

بررسی و مقایسه اثر ۸ هفته تمرینات استقامتی و تناوبی شدید بر بیان ژن گیرنده‌های ایکس کبدی (LXR) در رت‌های نر نژاد ویستار

بهمن حسنونند^{۱*}، رحمان سوری^۲، سیروس چوبینه^۲، علی‌اکبر نژاد^۲

۱- استادیار، گروه تربیت‌بدنی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم‌آباد، خرم‌آباد، ایران.

۲- دانشیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده تربیت‌بدنی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

یافته / دوره نوزدهم / شماره ۴ / پاییز ۹۶ / مسلسل ۷۳

چکیده

دریافت مقاله: ۹۶/۶/۱۱ پذیرش مقاله: ۹۶/۷/۱۳

***مقدمه:** پژوهش حاضر با هدف تعیین تأثیر تمرینات استقامتی و تناوبی شدید بر بیان ژن گیرنده‌های کبدی در رت‌های نر نژاد ویستار انجام شده است.

***مواد و روش‌ها:** روش تحقیق تجربی بوده و به همین منظور تعداد ۲۴ سر رت نر نژاد ویستار با محدوده وزنی 20 ± 20 گرم و سن هشت هفته، تهیه و به‌صورت تصادفی به سه گروه کنترل، تمرین تناوبی شدید و تمرین تداومی زیر بیشینه تقسیم شدند. پروتکل تمرینی خیلی شدید؛ ۳۰ دقیقه دویدن تناوبی (هر تناوب شامل ۴ دقیقه دویدن با شدت ۸۵-۹۰ درصد VO_{2max} و ۲ دقیقه بازیافت فعال با شدت ۵۰-۶۰ درصد VO_{2max}) پنج روز در هفته و به مدت ۸ هفته اجرا شد. همچنین گروه تمرین تداومی زیر بیشینه نیز شدت فعالیت معادل ۵۰ تا ۵۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی موش‌ها بود.

***یافته‌ها:** بیان ژن LXR آلفا، در تمرین تناوبی شدید افزایش معناداری به نسبت گروه کنترل داشت ($P=0/004$). همچنین اختلاف معناداری بین ۳ گروه در میزان بیان ژن LXR بتا وجود ندارد ($P=0/001$). هرچند نتایج نشان از افزایش جزئی در گروه‌های تمرین تناوبی و تداومی بود اما این افزایش اندک منجر به ایجاد تفاوت معنادار نشده است.

***بحث و نتیجه‌گیری:** تمرین تناوبی شدید به نسبت تمرینات تداومی زیر بیشینه از طریق افزایش بیان ژن گیرنده مهم کبدی و همچنین عامل اصلی خروج کلسترول از کبد و درنهایت گیرنده HDL می‌تواند نقش مهمی در کاهش بیماری‌های قلبی-عروقی مانند آترواسکروزیس داشته باشد.

***واژه‌های کلیدی:** تمرین تداومی زیر بیشینه، تمرین تناوبی شدید، گیرنده‌های ایکس کبدی، LXR.

*آدرس مکاتبه: خرم‌آباد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم‌آباد، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، گروه تربیت‌بدنی.

پست الکترونیک: Hasanvand121@gmail.com

مقدمه

اختلال در سوخت و ساز چربی به‌ویژه ازدیاد کلسترول و تری گلیسیرید و کاهش مقادیر HDL (High-Density Lipoprotein) افراد را مستعد بیماری‌های تصلب شرایین می‌کند. از طرفی سبک زندگی غیرفعال ماشینی هم این بیماری‌ها را تشدید می‌کند (۱). پژوهش‌های مرتبط با پیشگیری از بیماری‌های قلبی عروقی نشان می‌دهند که بین ازدیاد HDL و مقدار رسوب چربی در عروق ارتباط معکوسی وجود دارد (۲). افزایش در هر واحد HDL و کاهش LDL به بهبود عملکرد سیستم قلب و عروق و پیشگیری از بیماری‌های مرتبط با آن کمک شایانی می‌کند. فعالیت منظم بدنی به واسطه ایجاد سازگاری‌های متابولیکی خصوصاً در متابولیسم چربی، می‌تواند ره‌آورد مهمی برای حفظ سلامت بشر در جوامع امروز باشد (۱).

HDL نقش آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی دارد ولی باور عمومی بر آن است که HDL از انتقال معکوس کلسترول (Reverse Cholesterol transport) در پیشگیری از بیماری‌های قلبی - عروقی مؤثر است (۳). انتقال معکوس کلسترول به فرایند جمع‌آوری کلسترول اضافی از بافت‌های پیرامونی از جمله ماکروفاژهای دیوار سرخرگی و بازگرداندن آن‌ها به کبد، همراه با تغییر شکل HDL گفته می‌شود (۴). رابطه معکوس بین مقادیر HDL پلاسما و خطر آترواسکلروزیس نشان‌دهنده نقش HDL و گیرنده‌های آن در پذیرش انتقال کلسترول است. برداشت کلسترول‌های اضافی از سلول‌های فوم ماکروفاژ به‌وسیله HDL یکی از کلیدی‌ترین مکانیسم‌های محافظتی HDL در مقابل آترواسکلروزیس است (۵).

در انتقال معکوس گیرنده‌هایی که بر روی کبد وجود دارند نقش اساسی را برای این فرآیند ایفا می‌کنند. گیرنده‌های کبدی ایکس LXR (Liver X Receptors) از جمله فاکتورهای رونویسی فعال شونده توسط لیگاند متعلق به ابر خانواده گیرنده هورمونی هسته‌ای هستند که

در فرایندهای متابولیسم سلولی، تکثیر سلولی، تمایز و پاسخ ایمنی درگیرند. عملکرد اصلی LXR ها تنظیم متابولیسم کلسترول است. این گیرنده‌ها اثرات حفاظتی زیادی را در برابر بار زیاد کلسترول اعمال می‌کنند که این اثرات شامل مهار باز جذب کلسترول روده‌ای، تحریک خروج کلسترول سلول به‌صورت لیپوپروتئین‌های با چگالی بالای پلاسما از طریق ناقل‌های ABCA1 و ABCG1، انتقال آن به کبد، تبدیل شدن به اسیدهای صفراوی و دفع آن است (۶).

سودمندی‌های تمرین برای سلامتی، به‌ویژه تأثیرات مثبت آن بر عملکرد سیستم پیشگیری و درمان برخی بیماری‌ها مانند آترواسکلروزیس و بیماری‌های متابولیکی کبد مدت‌هاست که مشخص شده است. تحقیقات نشان داده‌اند که فعالیت بدنی می‌تواند به تغییرات مفیدی در نیمرخ لیپوپروتئین‌های خون از جمله کاهش تری گلیسیرید، LDL، VLDL و افزایش HDL با زیر مجموعه‌های آن منجر شود و موجب بهبود برخی مراحل کلیدی در فرایند انتقال معکوس کلسترول مانند افزایش مقدار و ترکیب HDL، افزایش خروج کلسترول از سلول، افزایش تشکیل و اندازه Apo A-I، افزایش Pre Beta HDL پلاسما و افزایش فعالیت آنزیم LCAT شود (۷،۸).

در رابطه با ارتباط فعالیت ورزشی و انتقال معکوس کلسترول تحقیقات اندکی انجام شده است. خبازیان و همکاران در تحقیقی به بررسی تأثیر ۶ هفته تمرین استقامتی بر بیان ژن ABCA1 در روده کوچک رت ویستار پرداختند و گزارش کردند که تمرین استقامتی باعث افزایش بیان ژن ABCA1 که عامل کلیدی در خروج کلسترول از سلول است در روده کوچک رت‌های گروه تجربی نسبت به گروه کنترل شده است (۹).

ماسون و همکاران در تحقیقی نشان دادند که تشکیل، غلظت و اندازه ذرات HDL تا حدودی به مکانیسم‌های خروج کلسترول از سلول وابسته می‌باشد (۱۰). یوشیناری و

همکاران در موش‌های ترا ریخته با بیان بیش از حد ABCA1، افزایش در HDL پلاسما و افزایش پذیرندگی HDL برای کلسترول و در نهایت افزایش سطوح فسفولیپید در ذرات HDL را نشان دادند که نشان از افزایش قابلیت خروج کلسترول از سلول‌ها داشت. این پژوهشگران اظهار داشتند که افزایش فعالیت ژن ABCA1 محافظت قابل ملاحظه‌ای در برابر بیماری‌های قلبی را منجر می‌شود (۱۱). در خصوص پاسخ و سازگاری اجزای اصلی مراحل انتقال معکوس کلسترول مطالعات اندکی وجود دارد و پژوهش‌های انجام شده در کشورمان بیشتر به بررسی بیان ژن‌های ABCA1 و ABCG1 پرداخته‌اند. با وجود پیشرفت در زمینه داروها و مداخله‌های درمانی، پیش‌بینی و جلوگیری از بسیاری از بیماری‌های قلبی همچنان مشکل است و جست‌وجو برای یافتن راهبردهای جدید برای پیشگیری و بهبود این بیماری‌ها همچنان ادامه دارد. تمرینات ورزشی کیفیت زندگی، ظرفیت‌های عملکردی، التهاب و در کل سلامتی قلب را بهبود می‌بخشد، ولی ساز و کارهای شرکت‌کننده در این رویدادها هنوز به طور کامل ناشناخته‌اند. در سال‌های اخیر، علاقه به تحقیق در حوزه ژنتیک و پاسخ بدن به فعالیت ورزشی افزایش یافته است و شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهند سازگاری‌های فیزیولوژیکی ناشی از فعالیت‌های ورزشی با بیان ژن همراه‌اند (۱۲). لذا نشان دادن بیان یا عدم بیان ژن‌های مرتبط با انتقال معکوس ناشی از تمرین ورزشی جهت بهبود عملکرد و یا پیشگیری از آسیب‌های احتمالی قلبی عروقی ضروری به نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها

روش پژوهش حاضر تجربی و از نظر یافته‌ها یک مطالعه کاربردی می‌باشد. این مطالعه تجربی در کمیته اخلاق حیوانات دانشگاه علوم پزشکی ایران تصویب شد و بر اساس راهنمای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام شد. در این مطالعه ۲۴ سر موش صحرایی نر ویستار (۲۵۰-۲۰۰ گرم، خریداری‌شده از

دانشگاه علوم پزشکی ایران) مورد استفاده قرار گرفتند. حیوانات ۳ گروه ۸ تایی: کنترل، تمرین تناوبی شدید و تمرین تداومی زیر بیشینه در آزمایشگاه استاندارد جوندگان (چرخه ۱۲ ساعت روشنایی-تاریکی و میانگین درجه حرارت 22 ± 2 درجه سلسیوس) با دسترسی آزادانه به آب و غذا در بیمارستان قلب و عروق شهید رجایی نگهداری می‌شدند.

متغیرهای مداخله‌گر قابل کنترل شامل موارد زیر بودند: کلیه نمونه‌ها از مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران به‌طور سالم تحویل گرفته شدند و از غذای یکسان به‌صورت پلت، خریداری‌شده از موسسه تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران استفاده کردند. نمونه‌ها علاوه بر یکسان بودن به لحاظ سنی، در شروع پروتکل به لحاظ وزنی نیز همگن‌سازی شدند (محدوده وزنی 20 ± 20 گرم)، سن رت‌ها هشت هفته بود و در شرایط یکسان و تحت دما، رطوبت، تهویه و چرخه روشنایی تاریکی مطلوب برای نگهداری حیوانات آزمایشگاهی نگهداری شدند.

آشناسازی رت‌ها با پروتکل ورزشی تناوبی شدید و تداومی زیر بیشینه با ۵ جلسه تمرین در یک هفته انجام شد. به این صورت که در روز اول تمرین، رت‌ها را با نهایت دقت و آرامش بر روی تردمیل گذاشته و با سرعت بسیار پایین و یکنواخت شروع به تمرین کردند و در جلسات بعد که رت‌ها به‌خوبی و همگام با برنامه پیش می‌آمدند جهت آشنایی با پروتکل تناوبی و تداومی موردنظر با سرعت‌های کم از تمرین تناوبی و تداومی استفاده گردید تا رت‌ها به نوع تمرین عادت کنند و با پروتکل آشنا شوند. این کار تا پایان جلسه ۵ آشنایی انجام شد و همه رت‌ها با این پروتکل‌ها آشنا شدند و بدون هیچ نوع مشکلی در پروتکل و آشنایی رت‌ها پس از آن، تمرین اصلی به مدت ۸ هفته شروع و به پایان رسید.

پروتکل تمرینی و روش اجرای آزمون ورزشی

برنامه پروتکل تناوبی شامل ۵ دقیقه گرم کردن (با شدت ۵۰٪ تا ۶۰٪ VO_{2max})، ۷ دقیقه تناوب (۴ دقیقه با شدت ۸۵٪ تا ۹۰٪ VO_{2max} و ۲ دقیقه با شدت ۵۰٪ تا ۶۰٪ VO_{2max}) و ۳ دقیقه سرد کردن با شدت ۵۰٪ تا ۶۰٪ VO_{2max} بود. رت‌ها سه جلسه در هفته در هشت هفته به تمرین پرداختند. تمرین تداومی روی نوار گردان با شدت متوسط نیز برای ۵ روز در هفته اجرا شد در مرحله آشنایی (هفته اول) رت‌ها هرروز به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰ متر در دقیقه روی نوار گردان راه‌رفته و بر طبق پروتکل ورزشی که بر اساس درصدی از حداکثر اکسیژن مصرفی (که به متر بر دقیقه تبدیل گردید) سه جلسه در هفته در هشت هفته بعد به تمرین پرداختند. این شدت فعالیت معادل ۵۰ تا ۵۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی رت بود. سرعت دویدن به تدریج به میزان ۰/۲ متر در دقیقه در هر هفته افزایش یافت و شیب تردمیل در کل طول دوره تمرینی ثابت بود (۱۳،۱۴). کلیه جلسات تمرین ساعت ۸ تا ۱۳ انجام شد.

روش اندازه‌گیری VO_{2max} رت‌ها

بر اساس مطالعه هویدال و همکاران، هر رت ابتدا به مدت ۱۰ دقیقه با شدت ۱۰ متر در دقیقه مرحله گرم کردن را سپری می‌کردند، سپس آزمون فزاینده ورزشی آغاز می‌شد، هر دو دقیقه سرعت تردمیل ۰/۳ m/sec به صورت خودکار افزایش می‌یافت تا زمانی که رت‌ها قادر به ادامه فعالیت ورزشی نبودند. با توجه به سرعت نهایی به دست آمده در انتهای آزمون بیشینه و بر اساس مطالعه هویدال و همکاران سرعت موردنظر در شدت‌های برنامه تمرینی به دست آمد (۱۳،۱۴).

۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین رت‌ها پس از ۱۴ ساعت ناشتایی شبانه نمونه‌برداری بافت کبدی انجام شد و برای جمع‌آوری نمونه‌ها ابتدا حیوان با ترکیبی از داروی زایلازین (۱۰ میلی گرم/کیلوگرم) و کتامین (۷۵

میلی گرم/کیلوگرم) به صورت تزریق درون صفاقی بی‌هوش شدند. سپس، قفسه سینه حیوان شکافته شد و برای اطمینان از کمترین آزار حیوان، خون به طور مستقیم از قلب حیوان گرفته شد. سپس کبد رت‌ها از بدن آن‌ها جدا و در سرم فیزیولوژیک شست‌وشو داده شدند تا خون موجود در آن همراه با کمی فشار دادن به طور کامل خالی گردد و سپس روی کاغذ فیلتر گذاشته شدند تا رطوبت آن گرفته شود و آماده وزن‌کشی شوند. کبد رت‌ها در ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن‌کشی شده سپس بلافاصله با استفاده از ت مایع منجمد شده برای تلخیص RNA به فریزر با دمای ۸۰- منتقل شدند.

آماده سازی نمونه‌ها

در این مطالعه برای بررسی تغییرات بیان ژن متغیرهای وابسته تحقیق از تکنیک qRT-PCR استفاده شد. بدین منظور ابتدا RNA سلول‌ها استخراج شد و سپس طی مراحل به نام DNase I treatment، با DNaseI تیمار شد. در این روش در صورت وجود DNA اضافی در نمونه، DNA حذف می‌شود. در نهایت cDNA ساخته شد و واکنش‌های qRT-PCR انجام شد.

استخراج RNA از بافت نمونه با استفاده از Qiazol (کیت Qiagen، آلمان) با توجه به توصیه سازنده استخراج شد. به منظور از بین بردن احتمالی آلودگی RNA با DNA از آنزیم DNase عاری از RNase استفاده شد. مقادیر لازم بر حسب غلظت RNA استخراج شده تعیین شد. بدین ترتیب به ازای یک میکروگرم RNA استخراج شده یک میکرو لیتر DNase (۱μl, Fermentase) و یک میکرو لیتر بافر 10x اضافه شد و حجم محلول با آب تیمار شده با DEPC به ۱۰ میکرو لیتر رسانده شد. محلول حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد، سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا آنزیم غیرفعال شود. غلظت RNA به روش اسپکتروفتومتری (Eppendorff) UV

سازنده انجام گرفت. ۴۰ سیکل برای هر چرخه Real-time PCR در نظر گرفته شد و دماهای هر سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه تنظیم شدند. برای تمامی ژن‌های مورد مطالعه نیز ژن رفرنس یعنی بتا‌اکتینین جهت به دست آوردن دمای مناسب Anneling گرادیان دمایی انجام گردید. همچنین جهت بررسی efficiency پرایمرها، منحنی استاندارد اختصاصی هر ژن (سری‌های رقیق شده DNA) رسم گردید. نمودار Melting نیز جهت بررسی صحت واکنش‌های PCR انجام شده به صورت 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. ژن مرجع تقریباً برابر بود. با استفاده از قرار دادن داده‌ها در فرمول‌های $\Delta\Delta Ct$ و $\Delta\Delta Ct-2$ میزان بیان ژن هدف با ژن مرجع نرمال سازی شد.

آنالیز آماری

از آمار توصیفی برای دسته‌بندی داده‌های خام و توصیف داده‌ها استفاده شد. آزمون کولموگروف اسمیرنوف (K-S) برای بررسی نرمال بودن داده‌ها در گروه‌های مورد مطالعه و آزمون آماری تحلیل واریانس یک طرفه استفاده شد. سطح معنی‌داری برای کلیه آزمون‌های آماری ۰/۰۵ α در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ و ترسیم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۰۷ انجام گرفت.

یافته‌ها

نتایج بیان ژن‌ها

نتایج آزمون کولموگروف-اسمیرنوف در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲. نتایج آزمون کولموگروف اسمیرنوف و آزمون لون جهت بررسی همگنی واریانس خطا در متغیرهای وابسته

متغیر	کولموگروف اسمیرنوف	سطح معناداری (Sig)
آلفا LXR ژن	۱/۰۱	۰/۲۵۱
بتا LXR ژن	۰/۸۹۷	۰/۳۹۶

آلمان) تعیین شد. جهت ساخت cDNA به ۱-۰/۲ میکروگرم RNA استخراج شده، ۱ میکرو لیتر Oligo dt اضافه شد. حجم نهایی این مرحله باید ۱۲ میکرو لیتر باشد. بدین ترتیب اگر RNA غلیظ‌تر بود مقدار کمتری از آن برداشته شد و با آب تیمار شده با DEPC به حجم نهایی ۱۲ میکرو لیتر رسانده شد. واکنش به مدت ۵ دقیقه در ۷۰- درجه سانتی گراد قرار داده شد و سپس بلافاصله درون یخ گذاشته شد. به میکرو فیوژ، ۴ میکرو لیتر بافر X5، ۲ میکرو لیتر dNTP و ۱ میکرو لیتر RNase اضافه شد تا حجم نهایی به ۱۹ میکرو لیتر برسد. محلول واکنش به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. یک میکرو لیتر آنزیم RT به واکنش اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در ۴۲ درجه سانتی گراد انکوبه شد. برای متوقف کردن واکنش، میکرو تیوب به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. cDNA حاصل روی یخ قرار داده شد و تا زمان انجام واکنش PCR در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. برای طراحی پرایمرها ابتدا توالی mRNA مربوط به ژن LXR-Alpha و LXR- β با استفاده از سایت NCBI استخراج شد. پرایمرها توسط نرم‌افزار کامپیوتری Allel ID ساخته شد و سپس هر پرایمر توسط نرم‌افزار BLAST جهت اطمینان از یکتا بودن محل جفت شدن پرایمرها مورد ارزیابی قرار گرفت. پرایمرها توسط شرکت سیناکولن ساخته شد. در این تحقیق از ژن بتا‌اکتینین به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. جدول ۱ توالی پرایمر های مورد نظر را نشان می‌دهد.

جدول ۱. توالی پرایمر های طراحی شده (F: پرایمر رفت، R:

پرایمر برگشت)

نام پرایمر	سکانس (5-3)
Rat LXR-Alpha-F:	5'- GATGTTTCTCTGACTCT -3'
Rat LXR-Alpha-R:	5'- GAAGTTCTGTAGGCTCTG -3'
Rat LXR- β F:	5'- TGGAACGAGGCTGCTT -3'
Rat LXR- β R:	5'- GGTGAAGTGGAGGAGGTA -3'

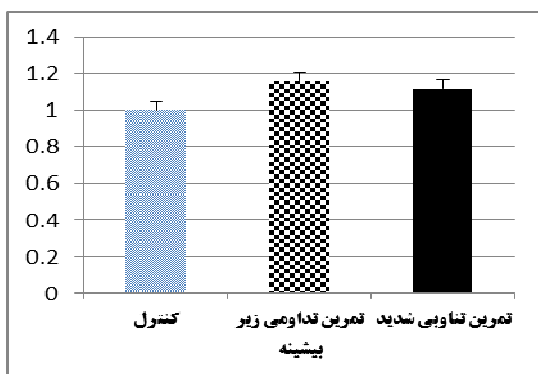
هر واکنش PCR با استفاده از PCR master mix (Applied Biosystems) و در دستگاه SYBR Green (Applied Biosystems, Sequence) طبق پروتکل شرکت

($P=0/001$)، تفاوت معناداری بین بیان ژن LXR بتا در گروه‌های مختلف پژوهش با ۹۵٪ اطمینان تأیید نشد. جدول ۴. بیان ژن LXR بتا در سه گروه کنترل، تداومی زیر بیشینه و تناوبی در انتهای پروتکل

گروه‌ها	مقادیر بیان ژن	مجدور	درجه آزادی	F ارزش	P ارزش
تناوبی شدید تمرین	$3/4 \pm 2/6$	۰/۸	۰/۱۴	۲	۰/۷۵
تداومی زیر بیشینه	$3/5 \pm 1/8$				
کنترل	$3/01 \pm 2/3$				

* تفاوت معنی‌دار در $p < 0/05$

نتایج آزمون آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که اختلاف معناداری بین ۳ گروه در میزان بیان ژن LXR بتا وجود ندارد. هرچند نتایج نشان از افزایش جزئی در گروه‌های تمرین تناوبی و تداومی بود اما این افزایش اندک منجر به ایجاد تفاوت معنادار نشده است (نمودار ۲).



نمودار ۲. تفاوت میزان بیان ژن LXR بتا در گروه تمرین تناوبی، تداومی نسبت به گروه کنترل پس از ۸ هفته

بحث و نتیجه گیری

پژوهش‌های مرتبط با پیشگیری از بیماری‌های قلبی عروقی نشان می‌دهند که بین ازدیاد HDL و مقدار رسوب چربی در عروق ارتباط معکوسی وجود دارد (۲). افزایش در هر واحد HDL و کاهش LDL به بهبود عملکرد سیستم قلب و عروق و پیشگیری از بیماری‌های مرتبط با آن کمک شایانی می‌کند. فعالیت منظم بدنی به واسطه ایجاد سازگاری‌های متابولیکی خصوصاً در متابولیسم چربی، می‌تواند ره‌آورد مهمی برای حفظ سلامت بشر در جوامع امروز باشد (۱). در انتقال معکوس، گیرنده‌هایی که

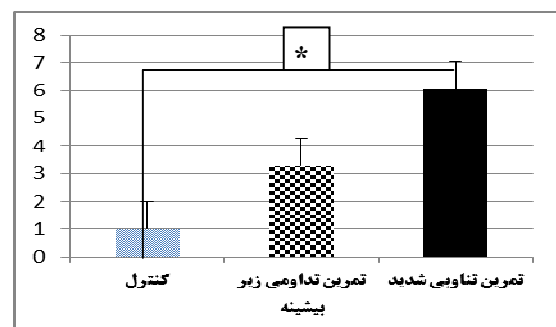
جدول ۳. نتایج آزمون آنالیز واریانس یک طرفه، برای بیان ژن LXR آلفا را نشان می‌دهد. با توجه به مقدار F محاسبه شده ($6/7$) و معنی‌دار بودن آن در سطح $P < 0/001$ ، تفاوت معناداری بین بیان ژن LXR آلفا در گروه‌های مختلف پژوهش با ۹۵٪ اطمینان تأیید شد.

جدول ۳. بیان ژن LXR آلفا در سه گروه کنترل، تداومی زیر بیشینه و تناوبی در انتهای پروتکل

گروه‌ها	مقادیر بیان ژن	مجدور	درجه آزادی	F ارزش	P ارزش
تناوبی شدید تمرین	$10/9 \pm 7/8$	۲	۶/۷	۱۵۶/۶	$0/001$ *
تداومی زیر بیشینه	$6/02 \pm 3/1$				
کنترل	$1/8 \pm 1/6$				

* تفاوت معنی‌دار در سطح $p < 0/05$

برای بررسی اختلاف مورد نظر از آزمون تعقیبی بونفرونی استفاده شد. نتایج نشان داد که بیان ژن LXR آلفا در تمرین تناوبی شدید افزایش معناداری نسبت به گروه کنترل داشت ($P < 0/004$). ولی اختلافی بین گروه تداومی زیر بیشینه با گروه کنترل وجود ندارد ($P = 0/28$). همچنین اختلافی بین گروه تداومی زیر بیشینه و تناوبی شدید وجود ندارد ($P = 0/18$). در واقع نتایج نشان داد تمرین تناوبی شدید به نسبت تمرین تداومی زیر بیشینه می‌تواند منجر به افزایش بیشتر بیان ژن LXR آلفا شود (نمودار ۱).



نمودار ۱. تفاوت میزان بیان ژن LXR آلفا در گروه تمرین تناوبی، تداومی نسبت به گروه کنترل پس از ۸ هفته

* بیانگر تفاوت معنادار بین گروه تناوبی شدید و گروه کنترل

نتایج آزمون آنالیز واریانس یک‌راهه، برای بیان ژن LXR بتا در جدول ۴، آورده شده است. با توجه به مقدار F محاسبه شده ($0/14$) و معنی‌دار نبودن آن در سطح

بر روی کبد وجود دارند نقش اساسی را برای این فرآیند ایفا می‌کنند. گیرنده‌های کبدی ایکس (LXR) در فرایندهای متابولیسم سلولی، تکثیر سلولی، تمایز و پاسخ ایمنی درگیرند. گیرنده‌های هورمونی هسته‌ای با اتصال به لیگندهای مربوطه امکان پاسخ به سیگنال‌های خارج سلولی را برای سلول‌ها فراهم می‌کنند (۶).

پژوهش حاضر نشان داد بین هشت هفته اجرای تمرینات تناوبی شدید (HIIT) و تداومی زیر بیشینه به نسبت گروه کنترل، تمرینات ورزشی منجر به افزایش بیان ژن LXR آلفا در کبد رت‌های نژاد ویستار می‌شود ($P < 0.05$). درواقع نتایج نشان از برتری تمرینات تناوبی شدید به نسبت تمرینات تداومی زیر بیشینه در میزان افزایش بیان ژن بود ($P < 0.05$).

نتایج پژوهش حاضر نشان از افزایش معنادار بیان ژن LXR آلفا در تمرین تناوبی شدید به نسبت گروه کنترل بود ($P = 0.004$). درواقع نتایج نشان داد تمرین تناوبی شدید به نسبت تمرین تداومی زیر بیشینه می‌تواند منجر به افزایش بیان ژن LXR آلفا شود. ولی این اختلاف معنادار نمی‌باشد ($P = 0.18$)؛ اما میزان میانگین افزایش بیان ژن در گروه تناوبی بیشتر از گروه تداومی است.

همچنین اختلاف معناداری بین ۳ گروه در میزان بیان ژن LXR بتا وجود ندارد. هرچند نتایج نشان از افزایش جزئی در گروه‌های تمرین تناوبی و تداومی بود اما این افزایش اندک منجر به ایجاد تفاوت معنادار نشده است.

نتایج پژوهش حاضر در رابطه با گیرنده‌های کبدی نوع آلفا با نتایج پژوهش کاظمی نسب و همکاران موافق و همسوست و در رابطه با نتایج مربوط به گیرنده نوع بتا با نتایج پژوهش ذکر شده مخالف و ناهم‌سوست. کاظمی نسب و همکاران در پژوهشی به بررسی تأثیر ۴ هفته فعالیت هوازی بر نیمرخ لیپیدی و گیرنده‌های کبدی رت‌ها پرداختند. نتایج پژوهش آن‌ها نشان داد که تمرین هوازی به‌صورت معناداری منجر به افزایش گیرنده‌های

کبدی و همچنین افزایش معنادار HDL و کاهش کلسترول رت‌ها شد (۱۵). لازم به ذکر است که متغیر وابسته در این پژوهش نیز گیرنده کبدی نوع آلفا بوده است. برخی تحقیقات به ارتباط بین عوامل گیرنده‌های کبدی با پروکسی زوم‌ها (PGC-1 α Peroxisome Proliferator-activated Receptor α) اشاره کرده‌اند. درواقع پروکسی زوم‌ها در بافت‌هایی که اسید چرب را به میزان زیادی تجزیه می‌کنند بیان می‌شود؛ مانند کبد، قلب، بافت چربی قهوه‌ای، کلیه و روده. این گیرنده در تنظیم بیان ژن‌های کد کننده پروتئین‌های دخیل در جذب اسیدهای چرب آزاد، بتا اکسیداسیون و جابجایی کلسترول سلولی نقش دارد (۱۵).

به دنبال تمرینات تناوبی شدید (مخصوصاً) و تداومی زیر بیشینه افزایش زیاد کلسیم درون سلولی و تخلیه شدید ATP اتفاق می‌افتد، زیرا مسیرهای پیام‌رسانی بالادستی فعال‌سازی PGC-1 α و بیوژنز میتوکندریایی در پاسخ به اجرای HIIT هنوز به‌خوبی شناخته‌نشده‌اند، اما احتمالاً به تغییرات شدید نسبت ATP:ADP/AMP درون عضلانی و همچنین فعال شدن AMPK که به دنبال فعالیت بدنی می‌باشد، وابسته است (۱۶). اینکه کدام‌یک بیشتر تأثیر داشته است مشخص نیست و باید مطالعه شود.

درزمینه اجرای HIIT و بیوژنز میتوکندریایی چندین مطالعه انجام‌شده است که معمولاً در آن‌ها پاسخ یک وهله فعالیت یا تأثیر دو هفته تمرین را بررسی کرده بودند. ازجمله این تحقیقات، می‌توان به مطالعه جیبالا و همکاران اشاره کرد که تأثیر دو هفته تمرینات استقامتی کم‌حجم، اما پر شدت تناوبی (SIT) را در مقابل تمرینات پر حجم استقامتی سنتی (ET) بر ظرفیت اکسیداتیو ۱۶ مرد جوان سالم بررسی کرد. نتایج این پژوهش نشان داد با اینکه میزان تمرین برای گروه SIT در دو هفته، هشت ساعت (معادل ۹۰ درصد حجم کاری) و در حدود ۵۹۰۰

کیلوکالری کمتر از گروه ET بود، اما ظرفیت اکسیداتیو و میزان فعالیت COX-4 و محتوای پروتئینی COX-4 به یک میزان افزایش یافته بود. آنها بیوژنز میتوکندریایی حاصله را ناشی از افزایش PGC-1 گزارش کردند (۱۷). این افزایش پروکسی زومها (PGC-1 α) شاید منجر به تحریک و تغییر در بیان ژن گیرنده‌های کبدی شود. در واقع با تغییر در متابولیسم گلوکز و اسید چرب به دنبال تمرینات ورزشی تغییر در گیرنده‌های کبدی نیز رخ می‌دهد که این تغییر در گروه تناوبی شدید مشهودتر می‌باشد.

به طور کلی مکانیسم‌هایی که اثر فعالیت ورزشی را روی بیان ABCA1 لنفوسیتی توجیه کنند عمدتاً به فعال‌سازی گیرنده‌های ایکس کبدی (به ویژه گیرنده‌های ایکس کبدی آلفا)، گیرنده‌های ایکس شبکیه‌ای (RXR) و گیرنده‌های هسته‌ای PPAR مربوط می‌باشد (۱۸). نشان داده شده که فعالیت بدنی و ورزش باعث فعال شدن این گیرنده‌ها می‌شود. از طرفی گیرنده‌های PPAR که شبیه به گیرنده‌های ایکس کبدی و گیرنده ایکس شبکیه‌ای هستند جریان کلسترول را به وسیله القای نسخه‌برداری گیرنده‌های ایکس کبدی آلفا و بنابراین ABCA1 افزایش می‌دهد (۱۹). در پژوهش حاضر همان گونه که در بالا اشاره شد میزان بیان نوع آلفا آن به دنبال تمرینات ورزشی افزایش یافته است؛ اما تغییر در میزان بیان ژن نوع بتا مشاهده نشده است. شاید یکی از دلایل این اختلاف نتایج به نوع محل تولید این نوع گیرنده‌ها برگردد. گیرنده نوع آلفا در طحال، کبد، بافت چربی، روده، کلیه و ریه‌ها و نوع بتا در تمام بافت‌ها بیان می‌شوند. به دلیل اینکه بافت مورد نظر هدف در این پژوهش اختصاصاً کبد می‌باشد، شاید میزان بیان ژن آلفا در کبد بیشتر از نوع بتا باشد.

تمرینات ورزشی کیفیت زندگی، ظرفیت‌های عملکردی، التهاب و در کل باعث بهبود در عوامل مهم و درگیر در فرآیند انتقال معکوس کلسترول می‌شود، ولی ساز و کارهای شرکت کننده در این رویدادها هنوز به طور کامل ناشناخته‌اند. در سال‌های اخیر، علاقه به تحقیق در حوزه ژنتیک و پاسخ بدن به فعالیت ورزشی افزایش یافته است و شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهند سازگاری‌های فیزیولوژیکی ناشی از فعالیت‌های ورزشی با بیان ژن‌های مختلفی همراه‌اند. یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان داد بیان ژن LXR آلفا، در تمرین تناوبی شدید افزایش معناداری به نسبت گروه کنترل داشت ($P < 0.004$). همچنین نتایج نشان داد که اختلاف معناداری بین ۳ گروه در میزان بیان ژن LXR بتا وجود ندارد. هر چند نتایج نشان از افزایش جزئی در گروه‌های تمرین تناوبی و تداومی بود اما این افزایش اندک منجر به ایجاد تفاوت معنادار نشده است. به طور کلی یافته‌های پژوهش حاضر نشان از برتری تمرینات تناوبی شدید به نسبت تمرینات تداومی زیر بیشینه در انتقال معکوس کلسترول دارد. تمرینات تناوبی شدید از طریق خروج بیان ژن گیرنده مهم کبدی و همچنین عامل اصلی خروج کلسترول از کبد و در نهایت گیرنده HDL می‌تواند نقش مهمی در کاهش بیماری‌های قلبی-عروقی مانند آترواسکلروزیس داشته باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مدیریت محترم، تمامی مسئولین و کارشناسان آزمایشگاه مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه ایران و سایر کسانی که ما را در انجام مطلوب این پژوهش یاری دادند، سپاسگزاری می‌نمایم. این مقاله از پایان نامه دوره دکتری نویسنده مسئول استخراج شده است.

References

1. Gharipour M, Sadeghi M, Dianatkah M, Nezafati P, Talaie M, Oveisgharan S, et al. Comparison between European and Iranian cutoff points of triglyceride/high-density lipoprotein cholesterol concentrations in predicting cardiovascular disease outcomes. *J Clin Lipidol*. 2016; 10(1): 143-149.
2. Acharjee S, Boden WE, Hartigan PM, Teo KK, Maron DJ, Sedlis SP, et al. Low levels of high-density lipoprotein cholesterol and increased risk of cardiovascular events in stable ischemic heart disease patients: A post-hoc analysis from the COURAGE Trial (Clinical Outcomes Utilizing Revascularization and Aggressive Drug Evaluation). *J Am College Cardiol*. 2013; 62(20): 1826-1833.
3. Oram JF. HDL apolipoproteins and ABCA1 partners in the removal of excess cellular cholesterol. *Arteriosclerosis, thrombosis, Vascular Biol*. 2014; 23(5): 720-727.
4. Srivastava N. ATP binding cassette transporter A1-key roles in cellular lipid transport and atherosclerosis. *Mol Cell Biochem*. 2002; 237(1-2): 155-164.
5. Butcher L, Thomas A, Backx K, Roberts A, Webb R, Morris K. Low-intensity exercise exerts beneficial effects on plasma lipids via PPARF. *Med Sci Sports Exerc*. 2008; 40(7): 1263-1270.
6. Archer A, Laurencikienė J, Ahmed O, Steffensen KR, Parini P, Gustafsson J-A, et al. Skeletal muscle as a target of LXR agonist after long-term treatment: focus on lipid homeostasis. *Am J Physiology-Endocrin Metab*. 2014; 306: 494-502.
7. Eichner JE, Dunn ST, Perveen G, Thompson DM, Stewart KE, Stroehla BC. LXR agonist increases the lymph HDL transport in rats by promoting reciprocally intestinal ABCA1 and apo AI mRNA levels. *Am J Epidemiol*. 2002; 155(6): 487-495.
8. Gylling H, Simonen P. Phytosterols, phytostanols, and lipoprotein metabolism. *Nutrients*. 2015; 7(9): 7965-7977.
9. Khabazian BM, Ghanbari Niaki A, Rahbarizadeh F, HosseiniKakhak SA, RandJabariKouchabi M. The Effect of 6 Weeks of Endurance Training on the Expression of Hepatic ABCA1 in Male Wistar Rats. *World J Sport Sci*. 2008; 6: 101-114.
10. Masson D, Jiang XC, Lagrost L, Tall AR. The role of plasma lipid transfer proteins in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J Lipid Res*. 2009; 50: 201-206.
11. Yoshinari U, Keijiro S. High-density lipoprotein and atherosclerosis: Roles of lipid transporters. *World J Cardiol*. 2014; 6(10): 1049-1059.
12. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. Elsevier Health Sci. 2014.
13. Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen Ø. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *European J Cardiovascular Prev Rehabil*. 2007; 14(6): 753-760.
14. Wisløff U, Støylen A, Loennechen JP, Bruvold M, Rognmo Ø, Haram PM, et al. Superior cardiovascular effect of aerobic

- interval training versus moderate continuous training in heart failure patients. *Circulation*. 2007; 115(24):3086-3094.
15. Kazeminasab F, Marandi M, Esfarjani F, Moshtaghian J. The Effect of Endurance Training on Lipid Profile and Expression Level of Liver X Receptor α Gene in Male Wistar Rats. *Genetics in the 3rd millennium*. 2017; 10(2): 714-2721.
 16. Aoi W, Naito Y, Mizushima K, Takanami Y, Kawai Y, Ichikawa H, et al. The microRNA miR-696 regulates PGC-1 α in mouse skeletal muscle in response to physical activity. *Am J Physiol Endocrin Metab*. 2010; 298(4): 799-806.
 17. Gibala MJ, Little JP, Van- Essen M, Wilkin GP, Burgomaster KA, Safdar A, et al. Short-term sprint interval versus traditional endurance training: similar initial adaptations in human skeletal muscle and exercise performance. *J Physiol*. 2006; 575(3): 901-911.
 18. Gibala MJ, McGee SL, Garnham AP, Howlett KF, Snow RJ, Hargreaves M. Brief intense interval exercise activates AMPK and p38 MAPK signaling and increases the expression of PGC-1 α in human skeletal muscle. *J Applied Physiol*. 2009; 106(3): 929-934.
 19. Brousseau ME, Schaefer EJ, Wolfe ML, Bloedon LT, Digenio AG, Clark RW, et al. Effects of an inhibitor of cholesteryl ester transfer protein on HDL cholesterol. *NEJM*. 2004; 350(15):1505-1515.

The effect of eight weeks of high intensity interval training on gene expression of liver X receptors (LXR) in Wistar male rats

Hasanvand B^{*1}, Soori R², Choobine S², Akbarnejed A²

1. Assistant Professor, Department of Physical Education, Faculty of Literature, Islamic Azad University, Khorramabad Branch, Khorramabad, Iran, Hasanvand121@gmail.com

2. Associate Professor, Department of Physiology, Faculty of Physical Education, University of Tehran, Tehran, Iran.

Received: 12 Sep 2017 **Accepted:** 22 Oct 2017

Abstract

Background: This study aimed to investigate the effect of eight weeks of interval training on gene expression of liver X receptors (LXR) in Wistar male rats.

Materials and Methods: In this study, 24 male wistar rats (200-250 g) were randomly used to three groups for this purpose, 24 male Wistar rats were prepared and divided into three groups: control (8 = n), high intensity intermittent exercise (8 = n) and continuous submaximal exercise (8 = n), respectively. The treadmill exercise program was performed for eight weeks, three days a week for 40 minutes. High intense exercise protocol, 30 minutes running periodic (every period of four minutes and two minutes running with 90-85% of VO₂ max intensity active recovery with 60-50% of VO₂ max) three days a week for eight weeks. Also, the continuous training group under maximum was an exercise intensity equivalent to 50 to 55 percent of maximum oxygen consumption of the mice.

Results: The results showed that there was a significant difference between the four groups in the gene expression level, after data analysis and test research hypotheses, findings of this study show that the expression of LXR alpha gene, apolipoprotein 1, ABCG1 a significant increase in intensity interval exercise than the control group ($p = 0.004$). The results also showed a significant difference between the three groups in the expression of LXR beta and apolipoprotein 2, SR-BI does not exist. Although the results showed a slight increase in groups of periodic training and continuing slight increase, but this has not led to a significant difference.

Conclusion: Overall results indicated the superiority of intense interval training than submaximal exercise in reverse cholesterol transport is continuous. Intense interval training by increasing hepatic expression of the receptor gene as well as the main cause of the liver and eventually out HDL receptors can play an important role in reducing cardiovascular diseases such as atherosclerosis.

Keywords: Endurance Training, High Intensity Interval training, liver X receptors.

***Citation:** Hasanvand B, Soori R, Choobine S, Akbarnejed A. The effect of eight weeks of high intensity interval training on gene expression of liver X receptors (LXR) in Wistar male rats. Yafte. 2017; 19(4):11-21.