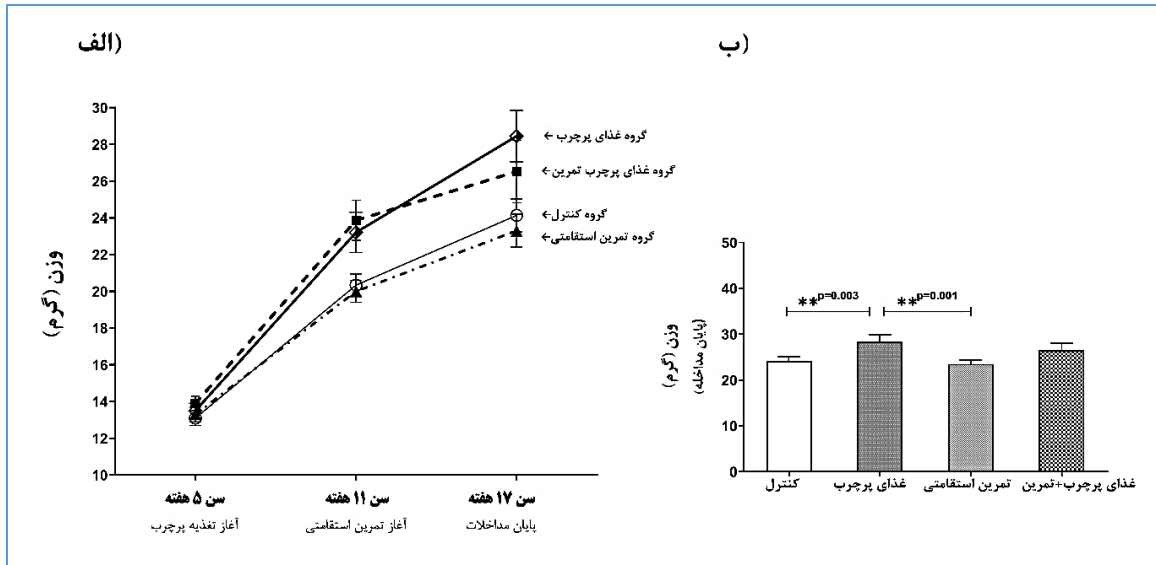
جراحی و استخراج بافت: ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین و پس از یک شب ناشتایی، حیوانات از طریق تزریق درون صفاقی کتامین (۹۰ میلی گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۸ میلی گرم/کیلوگرم) بی هوش شدند (۴۸). بافت چربی زیرپوستی منطقه کشاله رانی (inguinal) موش ها با جراحی برداشته و پس از شستشو با سرم فیزیولوژیک، توسط ازلت مایع فریز و به یخچال ۸۰- سانتی گراد (HAIER refrigerator-freezer; USA) منتقل گردیدند.

طراحی و سنتز پرایمر: ابتدا توالی پرایمر ژن های SERCA2a، SERCA2b، RyR2 و GAPDH به عنوان ژن خانه گردان (ژن کنترل)، از مطالعات گذشته به دست آمد (۵۱-۴۹)؛ سپس ویژگی و کیفیت پرایمر توسط سایت بلست پرایمر (primer-blast/NCBI) و امکان تشکیل ساختارهای دایمر و سنجاق سر توسط نرم افزار اولیگو آنالیزور (Oligo Analyzer vol.1.0.2) بررسی و تأیید شد. پرایمرها توسط شرکت سیناکلون

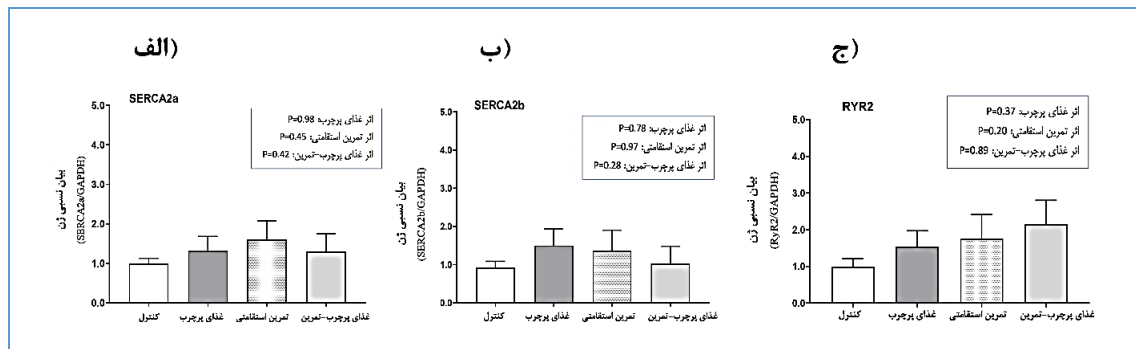
جدول شماره ۳. مشخصات پرایمرهای استفاده شده

منبع	اندازه قطعه تکثیر product length	دمای ذوب Tm	پرایمر رفت و معکوس Reverse primer) & (Forward 5'→3'	شماره دستیابی Accession Code	
(۴۹)	۲۰۰	۵۳/۸۸ ۵۲/۵۰	CTCCATCTGCTTGCCAT GCGTTACTCCAGTATTG	NM_009722.3	SERCA2a (Atp2a2)
(۴۹)	۲۰۱	۵۳/۸۸ ۵۶/۵۵	CTCCATCTGCTTGCCAT GGCTGCACACTCTTTAC	NM_001110140.3	SERCA2b (Atp2a2)
(۵۰)	۱۳۰	۵۹/۰ ۵۸/۲۵	CCTTGCCTGAGTGCAGTTG TTGAGGTATCAACAGTTGTGG	XM_036157942.1	RYR2
(۵۱)	۱۰۳	۵۸/۳۵	AACACTGAGCATCTCCCTCA	NM_001289726.1	ژن کنترل





**شکل شماره ۲.** وزن گروه‌های پژوهش طی دوره مداخله تحقیق (الف) و پس از پایان دوره مداخلات (ب). داده‌های نمودار به صورت «میانگین ± خطای استاندارد از میانگین» ارائه شده‌اند. در شکل ب، نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (آزمون تعقیبی توکی) در بالای ستون‌ها نشان داده شده است.



**شکل شماره ۳.** بیان نسبی ژن‌های SERCA2a، SERCA2b، RYR2 در گروه‌های پژوهش. داده‌های نمودار به صورت «میانگین ± خطای استاندارد از میانگین» نمایش داده شده‌اند. داده‌های بیان ژن بر اساس معیار چندبرابر تعیین گردیده‌اند. نتایج آزمون تحلیل واریانس دوطرفه در بالای نمودارها ارائه شده است.

### بحث و نتیجه گیری

دمای نزدیک به خنثی) دچار تغییر معنی نشدند. یافته‌های این مطالعه نشان داد که تغذیه با غذای پرچرب، تأثیر معناداری در بیان SERCA2a، SERCA2b و RYR2 نداشت. این یافته در تضاد با یافته‌های مطالعاتی است که نشان داده‌اند بر اثر تغذیه طولانی مدت غذای پرچرب (که سبب چاقی موش‌ها شد)، بیان ژن SERCA2b در بافت کبد کاهش یافت (۳۷، ۳۸). به نظر می‌رسد سازوکارهای تنظیم کننده بیان ژن‌های SERCA2 در بافت کبد، متفاوت از بافت چربی بزرگ عمل می‌کند؛ همچنین مطالعاتی دیگری نشان داده‌اند، تغذیه پرچرب موجب تنظیم کاهشی بیان ژن‌های مسئول گرم‌زایی

SERCA2 و RYR2 پروتئین‌های تنظیمی مرتبط با شبکه سارکوپلاسمی/اندوپلاسمی هستند که از طریق ایجاد چرخه بی‌هوده کلسیم، موجب تولید گرما در سطح بافت چربی بزرگ می‌شوند (۲۶). این پژوهش درصدد یافتن پاسخ به این پرسش بود که آیا بیان این تنظیم کننده‌ها بر اثر تغذیه پرچرب و تمرین استقامتی در دمای نزدیک به خنثی متأثر می‌گردند. به صورت کلی، در این پژوهش، میزان بیان ژن‌های SERCA2 و RYR2 بر اثر تغذیه پرچرب، تمرین استقامتی و همچنین اثر ترکیبی غذای پرچرب و تمرین استقامتی (در



همچون UCP1 شد (۵۴، ۳۰). بر اساس این یافته‌ها، این احتمال وجود دارد که نسخه‌برداری همه ژن‌های مسئول گرمزایی الزاماً با یک الگوی منطبق تنظیم نمی‌شوند؛ به عبارت بهتر، تصور می‌گردد که عوامل گرمزایی UCP1 در سازوکاری متفاوت از SERCA2 و RYR2 تنظیم می‌شوند (۵۵).

همچنین در این مطالعه مشاهده شد که تمرین استقامتی تأثیر معنی داری بر بیان ژن‌های SERCA2a، SERCA2b و RYR2 نداشت. این یافته همسو با پژوهش‌های آمانو (Amano) و همکاران (۲۰۲۰) است. آمانو و همکاران نشان دادند که چهار هفته تمرین مقاومتی، تغییری در میزان پروتئین SERCA2 در بافت چربی بزرگ موش‌های صحرایی برجای نگذاشت (۳۵). با این حال، این نکته را بایستی در نظر داشت که آمانو و همکاران اثر تمرین مقاومتی را بررسی کردند؛ اما در پژوهش حاضر، اثر تمرین استقامتی تحقیق شده است. مطالعات نشان داده‌اند مسیر پیام‌رسانی سلولی ناشی از تمرین مقاومتی الزاماً با مسیرهای ناشی از تمرین استقامتی یکسان نیست (۵۶)؛ همچنین مطالعات موافق دیگری گزارش کرده‌اند که بر اثر تمرینات استقامتی، بیان SERCA2 در عضله قلب تغییر نمی‌یابد (۵۸، ۵۷، ۳۶). با این حال، این مسئله را بایستی در نظر داشت که مسیرهای پیام‌رسانی در بافت‌های قلب و چربی متفاوت از هم هستند (۵۹)؛ به عنوان مثال، مطالعاتی نشان داده‌اند که در بافت قلب، هورمون ادیونکتین اثر تمرین ورزشی بر بیان SERCA2 و RYR2 را میانجی‌گری می‌کند (۶۰)، در حالی که در بافت چربی، هورمون لپتین-تیروئید در القای بیان این ژن‌ها نقش دارد (۶۱). بر اساس یافته‌های این پژوهش و مطالعات گذشته می‌توان پیشنهاد داد که در بعضی از بافت‌های بدن همچون چربی بزرگ و قلب، تمرینات ورزشی احتمالاً تأثیر محسوسی بر بیان SERCA2 و RYR2 ندارند. با این حال، این موضوع نیاز به مطالعات بیشتر در آینده دارد.

به نظر می‌رسد عامل مهمی تأثیر غذای پرچرب و

تمرین ورزشی را بر بیان ژن‌های SERCA2 و RYR2 بی‌اثر کرده است. همان‌طور که در مقدمه اشاره شد، مطالعات نشان داده‌اند که دمای نگهداری موش‌ها، موجب استرس سرمایی مزمن در موش‌ها می‌شود که بر اثر آن، بیان ژن‌های مسئول گرمزایی به صورت ناخواسته و پنهانی تحت تأثیر قرار می‌گیرد (۴۴، ۴۰، ۳۹).

در این مطالعه، موش‌ها در دمای نزدیک به خنثی یعنی ۲۶ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا شرایط دمایی مشابه با محیط زندگی انسان‌ها ایجاد شود و به این ترتیب، امکان تعمیم نتایج به انسان وجود داشته باشد (۴۴)؛ اما در مطالعات گذشته، موش‌ها در دمای معمول نگهداری شدند (۲۲ درجه سانتی‌گراد) که احتمالاً یکی از علل اختلاف نتایج باشد. علاوه بر این، مطابق با یافته‌های پژوهش حاضر، مطالعاتی نشان داده‌اند که تأثیر غذای پرچرب (۴۱) و تأثیر تمرینات ورزشی (۴۳، ۴۲) بر بسیاری از ژن‌های مسئول گرمزایی در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد بی‌تأثیر است؛ از این رو، گمان می‌رود علت تغییر نکردن بیان SERCA2 و RYR2 بر اثر مداخله‌های غذای پرچرب و تمرین استقامتی، مربوط به دمای نگهداری موش‌ها باشد. با این حال، این استدلال به مطالعات دقیق‌تر در آینده نیاز دارد.

در این پژوهش، به سبب برخی محدودیت‌ها، امکان افزایش دمای محل نگهداری حیوانات تا ۲۸ الی ۳۰ درجه (دمای خنثی موش‌ها) امکان‌پذیر نبود؛ همچنین در بعضی از روزها، دما با نوسان بین ۲۲ تا ۲۸ همراه شد که احتمالاً بر نتایج اصلی پژوهش، تأثیر مداخله‌کننده گذاشته است. در مجموع می‌توان نتیجه‌گیری کرد که رژیم غذایی پرچرب و تمرین منظم استقامتی، تحت شرایط دمایی نزدیک به خنثی، تأثیر معناداری بر بیان عوامل تنظیم‌کننده چرخه کلسیم یعنی SERCA2 و RYR2 در بافت چربی بزرگ موش نداشت؛ از این رو می‌توان استدلال کرد که احتمالاً در شرایط دمایی نزدیک به خنثی، گرمزایی ناشی از سازوکار چرخه بیهوده کلسیم بر اثر تغذیه غذای پرچرب و تمرین استقامتی در بافت چربی بزرگ متأثر

۱۳۷۲۹-۱۵۶۶۴ است که با حمایت مالی دانشگاه آیت‌الله‌العظمی بروجردی (ره) انجام شده است. از مسئولین پژوهشی دانشگاه برای همکاری‌های صورت گرفته، کمال تشکر به عمل می‌آید. از دکتر مهدی بهمنی به سبب ارائه مشاوره‌های مربوط به اندازه‌گیری‌های آزمایشگاهی، از سرکار خانم دکتر فاطمه جلالی برای همکاری در اندازه‌گیری‌های آزمایشگاهی و از دکتر پویا امینی برای ارائه مشاوره‌های ارزشمند درباره آنالیز آماری تشکر می‌گردد.

کد اخلاق: ABRU.AC.IR/15664-96.44

## References

- Hill JO, Wyatt HR, and Peters JC. Energy balance and obesity. *Circulation* 2012; 126: 126-32. doi.10.1161/circulationaha.111.087213
- Westertep KR. Exercise, energy balance and body composition. *Eur J Clin Nutr* 2018; 72: 1246-50. doi.10.1038/s41430-018-0180-4
- Soltis AR, Kennedy NJ, Xin X, Zhou F, Ficarro SB, Yap YS, et al. Hepatic dysfunction caused by consumption of a high fat diet. *Cell Rep* 2017; 21: 3317-28. doi.10.1016/j.celrep.2017.11.059
- Kawanishi N, Yano H, Mizokami T, Takahashi M, Oyanagi E, Suzuki K. Exercise training attenuates hepatic inflammation fibrosis and macrophage infiltration during diet induced obesity in Mice. *Brain Behavior Immun* 2012; 26: 931-41. doi.10.1016/j.bbi.2012.04.006
- Cummins TD, Holden CR, Sansbury BE, Gibb AA, Shah J, Zafar N, et al. Metabolic remodeling of white adipose tissue in obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2014; 307: 262-77. doi.10.1152/ajpendo.00271.2013
- Cohen P, Spiegelman BM. Brown and beige fat molecular parts of a thermogenic machine. *Diabetes* 2015; 64: 2346-51.
- Walden IR, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. Recruited nonrecruited molecular signatures of brown brite and white adipose tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; 302:19-31. doi.10.1152/ajpendo.00249.2011.
- Wronska A and Kmiec Z. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta Physiol* 2012; 205: 194-208. doi.10.1111/j.1748-1716.2012.02409.x
- Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293: 444-52. doi.10.1152/ajpendo.00691.2006
- Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *New England J Med* 2009; 360: 1518-25. doi.10.1056/NEJMoa0808949
- van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, et al. Cold activated brown adipose tissue in healthy men. *New England J Med* 2009; 360: 1500-8. doi.10.1056/NEJMoa0808718
- Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *New England J Med* 2009; 360: 1509-17. doi.10.1056/NEJMoa0810780
- Zingaretti MC, Crosta F, Vitali A, Guerrieri M, Frontini A, Cannon B, et al. The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. *FASEBJ* 2009; 23 : 3113-20. doi.10.1096/fj.09-133546
- Lee P, Werner C, Kebebew E, and Celi F. Functional thermogenic beige adipogenesis is inducible in human neck fat. *International journal of obesity* 2014; 38: 170-6. doi.10.1038/ijo.2013.82
- Liu X, Cervantes C, Liu F. Common and distinct regulation of human and mouse brown and beige adipose tissues a promising therapeutic target for obesity. *Prote Cell* 2017; 8: 446-454. doi. 10.1007/s13238-017-0378-6
- Sharp LZ, Shinoda K, Ohno H, Scheel DW, Tomoda E, Ruiz L, et al. Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige brite cells. *Plos One* 2012; 7: 49452. doi.10.1371/journal.pone.0049452
- Harms M and Seale P. Brown and beige fat development, function and therapeutic potential. *Nature Med* 2013; 19: 1252-63. doi. 10.1038/nm.3361
- Jong JMA, Larsson O, Cannon B, Nedergaard J. A stringent validation of mouse adipose tissue identity markers. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2015; 308: 1085-105. doi.10.1152/ajpendo.00023.2015.
- Wu MV, Bikopoulos G, Hung S, Ceddia RB. Thermogenic capacity is antagonistically regulated in classical brown and white subcutaneous fat depots by high fat diet and endurance training in rats impact on whole-body

## تشکر و قدردانی

این پژوهش برگرفته از طرح پژوهشی به شماره

- energy expenditure. *J Biol Chem* 2014; 289: 34129-40. doi. 10.1074/jbc.M114.591008
20. Stanford KI, Middelbeek RJW, Goodyear LJ. Exercise effects on white adipose tissue being and metabolic adaptations. *Diabetes* 2015; 64: 2361-8. doi.10.2337/db15-0227
  21. Lehnig AC, Dewal RS, Baer LA, Kitching KM, Munoz VR, Arts PJ, et al. Exercise training induces depot specific adaptations to white and brown adipose tissue. *Science* 2019; 11 425-39. doi.10.1016/j.isci.2018.12.033
  22. Lehnig AC, Stanford KI. Exercise induced adaptations to white and brown adipose tissue. *J Exp Biol* 2018; 221: 161570. doi.10.1242/jeb.161570
  23. Dewal RS, Stanford KI. Effects of exercise on brown and beige adipocytes. *Biochim Biophys Acta Mole Cell Biol Lip* 2019; 1864: 71-8. doi. 10.1016/j.bbalip.2018.04.013
  24. Aldiss P, Betts J, Sale C, Pope M, Budge H, Symonds ME. Exercise induced browning of adipose tissues. *Metab Clin Exp* 2018; 81 63-70. doi.10.1016/j.metabol.2017.11.009
  25. McKie GL, Wright DC. Biochemical adaptations in white adipose tissue following aerobic exercise from mitochondrial biogenesis to browning. *Biochem J* 2020; 477: 1061-81. doi. 10.1042/BCJ20190466
  26. Shabalina IG, Petrovic N, Jong JM, Kalinovich AV, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 in brite beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. *Cell Rep* 2013; 5: 1196-203. doi.10.1016/j.celrep.2013.10.044
  27. Ikeda K, Kang Q, Yoneshiro T, Camporez JP, Maki H, Homma M, et al. UCP1 independent signaling involving SERCA2b mediated calcium cycling regulates beige fat thermogenesis and systemic glucose homeostasis. *Nature Med* 2017; 23: 1454-65. doi.10.1038/nm.4429
  28. Ukropec J, Anunciado RP, Ravussin Y, Hulver MW, and Kozak LP. UCP1-independent thermogenesis in white adipose tissue of cold acclimated Ucp1 Mice. *J Biol Chem* 2006; 281: 31894-908. doi.10.1074/jbc.M606114200
  29. de Meis L. Brown adipose tissue Ca<sup>2+</sup> ATPase uncoupled ATP hydrolysis and thermogenic activity. *J Biol Chem* 2003; 278: 41856-61. doi.10.1074/jbc.M308280200
  30. de Meis L, Arruda AP, Costa RM, Benchimol M. Identification of a Ca<sup>2+</sup> ATPase in brown adipose tissue mitochondria regulation of thermogenesis by Atp and Ca<sup>2+</sup>. *J Biol Chem* 2006; 281: 16384-90. doi.10.1074/jbc.M600678200
  31. Fromme T and Klingenspor M. Uncoupling protein 1 expression and high fat diets. *Am J Reg Int Comp Physiol* 2011; 300: R1-R8. doi.10.1152/ajpregu.00411.2010
  32. Américo ALV, Muller CR, Vecchiato B, Martucci LF, Fonseca-Alaniz MH, Evangelista FS. Aerobic exercise training prevents obesity and insulin resistance independent of the renin angiotensin system modulation in the subcutaneous white adipose tissue. *Plos One* 2019; 14: 215896. doi.10.1371/journal.pone.0215896
  33. Perez GS, Cordeiro GD, Santos LS, Espirito DD, Boaventura GT, Barreto JM. Does a high fat diet induced obesity model brown adipose tissue thermogenesis? *Arch Med Sci* 2019; 15: 86781. doi.10.5114/aoms.2019.86781
  34. Tsiloulis T, Watt MJ. Exercise and the regulation of adipose tissue metabolism. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2015; 135 175-201. doi.10.1016/bs.pmbts.2015.06.016
  35. Aquilano K, Sciarretta F, Turchi R, Li B-H, Rosina M, Ceci V, et al. Low protein high carbohydrate diet induces AMPK dependent canonical and non canonical thermogenic response in subcutaneous adipose tissue. *BioRxiv* 2020; 36:101633. doi.10.1016/j.redox.2020.101633
  36. Amano Y, Nonaka Y, Takeda R, Kano Y, Hoshino D. Effects of electrical stimulation induced resistance exercise training on white and brown adipose tissues and plasma meteorin like concentration in Rats. *Physiol Rep* 2020; 8: 14540. doi.10.14814/phy2.14540
  37. Borzykh A, Selivanova E, Shvetsova A, Kuzmin I, Martyanov A, Nesterenko A, et al. Changes in the expression of genes regulating calcium homeostasis in rat myocardium induced by voluntary wheel training: the role of thyroid hormones. *Biochem Supple Ser Memb Cell Biol* 2020; 14: 67-73. doi. 10.1134/S1990747820010043
  38. Park SW, Zhou Y, Lee J, Lee J, and Ozcan U. Sarco plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase 2b is a major regulator of endoplasmic reticulum stress and glucose homeostasis in obesity. *Proce Na Acad Sci* 2010; 107: 19320-25. doi.10.1073/pnas.1012044107
  39. Fu S, Yang L, Li P, Hofmann O, Dicker L, Hide W, et al. Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. *Nature* 2011; 473: 528-31. doi.10.1038/nature09968
  40. Bastias M, Zagmutt S, Soler MC, Serra D, Mera P, Herrero L. Impact of adaptive thermogenesis in mice on the treatment of obesity. *Cells* 2020; 9: 316. doi.10.3390/cells9020316
  41. David JM, Chatziioannou AF, Taschereau R, Wang H, Stout DB. The hidden cost of housing practices using noninvasive imaging to quantify the metabolic demands of chronic cold stress of laboratory Mice. *Comp Med* 2013; 63: 386-391. doi.10.1038/s41467-020-15311-y
  42. Albustanji L, Perez GS, AlHarethi E, Aldiss P, Bloor I, Barreto JM, et al. Housing temperature modulates the impact of diet-induced rise in fat mass on adipose tissue before and during pregnancy in Rats. *Front Physiol* 2019; 10: 209. doi.10.3389/fphys.2019.00209
  43. Raun SH, Henriquez-Olguín C, Karavaeva I, Ali M, Møller LLV, Kot W, et al. Housing temperature influences exercise training adaptations in Mice. *Nature Com* 2020; 11: 1560. doi.10.1038/s41467-020-15311-y
  44. McKie GL, Medak KD, Knuth CM, Shamshoum H, Townsend LK, Peppler WT, et al. Housing temperature affects the acute and chronic metabolic adaptations to exercise in Mice. *J Physiol* 2019; 597: 4581-600. doi.10.1038/s41467-020-15311-y
  45. Fischer AW, Cannon B, Nedergaard J. Optimal housing temperatures for Mice to mimic the thermal environment of humans an experimental study. *Mol Metab* 2018; 7 161-170. doi.10.1016/j.molmet.2017.10.009
  46. Benoit B, Plaisancie P, Awada M, Geloën A, Estienne M, Capel F, et al. High fat diet action on

- adiposity inflammation and insulin sensitivity depends on the control low fat diet. *Nut Res* 2013; 33: 952-60. doi.10.1016/j.nutres.2013.07.017
47. Hoydal MA, Wisloff U, Kemi OJ, Ellingsen O. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and Mice practical implications for exercise training. *European J Cardiovas Preve Rehabil* 2007; 14: 753-60. doi.10.1097/HJR.0b013e3281eacef1
  48. Arras M, Autenried P, Rettich A, Spaeni D, and Rulicke T. Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in Mice drugs dosages adverse effects and anesthesia depth. *Comp Med* 2001; 51: 443-56.
  49. Miranda CS, Silva F, Martins FF, Rachid TL, Mandarim CA, Souza V. PPAR alpha activation counters brown adipose tissue whitening a comparative study between high fat and high fructose fed mice. *Nutrition* 2020; 110791. doi.10.1016/j.nut.2020.110791
  50. Lipskaia L, Keuylian Z, Blirando K, Mougenot N, Jacquet A, Rouxel C, et al. Expression of sarco plasmic reticulum calcium ATPase system in normal mouse cardiovascular tissues heart failure and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta Mole Cell Res* 2014; 1843: 2705-18. doi.10.1016/j.bbamcr.2014.08.002
  51. Santulli G, Pagano G, Sardu C, Xie W, Reiken S, Ascia SL, et al. Calcium release channel RyR2 regulates insulin release and glucose homeostasis. *J Clin Invest* 2015; 125: 1968-78. doi.10.1172/JCI79273
  52. Parousis A, Carter HN, Tran C, Erlich AT, Mesbahmoosavi ZS, Pauly M, et al. Contractile activity attenuates autophagy suppression and reverses mitochondrial defects in skeletal muscle cells. *Autophagy* 2018; 14: 1886-97. doi.10.1080/15548627.2018.1491488
  53. Nolan T, Hands RE, and Bustin SA. Quantification of mRNA using real time RT-PCR. *Nature Prot* 2006; 1: 1559-82 doi.10.1038/nprot.2006.236
  54. Wong ML and Medrano JF. Real time PCR for mRNA quantitation. *BioTech* 2005; 39: 75-85. doi.10.2144/05391RV01
  55. Kim A and Park T. Diet induced obesity regulates the galanin mediated signaling cascade in the adipose tissue of Mice. *Mole Nutr Food Res* 2010; 54: 1361-70. doi. 10.1002/mnfr.200900317
  56. Chang SH, Song NJ, Choi JH, Yun UJ, and Park KW. Mechanisms underlying UCP1 dependent and independent adipocyte thermogenesis. *Obesit Rev* 2019; 20: 241-51. doi.10.1111/obr.12796
  57. Hughes DC, Ellefsen S, Baar K. Adaptations to endurance and strength training. *Cold Spr Harb Pers Med* 2018; 8 :29769. doi.10.1101/cshper spect.a029769
  58. Belke DD. Swim exercised Mice show a decreased level of protein glcnacylation and expression of glcnac transferase in heart. *J Appl Physiol* 2011; 111: 157-62. doi. 10.1152/jappphysiol.00147.2011
  59. Stammers AN, Susser SE, Hamm NC, Hlynsky MW, Kimber DE, Kehler DS, et al. The regulation of sarco plasmic reticulum calcium ATPases. *Canadian J Physiol Pharmacol* 2015; 93: 843-54. doi.10.1139/cjpp-2014-0463
  60. Silva JV, Freitas MJ, Fardilha M. Tissue specific cell signaling. *Spr Natur Switzerland* 2020;2:123-7. doi.10.1007/978-3-030-44436-5
  61. Guo J, Bian Y, Bai R, Li H, Fu M, Xiao C. Globular adiponectin attenuates myocardial ischemian reperfusion injury by upregulating endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase activity and inhibiting endoplasmic reticulum stress. *J Cardiovas Pharmacol* 2013; 62: 143-53. doi.10.1097/FJC.0b013e31829521af
  62. Ukropec J, Anunciado RV, Ravussin Y, Kozak LP. Leptin is required for uncoupling protein-1-independent thermogenesis during cold stress. *Endocrinology* 2006; 147: 2468-80. doi.10.1210/en.2005-1216