اثر نوع تمرین ورزشی بر بیان ژن آپولیپوپروتئین ۱ و ۲ در بافت کبدی رت های نر نژاد ویستار

بهمن حسنوند[۱*]، کبری کرمی[۲]، یعقوب مهری الوار[۳]

۱) گروه تربیت بدنی، دانشکده ادبیات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خرم آباد، خرم آباد، ایران
۲) گروه پرستاری، دانشکده پرستاری و مامایی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران
۳) گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده تربیت بدنی، دانشگاه بوعلی، همدان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۹/۱۳ **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۶/۴**

چکیده

مقدمه: اختلال در سوخت و ساز چربی به ویژه ازدیاد کلسترول و تری گلیسیرید و کاهش مقادیر آن، ریسک ایجاد بیماری های آترواسکلروزیس افزایش می دهد. پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر نوع تمرین(تداومی زیربیشینه و تناوبی شدید) بر بیان ژن آپولیپـــوپروتئین ۱ و ۲ در بافت کبدی رت های نر نژاد ویستار انجام شده است.

مواد و روش ها: روش تحقیق تجربی بوده و به همین منظور تعداد ۲۴ سر رت نر نژاد ویستار با محدوده وزنی ۲۰±۲۰۰ گرم و سن هشت هفته، تهیه و به صورت تصادفی به سه گروه، کنترل(n=۸)، تمرین تناوبی شدید(n=۸) و تمرین تداومی زیر بیشینه(n=۸) بخش بندی گردیدند. پروتکل تمرینی تناوبی شدید، ۳۰ دقیقه دویدن تناوبی(هر تناوب شامل ۴ دقیقه دویدن با شدت ۹۰-۸۵ درصد VO2max و ۲ دقیقه بازیافت فعال با شدت ۶۰-۵۰ درصد VO2max) سه روز در هفته و به مدت ۸ هفته اجرا شد. هم چنین گروه تمرین تداومی زیر بیشینه(۳۰ تا ۶۰ دقیقه) نیز شدت فعالیتی معادل ۵۰ تا ۵۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی موش ها بود. بیان ژن متغیرهای آپولیپوپروتئین ۱ و ۲ اندازه گیری شد.

یافته های پژوهش: یافته های این پژوهش نشان داد بیان ژن گیرنده آپولیپوپروتئین ۱ در گروه های تمرین تناوبی شدید(P=0.034) و تداومی زیربیشینه(P=0.047) افزایش معناداری به نسبت گروه کنترل داشت. هم چنین نتایج آزمون تعقیبی بونفرونی نشان داد که اختلافی بین گروه تمرین تداومی زیر بیشینه و تمرین تناوبی شدید وجود ندارد(P=0.9). هم چنین نتایج پژوهش حاضر نشان داد که اختلاف معناداری بین ۳ گروه در میزان بیان ژن آپولیپوپروتئین ۲ وجود ندارد.

بحث و نتیجه گیری: تمرینات تداومی زیربیشینه و تناوبی شدید از طریق افزایش بیان ژن آپولیپوپروتئین ۱ کبدی و هم چنین عامل اصلی خروج کلسترول از کبد و در نهایت گیرنده HDL می توانند نقش مهمی در کاهش بیماری های قلبی-عروقی مانند آترواسکلروزیس داشته باشد.

واژه های کلیدی: تمرین استقامتی، تمرین تناوبی شدید، آپولیپوپروتئین ۱ و ۲

* نویسنده مسئول: گروه تربیت بدنی، دانشکده ادبیات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خرم آباد، خرم آباد، ایران

Email:Hasanvand121@gmail.com

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

اختلال در سوخت و ساز چربی به ویژه ازدیاد کلسترول و تری گلیسیرید و کاهش مقادیر لیپوپروتین پرچگال(lipoprotein High-density) افراد را مستعد بیماری های آترواسکلروزیس می کند. از طرفی سبک زندگی غیرفعال ماشینی هم این بیماری ها را تشدید می کند(۱). پژوهش های مرتبط با پیشگیری از بیماری های قلبی-عروقی نشان می دهند که بین ازدیاد HDL و مقدار رسوب چربی در عروق ارتباط معکوسی وجود دارد(۲). افزایش در هر واحد HDL و کاهش لیپوپروتئین کم چگال(Low-density lipoprotein) به بهبود عملکرد سیستم قلب و عروق و پیشگیری از بیماری های مرتبط با آن کمک می کند. فعالیت منظم بدنی به واسطه ایجاد سازگاری های متابولیکی به ویژه در متابولیسم چربی، می تواند ره آورد مهمی برای حفظ سلامت بشر در جوامع امروز باشد(۱).

HDL نقش آنتی اکسیدانی و ضد التهابی دارد ولی باور عمومی بر آن است که HDL با انتقال معکوس کلسترول(RCT) Reverse Cholesterol (Transport) در پیشگیری از بیماری های قلبی-عروقی موثر است(۳). انتقال معکوس کلسترول به فرآیند جمع آوری کلسترول اضافی از بافت های پیرامونی از جمله ماکروفاژهای دیواره سرخرگی و بازگرداندن آن ها به کبد، همراه با تغییر شکل HDL گفته می شود(۴). رابطه معکوس بین مقادیر HDL پلاسما و خطر آترواسکلروزیس نشان دهنده نقش HDL و گیرنده های آن در پذیرش انتقال کلسترول است. برداشت کلسترول های اضافی از سلول های فوم ماکروفاژ به وسیله HDL یکی از کلیدی ترین مکانیسم های محافظتی HDL در مقابل آترواسکلروزیس است(۵). رابطه معکوس بین مقادیر HDL پلاسما و خطر آترواسکلروزیس نشان دهنده نقش HDL و گیرنده های آن در پذیرش انتقال کلسترول است. برداشت کلسترول های اضافی از سلول های فوم ماکروفاژ به وسیله HDL و آپولیپوپروتئین های اساسی اش(Apolipoprotein A-I) یکی از کلیدی ترین مکانیسم های محافظتی HDL در مقابل آترواسکلروزیس است(۵).

شواهد اولیه در خصوص نقش آپولیپوپروتئین ها در سنتز HDL از آن جا به دست آمد که نشان داده شد آپولیپوپروتئین های HDL مانند APO A-I آپولیپوپروتئین-II(Apolipoprotein A-II) و APO E سبب دفع فسفولیپید و کلسترول از ماکروفاژها و تشکیل ذرات HDL می شوند(۶). بدین ترتیب بسیاری از سلول ها مانند ماکروفاژها و اکثر فیبروبلاست ها قادرند با آپولیپوپروتئین تعامل پیدا کرده و HDL هایی اشباع از کلسترول تولید کنند و این در حالی است که برخی از سلول ها فقط قادر به تولید HDL های بدون کلسترول می باشند(۷). البته برخی از سلول ها مانند سلول های بیماران تانژیر نیز با آپولیپوپروتئین تعامل نیافته و HDL تولید نمی کنند(۸). تحقیقات زیادی به بررسی نقش لیپوپروتئین ها در خروج کلسترول از سلول پرداخته اند و مشخص شده است که پذیرنده ترجیحی کلسترول و فسفولیپید از پروتئین ناقل جعبه ای وابسته به آدنوزین تری فسفات(ATP-binding cassette protein A1)، APO A-I می باشد که آپولیپوپروتئین اصلی در HDL است. APO A-I بیش از ۷۰ درصد پروتئین HDL و ۳۰ درصد توده HDL را تشکیل می دهد(۹). نشان داده شده که نمونه های انسانی با فقدان APO A-I و نمونه های رت با فقدان APO A-I قادر به تشکیل ذرات نرمال HDL نمی باشند(۹-۷). امروزه نیز اکثر تحقیقات بر مسیر ABCA1/APO A-I در دفع کلسترول اضافی سلول تاکید دارند(۱۰).

سودمندی های تمرین برای سلامتی، به ویژه تاثیرات مثبت آن بر عملکرد سیستم پیشگیری و درمان برخی بیماری ها مانند آرترواسکلروزیس بیماری های متابولیسمی کبد مدت ها است که مشخص شده است. تحقیقات نشان داده اند که فعالیت بدنی می تواند به تغییرات مفیدی در نیمرخ لیپوپروتئین های خون از جمله کاهش تری گلیسیرید، LDL، VIDL و افزایش HDL با زیرمجموعه های آن منجر شود و موجب بهبود برخی مراحل کلیدی در فرآیند انتقال معکوس کلسترول مانند افزایش مقدار و ترکیب HDL، افزایش

خروج کلسترول از سلول، افزایش تشکیل و انـــدازه Apo A-I، افزایش Pre Beta HDL پلاسما و افزایش فعالیت آنزیم لسیتین کلسترول اسیل ترانسفراز (Lecithin-Cholesterol Acyl Transferase) شود(۷،۸). در رابطه با ارتباط فعالیت ورزشی و انتقال معکوس کلسترول تحقیقات اندکی انجام شده است. خبازیان و همکاران(۲۰۱۱) در تحقیقی به بررسی تاثیر ۶ هفته تمرین استقامتی بر بیان ژن ABCA1 در روده کوچک رت ویستار پرداخت و گزارش کرد تمرین استقامتی باعث افزایش بیان ژن ABCA1 که عامل کلیدی در خروج کلسترول از سلول است در روده کوچک رت های گروه تجربی نسبت به گروه کنترل شده است(۱۱).

هم چنین پینتو و همکاران(۲۰۱۵) در پژوهشی به بررسی نقش تمرینات هوازی در تغییرات عوامل درگیر در بیان ژن انتقال معکوس کلسترول در ماکروفاژها پرداخت. نتایج پژوهش آن ها نشان داد که ۱۲ هفته فعالیت هوازی می تواند منجر به تسریع انتقال کلسترول به کبد و پیشگیری از آترواسکلروزیس شود(۱۲). در خصوص پاسخ و سازگاری اجزای اصلی مراحل انتقال معکوس کلسترول مطالعات اندکی وجود دارد؛ و پژوهش های انجام شده در کشورمان بیشتر به بررسی بیـــان ژن هـــــای ABCA1 و ABCG1 پرداخته اند. صفرزاده و همکاران(۱۳۸۷) به بررسی تاثیر ۱۲ هفته تمرین هوازی روی نوارگردان، بر بیان ژن ABCA1 و سطـــح APO A-I در بافـــت های (کبد، عضله دوقلو و قلب) رت های ویستار پرداختند و نتایج آن ها نشان داد بیان ژن ABCA1 و سطـــح APO A- I در کبد و عضله دوقلوی گروه تجربی، به طور معنی داری بالاتر از گروه کنترل بود(۱۳). توفیقی و همکاران(۲۰۱۵) به این نتیجه رسیدند که تمرین هوازی می تواند با افزایش در بیان mRNA ژن عوامل درگیر در انتقال معکوس کلسترول زنان چاق، نقش موثری در پیشگیری از بیماری های قلب و عروق داشته باشد(۱۴).

با وجود پیشرفت در زمینه داروها و مداخله های درمانی، پیـــش بینی و جلوگیری از بسیـــاری از بیماری های قلبی هم چنان مشکل است و جست و جو برای یافتن راهبردهای جدید برای پیشگیری و بهبود این بیماری ها هم چنان ادامه دارد. تمرینات ورزشی کیفیت زندگی، ظرفیت های عملکردی، التهاب و در کل سلامتی قلب را بهبود می بخشد، ولی ساز و کارهای درگیر در این رویدادها هنوز به طور کامل ناشناخته اند. در سال های اخیر، علاقه به تحقیق در حوزه ژنتیک و پاسخ بدن به فعالیت ورزشی افزایش یافته است و شواهدی وجود دارد که نشان می دهند سازگاری های فیزیولوژیکی ناشی از فعالیت های ورزشی بابیان ژن همراه اند(۸،۱۲،۱۳). نشان دادن بیان یا عدم بیان ژن های مرتبط با انتقال معکوس ناشی از تمرین ورزشی جهت بهبود عملکرد و یا پیشگیری از آسیب های احتمـــالی قلبی-عروقی ضروری به نظر می رسد. لذا هدف از اجرای پژوهش حاضر بررسی نقش نوع تمرین ورزشی(تداومی زیر بیشینه و تناوبی شدید) بر تغییرات بیان ژنی عوامل درگیر در انتقال معکوس کلسترول می باشد.

مواد و روش ها

روش پژوهش حاضر از نظر روش اجرا تجربی و از نظر هدف یک مطالعه کاربردی می باشد. این مطالعه تجربی در کمیته اخلاق حیوانات علوم پزشکی ایران تصویب و بر اساس راهنمای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام شد. در این مطالعه ۲۴ سر موش صـــحرایـــی نر ویســـتار(۲۵۰-۲۰۰ گرم، خریداری شده 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 جوندگـــــان(چرخه ۱۲ ساعت روشنایی-تاریکی و میانگین درجه حرارت ۲±۲۲ درجه سلسیوس) با دسترسی آزادانه به آب و غذا در بیمارستان قلب و عـــــروق شهید رجایی نگهداری می شدند.

کلیه نمونه ها از مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران به طور سالم تحویل گرفته شدند و از غذای یکسان به صورت پلت، خریداری شده از موسسه تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشـــگاهی انستیتو پاستور ایران استفاده کردند نمونه ها علاوه بر یکسان بودن به لحاظ سنی، در

شروع پروتکل به لحاظ وزنی نیز همگن سازی شدند (محدوده وزنی ۲۰±۲۰۰ گرم)، سن رت ها هشت هفته بود و در شرایط یکسان و تحت دما، رطوبت، تهویه و چرخه روشنایی تاریکی مطلوب برای نگهداری حیوانات آزمایشگاهی نگهداری شدند.

آشناسازی رت ها 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، رت ها 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 رت ها به خوبی و همگام با برنامه پیش می آمدند جهت آشنایی با پروتکل تناوبی و تداومی مورد نظر با سرعت های کم از تمرین تناوبی و تداومی استفاده گردید تا رت ها به نوع تمرین عادت کنند و با پروتکل آشنا شوند. این کار تا پایان جلسه ۵ آشنایی انجام شد و همه رت ها با این پروتکل ها آشنا شدند و بدون هیچ نوع مشکلی در پروتکل و آشنایی رت ها پس از آن، تمرین اصلی به مدت هشت هفته شروع و به پایان رسید.

تمرین ورزشی و روش اجرای آزمون ورزشی: برنامه تمرینی روی تردمیل طراحی شده ویژه حیوان(ساخت شرکت دانش سالار ایرانیان. ایران. تهران)، ۳ روز در هفته به مدت ۴۰ دقیقه بود که شامل ۵ دقیقه گرم کردن و سرد کردن با شدت ۴۰ تا ۵۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی(VO2max) و ۳۰ دقیقه دویدن تناوبی بود. هر تناوب شامل ۴ دقیقه دویدن با شدت خیلی بالا(تقریباً ۸۵ تا ۹۰ درصد VO2max) و ۲ دقیقه ریکاوری فعال(تقریباً با شدت ۵۰ تا ۶۰ درصد VO2max) بود. شدت تمرین در طی هفته ها بر اساس پژوهش های گذشته(۱۵) و ارتباط بین سرعت دویدن و VO2max تنظیم شد. بنا بر این، شدت تمرینی در هر هفته m/sec ۰/۰۲ افزایش می یافت(۱۶). در گروه تمرین تداوم زیر بیشینه نیز بر اساس درصدی از حداکثر اکسیژن مصرفی(که به متر بر دقیقه تبدیل گردید) سه جلسه در هفته در هشت هفته(شدت فعالیت معادل ۵۰ تا ۵۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی) به تمرین پرداختند. کلیه جلسات تمرین ساعت ۸ تا ۱۳ انجام شد. زمان تمرین(علاوه بر سرعت تردمیل که هر هفته m/sec ۰/۰۲ افزایش می یافت) در هفته های اول ۳۰ دقیقه و در هفته های پایانی به ۶۰ دقیقه رسید(۱۷،۱۵).

روش اندازه گیری VO2max در موش های صحرایی نر نژاد ویستار: بر اساس مطالعه هویدال و همکاران، هر رت ابتدا به مدت ۱۰ دقیقه با شدت ۱۰ متر در دقیقه مرحله گرم کردن را سپری می کردند، سپس آزمون فزاینده ورزشی آغاز شد، هر دو دقیقه سرعت تردمیل m/sec ۰/۰۳ به صورت خودکار افزایش می یافت تا زمانی که رت ها 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 مورد نظر در شدت های برنامه تمرینی به دست آمد(۱۶،۱۵).

۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین رت ها پس از ۱۴ ساعت ناشتایی شبانه نمونه برداری بافت کبدی انجام شد و برای جمع آوری نمونه ها ابتدا حیوان با ترکیبی از داروی زایلازین(۱۰ میلی گرم/کیلوگرم) و کتامین(۷۵ میلی گرم/کیلوگرم) به صورت تزریق درون صفاقی بی هوش می شد. سپس کبد رت ها از بدن آن ها جدا و در سرم فیزیولوژیک شست و شو داده شدند تا خون موجود در آن همراه با کمی فشار دادن به طور کامل خالی گردد و سپس روی کاغذ فیلتر گذشته شدند تا رطوبت آن گرفته شود و آماده وزن کشی شوند. کبد رت در ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ گرم وزن کشی شده سپس بلافاصله با استفاده ازت مایع منجمد شده برای تلخیص RNA به فریزر با دمای ۸۰- منتقل شدند.

در این مطالعه به منظور بررسی تغییرات بیان ژن متغییر وابسته تحقیق از تکنیک qRT-PCR استفاده شد. بدین منظور ابتدا RNA سلول ها استخراج شد و سپس طی مراحلی به نام DNase I treatment، با DNaseI تیمار شد. در این روش در صورت وجود DNA اضافی در نمونه، DNA حذف می شود. در نهایت cDNA ساخته شد و واکنش های 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 برحسب غلظت RNA استخراج شده تعیین شد. بدین ترتیب به ازای یک میکروگرم RNA استخراج شده یک میکرولیتر DNase(Fermentase,1µl) و یک میکرولیتر بافر 10 x اضافه شد و حجم محلول با آب تیمار شده با DEPC به ۱۰ میکرولیتر 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 UV (Eppendorff، آلمان) تعیین شد. جهت ساخت cDNA به ۰/۲-۱ میکروگرم RNA استخراج شده ۱ میکرو لیتر Oligo dt اضافه شد. حجم نهایی این مرحله باید ۱۲ میکرولیتر باشد. بدین ترتیب اگر RNA غلیظ تر بود مقدار کمتری از آن برداشته شد و با آب تیمار شده با DEPC به حجم نهایی ۱۲ میکرولیتر رسانده شد. واکنش به مدت ۵ دقیقه در ۷۰- درجه سانتی گراد قرار داده شد و سپس بلافاصله درون یخ گذاشته شد. به میکروفیوژ، ۴ میکرولیتر بافر X5، ۲ میکرولیتر dNTP و ۱ میکرولیتر RNasin اضافه شد تا حجم نهایی به ۱۹ میکرولیتر برسد. محلول واکنش به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. یک میکرولیتر 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 نرم افزار کامپیوتری Allel ID ساخته شد و سپس هر پرایمر توسط نرم افزار 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 شماره ۱).

توالی پرایمرهای مورد نظر:

جدول شماره ۱. توالی پرایمرهای مورد نظر

Name		Seq. (5-3)
ژن ApoA1	Rat -ApoA1-F:	5’- CTGACAGGTTGCCAAGC -3’
	Rat -ApoA1-R:	5’- CAGGAGATTCAGGTTCAGC -3’
ژن ApoA2	Rat -ApoA2-F:	5’- GTCACCATCTGTAGCCT -3’
	Rat ApoA2-R:	5’- GCCTTCTCCATCAAATCCT -3’

هر واکنش PCR با استفاده از(PCR master mix Applied Biosystems) و SYBR Green در دستگاه ((Applied Biosystems, Sequence 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 سانتی گراد برای ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه تنظیم شدند. برای تمامی ژن های مورد مطالعه نیز ژن رفرنس یعنی بتااکتینین جهت به دست آوردن دمای مناسب Anneling گرادیان دمایی انجام گردید. هم چنین جهت بررسی efficiency پرایمرها، منحنی استاندارد اختصاصی هر ژن(سری های رقیق شده DNA) رسم گردید. نمودار Melting نیز جهت بررسی صحت واکنش های 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 داده ها در فرمول های ΔΔCt و ۲-ΔΔCt میزان بیان ژن هدف با ژن مرجع نرمال سازی شد.

تجزیه و تحلیل داده ها: از آمار توصیفی برای دسته بندی داده های خام و توصیف داده ها استفاده

شد. آزمون شـــاپیرو-ویلک برای بررسی نرمال بودن داده ها، آزمون لون برای بررسی همگنی واریانس ها و آزمون آنالیز واریانـــس یک راهه برای مقایسه بین گروه ها و در صورت مشاهده تـــفاوت معنادار بین گروه ها از آزمون تعقیبی بونفرونی استفاده شد. سطح معنی داری برای کلیه آزمون های آماری $\alpha \leq 0.05$ در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ و ترسیم نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel نسخه ۲۰۰۷ انجام گرفت.

یافته های پژوهش

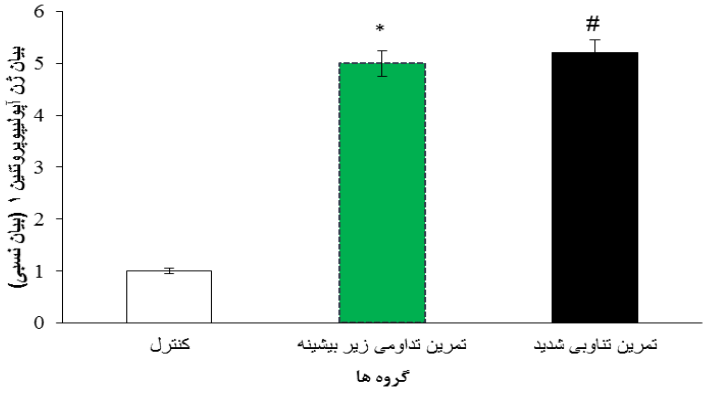
بیان ژن: نتایج آزمون آنالیز واریانس یک راهه، برای بیان ژن گیـــرنده آپولیـــپوپروتئین ۱ در جدول شماره ۲، آورده شـــده است. با تـــوجه به مقدار F محاسبه شده (۵/۱) و معنـــی دار بودن آن در سطح P=0.017، تـــفاوت معنـــاداری بین بـــیان ژن گـــیرنده آپـــولیپوپروتئیـــن ۱ در گروه های مختلف پژوهش با ۹۵ درصد اطمینـــان تایید شد.

جدول شماره ۲. بیان ژن گیرنده آپولیپوپروتئین ۱ در سه گروه کنترل، تداومی زیربیشینه و تناوبی در انتهای پروتکل

گروه ها	مقادیر بیان ژن(بیان نسبی)	مجذور میانگین	درجه آزادی	ارزش F	ارزش P
گروه تمرین تناوبی شدید	۸/۷±۵/۸	۱۲۱/۸	۲	۵/۱	٭۰/۰۱۷
گروه تداومی زیربیشینه	۸/۵±۵/۸				
گروه کنترل	۱/۷±۲/۴				

٭ تفاوت معنی دار در P<0.05

برای بررسی اختلاف مورد نظر از آزمون تعقیبی بونفرونی استفاده شد. نتایج نشان داد که بیان ژن گیرنده آپولیپوپروتئین ۱ به ترتیب در تمرین های تناوبی شدید و تداومی زیربیشینه افزایش معناداری نسبت به گروه کنترل داشتند(P=0.047) و (P=0.034). هم چنین نتایج نشان داد که اختلافی بین گروه تداومی زیر بیشینه و تنـــاوبی شدید وجود ندارد(P=0.9)(نمودار شماره ۱). تفاوت میزان بیان ژن گیرنده آپولیپوپروتئین ۱ در گروه تمرین تناوبی، تداومی نسبت به گروه کنترل پس از ۸ هفته را نشان می دهد.



نمودار شماره ۱. تفاوت میزان بیان ژن آپولیپوپروتئین ۱ در گروه تمرین تناوبی، تداومی نسبت به گروه کنترل پس از ۸ هفته و سطح معناداری برابر ۰/۰۰۱ بود.

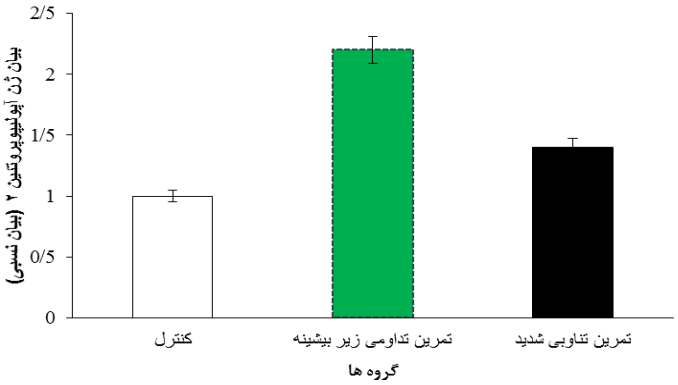
*** کنترل-تداومی زیر بیشینه P<0.001**

 # کنترل-تناوبی شدید P<0.001

هم چنین نتایج آزمون آنالیز واریانس یک راهه، برای بیان ژن گیرنده آپولیپوپروتئین ۲ در جدول شماره ۳، آورده شده است. با توجه به مقدار F محاسبه شده (۵/۱) و معنی دار بودن آن در سطح P=0.61، تفاوت معناداری بین بیان ژن گیرنده آپولیپوپروتئین ۲ در گروه‌های مختلف پژوهش تایید نشد(نمودار شماره ۲).

جدول شماره ۳. بیان ژن گیرنده آپولیپوپروتئین ۲ در سه گروه کنترل، تداومی زیربیشینه و تناوبی در انتهای پروتکل

گروه ها	مقادیر بیان ژن(بیان نسبی)	مجذور میانگین	درجه آزادی	ارزش F	ارزش P
گروه تمرین تناوبی شدید	۴/۸±۲/۰۷	۵/۷	۲	۵/۱	۰/۶۱
گروه تداومی زیربیشینه	۳/۴±۳/۲				
گروه کنترل	۱/۰۸±۱/۴				



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

بحث و نتیجه گیری

پژوهش حاضر نشان داد بین هشت هفته اجرای تمرین تناوبی شدید و تداومی زیر بیشینه به نسبت گروه کنترل، تمرینات ورزشی منجر به افزایش بیان ژن گیرنده آپولیپوپروتئین ۱ در کبد رت های نژاد ویستار می شود. هم چنین نتایج نشان داد که اختلافی بین گروه تداومی زیر بیشینه و تناوبی شدید وجود ندارد. اما در دیگر متغیر درگیر در فرآیند انتقال معکوس کلسترول نتایج پژوهش حاضر نشان داد بین هشت هفته اجرای تمرین تناوبی شدید و تداومی زیر بیشینه به نسبت گروه کنترل در میزان بیان ژن گیرنده آپولیپوپروتئین ۲ تفاوت معناداری وجود ندارد. هر چند میانگین بیان ژن آپولیپوپروتئین ۲ در گروه تمرین تداومی زیر بیشینه به نسبت گروه تناوبی افزایش داشته است.

نتایج پژوهش حاضر نشان از افزایش گیرنده های آپولیپوپروتئینی مخصوصاً نوع I در کبد رت های نژاد ویستار به دنبال ۸ هفته تمرینات ورزشی بود. در واقع به دنبال ۸ هفته تمرینات تناوبی شدید و تداومی زیر بیشینه این افزایش مشهود و معنادار بود. هر چند تفاوت معناداری بین نوع تمرین ورزشی بر این متغیرها مشاهده نشد. اما در میزان تغییرات آپولیپوپروتئین نوع II تفاوتی مشاهده نشد. نتایج پژوهش حاضر در متغیر آپولیپوپروتئین نوع I با نتایج تحقیق صفرزاده و همکاران(۱۳۸۷) و قربانیان و همکاران(۱۳۹۲) موافق و همسوست و در رابطه با نتایج مربوط به متغیر آپولیپوپروتئین نوع II با نتایج ذکر شده مخالف و ناهمسوست. صفرزاده و همکاران(۱۳۸۷) به بررسی تاثیر ۱۲ هفته تمرین هوازی روی نوارگردان، بر بیان ژن ABCA1 و سطح APO A-I در بافت های (کبد، عضله دوقلو و قلب) موش ویستار پرداخته است. و نتایج این تحقیق نشـــان داد بیان ژن ABCA1 و سطـــح APO A-I در کبد و عضله دوقلوی گروه تجربی، به طور معنی داری بالاتر از گروه کنترل بود(۱۳). هم چنین قربانیان و همکاران(۱۳۹۲) در تحقیقی به بررسی تاثیر تمرین با طناب بر بیان ژن ABCA1، میزان پلاسمای APO A-I و HDL-C در پسران نوجوان پرداختند و گزارش کردند که تمرین با طناب باعث افزایش بیان ژن ABCA1 و افزایش میزان APO A-I در لنفوسیت پسران نوجوان می شود(۱۸). البته لازم به ذکر است در تحقیقات ذکر شده میزان بیان ژن این متغیرها به صورت تغییرات بیان ژن در سلول های لنفوسیتی ارزیابی شده است.

به نظر می رسد تاثیر تمرینات ورزشی بر نوع I بیشتر از نوع II باشد. شاید هم اهمیت نوع I به نسبت

نوع II در پاسخ دهی به تمرینات ورزشی و تاثیرگذاری بر انتقال معکوس کلسترول بیشتر باشد.

تمرینات ورزشی احتمالاً از طریق تغییر در سوخت و ساز چربی و متابولیسم فسفولیپیدها، بایوژنز میتوکندریایی و... بر انتقال معکوس کلسترول موثر هستند. انباشته شدن چربی در سلول کبدی هنگامی اتفاق می افتد که روند تولید چربی ها افزایش یافته و ترشح آن ها ازکبد مختل شود. این پدیده زمانی اتفاق می افتد که میزان چربی های ورودی به کبد افزایش یافته و یا به علت اختلال در میتوکندری ها روند تولید و ترشح فسفولیپیدها کاهش یابد. فعالیت ورزشی با جلوگیری از ورود اسیدهای چرب به داخل سلول های کبدی و افزایش سوخت و ساز چربی در داخل سلول های کبدی از تجمع چربی در کبد جلوگیری می کند. این عوامل و فرآیندها تحت اثر یک عامل مهم حساس کننده کبد به اثر انسولین، افزایش مقاومت به انسولین و یا حتی بیوژنز میتوکندریایی می تواند باشد. اعتقاد بر این است که فعالیت ورزشی در کبد باعث تعدیل سوخت و ساز گلوکز و تحریک کاتابولیسم اسیدهای چرب و از این طریق باعث پاک شدن اسیدهای چرب آزاد از پلاسما می شود و گلوکونئوژنز را کاهش می دهد. در عضلات نیز باعث افزایش اکسیداسیون اسیدهای چرب و جذب گلوکز به داخل عضلات مخطط می شود(۱۹).

در واقع، به نظر می رسد که فعالیت ورزشی(هر نوع و شدتی از فعالیت ورزشی) می تواند از طریق اثر مستقیمی که بر تولید گلوکز کبدی دارد و با افزایش اکسیداسیون چربی کبد و عضله که منجر به کاهش ذخایر چربی می شود، حساسیت به انسولین را افزایش می دهد و از طرف دیگر منجر به بهبود روند انتقال معکوس کلسترول در کبد شود(۲۰). در پژوهش حاضر نیز نشان داده شد که شدت تمرین(تناوبی شدید یا تداومی زیر بیشینه) تاثیر معناداری بر تغییرات عوامل درگیر در انتقال معوس کلسترول ندارد.

فعالیت ورزشی با فعال سازی مسیر پروتئین کیناز فعال کننده آدنوزین مونو فسفات اکسیداسیون اسید چرب در سلول های عضلانی را افزایش می دهد(۱۹). در واقع نتایج تحقیقات مختلف نشان داده است که تمرینات ورزشی به افزایش بیان ژن عوامل درگیر در بایوژنز میتوکندریایی منجر می شود. احتمالاً دلیل افزایش زیاد peroxisome proliferator- PGC-1α activated receptor γ coactivator-1α) و افزایش زیاد کلسیم درون سلولی و تخلیه شدید ATP در تمرینات ورزشی فعال سازی مسیرهای پیام رسانی بالا دستی PGC-1α (و بیوژنز میتوکندریایی در پاسخ به اجرای فعالیت ورزشی باشد که هنوز به خوبی شناخته نشده اند، اما احتمالاً به تغییرات شدید نسبت ATP:ADP/AMP درون عضلانی و هم چنین فعال شدن AMPK که به دنبال فعالیت بدنی می باشد، وابسته است(۲۲،۲۱). شاید این تغییرات متابولیسمی و فرآیندهای درگیر در متابولیسم این عوامل در فرآیند انتقال معکوس کلسترول و تغییر در بیان ژن عوامل درگیر در این فرآیند موثر باشند که نیاز به تحقیقات بیشتری در آینده دارد.

تمرینات ورزشی کیفیت زندگی، ظرفیت های عملکردی، التهاب و در کل باعث بهبود در عوامل مهم و درگیر در فرآیند انتقال معکوس کلسترول می شود، ولی ساز و کارهای شرکت کننده در این رویدادها هنوز به طور کامل ناشناخته اند. در سال های اخیر، علاقه به تحقیق در حوزه ژنتیک و پاسخ بدن به فعالیت ورزشی افزایش یافته است و شواهدی وجود دارد که نشان می دهند سازگاری های فیزیولوژیکی ناشی از فعالیت های ورزشی با بیان ژن های مختلفی همراه اند. یافته های حاصل از پژوهش حاضر نشان از افزایش آپولیپوپروتئین مخصوصاً نوع I در کبد رت های نژاد ویستار به دنبال ۸ هفته تمرینات ورزشی بود. در واقع به دنبال ۸ هفته تمرینات تناوبی شدید و تداومی زیر بیشینه این افزایش مشهود و معنادار بود. هر چند تفاوت معناداری بین نوع تمرین ورزشی بر این متغیرها مشاهده نشد. اما افزایش معناداری در میزان بیان ژن این متغیر به دنبال تمرین ورزشی کاملاً مشخص بود. اما در میزان تغییرات آپولیپوپروتئین نوع II تفاوتی مشاهده نشد.

تمرینات ورزشی از طریق افزایش بیان ژن عوامل درگیر در انتقال معکوس کلسترول در باف کبدی و هم چنین عامل اصلی خروج کلسترول از کبد و در نهایت

گیرنده HDL می تواند نقش مهـــــمی در کاهش بیماری های قلبی–عروقی مانند آترواسکلروزیس داشته باشد. در نهایت بررسی سازگاری تمام اجزای اصلی فرآیند انتقال معکوس کلسترول از سطح ژنومیک تا پروتئومیک نسبت به تمرین نیاز به تحقیقات گسترده ایی در آینده دارد تا نقش این عوامل بیشتر مشهود شود. به طور کلی بهبود متابولیسم کبد، انتقال معکوس کلسترول و تغییرات کلسترولی به دنبال تمرین ورزشی به دلیل نیاز به مصرف انرژی و هزینه انرژی برای فعالیت ورزشی می باشد. همین افزایش متغیرها در خون آزمودنی در هر جلسه فعالیت ورزشی است که در طولانی مدت و به دنبال تمرینات طولانی و شدید که بیش از چند ماه طول می کشد موجب بهبودی در شاخص های سلامتی و کاهش چربی های خون و فرآیند انتقال معکوس کلسترول می شود.

کد اخلاق: (IR.SSRI.REC.۱۳۹۶,۱۳۴)

سپاسگزاری

بدین وسیله از مدیریت محترم تمامی مسئولین و کارشناسان آزمایشگاه مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی دانشگاه ایران و سایر کسـانی کـه مـا را در انجـام مطلـــــوب ایـن پـژوهش یـاری دادند؛ سپاسگزاری می نماییم.

References

1.Gharipour M, Sadeghi M, Dianatkhah 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 Lipidol2016; 10:143-9. doi: 10.1093/eurheartj/ehr112.

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 . J Am Coll Cardiol2013;621826-33. doi: 10.1016/j.jacc.2013.07.051

3.Oram JF. HDL apolipoproteins and ABCA1 partners in the removal of excess cellular cholesterol. Arterioscler Thromb Vascular Biol2003;23:720-7. doi:10.1161/01.ATV.0000054662.44688.9A

4.Srivastava N. ATP binding cassette transporter A1-key roles in cellular lipid transport and atherosclerosis. Mole Cell Biochem 2002; 237:155-64. doi: 10.1097/MOL.0000000000000088.

5.Butcher LR, Thomas A, Backx K, Roberts A, Webb R, Morris K. Low intensity exercise exerts beneficial effects on plasma lipids via PPARgamma. Med Sci Sports Exe2008;40:1263-70. . doi: 10.1249/MSS.0b013e31816c091d.

6.Agarwala AP, Rodrigues A, Risman M, McCoy M, Trindade K, Qu L, et al. HDL phospholipid content and cholesterol efflux capacity are reduced in patients with very high HDL-C and coronary disease. Arterioscler Thrombosis Vas Biol2015;35:1515. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.305504

7.Rashidlamir A, Saadatnia A, Ebrahimi-Atri A, Delphan M. Effect of Eight Weeks of Wrestling and Circuit Fitness Training on APO Lipoprotein AI and Lymphocyte ABCA1 Gene Expression in Well-Trained Wrestlers. International J Wrestling Sci 2011;1:48-53. doi.org/10.1080/21615667.2011.10878931

8.Boden WE. High density lipoprotein cholesterol as an independent risk factor in cardiovascular disease: assessing the data from Framingham to the Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Intervention Trial. Am J Cardiol 2000;86:19-22. doi.org/10.1016/S0002-9149(00)01464-8

9.Rosenson RS, Brewer Jr HB, Davidson WS, Fayad ZA, Fuster V, Goldstein J, et al. Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport. Circulation 2012;125:1905. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.066589

10.Rothblat GH, Phillips MC. High density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport. Current Opin Lipidol 2010;21:229. doi: 10.1097/mol.0b013e328338472d

11.Khabazian BM, Niaki AG, Rahbarizadeh F, Kakhak AH, Noghabi MJ. The effect of 6 weeks of endurance training on the expression of hepatic ABCA1 in

male wistar Rats. World J Sport Sci 2008;1:1-7.
12.Pinto PR, Rocco DD, Okuda LS, Machadolima A, Castilho G, Silva KS, et al. Aerobic exercise training enhances the in vivo cholesterol trafficking from macrophages to the liver independently of changes in the expression of genes involved in lipid flux in macrophages and aorta. Lip Health Dis2015;14:109. doi: 10.1186/s12944-015-0093-3
13.Safarzad A. Effect of 12 weeks aerobic training on treadmill on ABCA1 gene expression and APO A-I and HDL levels in tissues liver twin muscle and heart of wistar Mouse. Master Thesis Tarbiat Modares Uni Tehran. 2008
14.Tofighi A, Rahmani F, Qarakhanlou BJ, Babaei S. The effect of regular aerobic exercise on reverse cholesterol transport A1 and apo lipoprotein aI gene expression in inactive women. Iranian Red Crescent Med J2015;17:1-5. doi: 10.5812/ircmj.17(4)2015.26321
15.Høydal MA, Wisloff U, Kemi OJ, Ellingsen Q. Running speed and maximal oxygen uptake in Rats and Mice practical implications for exercise training. European J Cardiovascular Preve Rehabil 2007; 14:753-60.doi: 10.1097/HJR.0b013e3281eacef1
16.Wisloff U, Stoylen A, Loennechen JP, Bruvold M, Rognmo O, Haram PM, et al. Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate continuous training in heart failure patients: a randomized study. Circulation2007;115:3086-94. doi: 10.1161/circulationaha.106.675041
17.Ghorbanian B, Ravassi A, Kordi MR, Hedayati M. [The effects of rope training on lymphocyte ABCA1 expression, plasma ApoA-I and HDL-c in boy adolescents]. Int J Endocrinol Metab2013;11:76. (Persian) doi: 10.5812/ijem.8178
18.Canto C, Auwerx J. PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK an energy sensing network that controls energy expenditure. Current Opin Lipidol 2009;20:98-100. doi:10.1097/MOL.0b013e328328d0a4
19.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-1α in human skeletal muscle. J Appl Physiol 2009; 106:929-34. doi: 10.1152/japplphysiol.90880.2008
20.Gibala MJ, Little JP, 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 15;575:901-11. doi: 10.1113/jphysiol.2006.112094
21.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. New England J Med 2004 ;350:1505-15. doi:10.1056/NEJMoa031766
22.Ghanbariniaki A, Khabazian BM, Hossainikakhak SA, Rahbarizadeh F, Hedayati M. Treadmill exercise enhances ABCA1 expression in Rat liver. Biochem Biophys Res Commun2007 ;361:841-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.07.100

The Effect of Training Type on Hepatic Gene expressions of Apolipoprotein A-I, and Apolipoprotein A-II among Male Wistar Rats

Hasanvand B[1], Karami K[2], Yaghoub M[3]*

(Received: December 4, 2017 Accepted: August 26, 2018)

Abstract

Introdaction: Lipid metabolism disorders, especially raised levels of cholesterol and triglycerides increases the risk of atherosclerosis. This study aimed to investigate the effect of training type including submaximal continuous and high-intensity interval training on hepatic gene expression of Apolipoprotein A-I, and Apolipoprotein A-II in male Wistar rats.

Materials & Methods: This experimental study conducted on 24 male Wistar rats with 8 weeks of age and weight range of 200-250 g. They were randomly assigned into three groups of control (n=8), high-intensity interval training (n=8), and continuous submaximal training (n=8). High-intensity interval training protocol included 30-min interval running 3 days a week for 8 weeks (each interval took 4 min with 85-90% of VO2max and 2-min active recovery with 50-60% of VO2max). In addition, submaximal continuous training group (30-60 min) was subjected to 50-55% intensity activity with maximum oxygen consumption. Finally, gene expressions of Apolipoprotein A-I and Apolipoprotein A-II were measured in this study.
Ethics code: IR.SSRI.REC. 1396, 134.

Findings: The findings of this study showed an increase in the gene expressions of Apolipoprotein A-I in the high-intensity interval (P=0.034) and continuous submaximal training groups (P=0.047), compared to the control group. Moreover, the results of the Bonferroni post-hoc test showed that there was no difference between high-intensity interval and continuous submaximal training groups (P=0.9). In addition, the results of this study showed that there was no significant difference among the three groups in terms of the gene expression of Apolipoprotein A-II.

Discussion & Conclusions: High-intensity interval and continuous submaximal training can play important roles in reducing cardiovascular disease risks, such as atherosclerosis. This is done by increasing hepatic gene expression of Apolipoprotein A-I and the main factor taking cholesterol from the liver and ultimately the high-density lipoprotein receptor.

Keywords: Apolipoprotein A-I, Apolipoprotein A-II, Continuous submaximal training, High-intensity interval training

1. Dept of Physicol Education, Faculty of Lecturer, Islamic Azad University, Khorramabad Branch, Khorramabad, Iran
2. Dept of Nursing, Faculty of Nursing and Midwifery, Lorestan University of Medical Sciences , Khorramabad, Iran
3. Dept of Exercise Physiology, Faculty of Physicol Education, University of Buali Sina, Hamedan, Iran
** Corresponding author Email: Hasanvand121@gmail.com*