



## تأثیر ۸ هفته تمرینات تدوامی و تناوبی بر بیان ژنی HNFa و STAT3 در بافت کبد رت‌های نر

سعید نقیبی: استادیار، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

مسلم امیرخانی: گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

علی برزگری: استادیار، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران \*نویسنده مسئول ali\_barzegari@pnu.ac.ir

ابراهیم نوریان: گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

زینب سلطنتی نیری: گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

محمد رضا علیپژاوه میراشrafی: کارشناسی ارشد فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اردبیل، اردبیل، ایران

### چکیده

#### کلیدواژه‌ها

شیوه تمرینی MIT  
. HIT  
. HIIT  
HNFa/STAT3 بیان ژنی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۱۴  
تاریخ چاپ: ۱۴۰۰/۰۶/۱۳

**زمینه و هدف:** ورزشکاران اغلب به یک برنامه‌ی تمرینی برای رسیدن به حداکثر آمادگی در یک دوره‌ی زمانی کوتاه به ویژه پس از دوره‌های کم‌تمرینی و بی‌تمرینی نیاز دارند. این مطالعه به منظور بررسی تأثیر سه شیوه تمرینی با شدت‌های مختلف بر بیان ژنی HNFa و STAT3 در بافت کبد رت‌های نر نزاد ویستار صورت گرفت.

**روش کار:** در این مطالعه تعداد ۳۳ سر رت نر نزاد ویستار با میانگین سنی ۶ هفته و وزن  $۱۷۸ \pm 11$  گرم انتخاب شد. موش‌ها به صورت تصادفی به چهار گروه کنترل، تمرین با شدت متوسط، تمرین پرشودت، تمرین تناوبی پرشودت تقسیم شدند. موش‌ها به مدت ۸ هفته پس از ۲ دقیقه گرم کردن (با سرعت ۵ متر بر دقیقه) به فعالیت پرداختند. تعداد جلسات در هر هفته، ۵ جلسه بود.

**یافته‌ها:** نتایج آزمون تعقیبی توکی نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری در بیان ژن STAT3 در بافت کبد رت‌های نر ویستار میان گروه‌های MIT و HIT نسبت به گروه HIIT تفاوت معناداری وجود ندارد، در حالی که اختلاف معنی‌داری میان گروه‌های HIIT و کنترل وجود دارد. همچنین نتایج نشان داد که میان گروه‌های MIT، HIT و کنترل نسبت به گروه HIIT تفاوت معنی‌داری در بیان ژن HNFa وجود دارد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد که تمرین تناوبی پرشودت نسبت به دیگر شدت‌های تمرینی منجر به کاهش بیشتری در بیان ژن STAT3 و افزایش بیشتر در بیان HNFa می‌گردد، لذا بکارگیری این شیوه تمرینی در توسعه عملکرد بافت کبد توصیه می‌شود.

**تعارض منافع:** گزارش نشده است.

**منبع حمایت‌کننده:** حامی مالی ندارد.

شیوه استناد به این مقاله:

Naghibi S, Amirkhani M, Barzegari A, Amirkhani E, Satvati Niri Z, Alizadeh Mirashrafi MR. The effect of 8 weeks of continuous and periodic training on HNFa and STAT3 gene expression in liver tissue of male rats. Razi J Med Sci. 2021;28(6):39-49.

\* منتشر این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.



Original Article

## The effect of 8 weeks of continuous and periodic training on HNF<sub>a</sub> and STAT3 gene expression in liver tissue of male rats

**Saeed Naghibi:** Department of Physical Education, Payame Noor University, Tehran, Iran

**Moslem Amirkhani:** Department of Physical Education, Payame Noor University, Tehran, Iran

**Ali Barzegari:** Department of Physical Education, Payame Noor University, Tehran, Iran (\* Corresponding author)  
ali\_barzegari@pnu.ac.ir

**Ebrahim Amirkhani:** Department of Physical Education, Payame Noor University, Tehran, Iran

**Zeinab Satvati Niri:** Department of Physical Education, Payame Noor University, Tehran, Iran

**Mohammad Reza Alizadeh Mirashrafi:** Master Degree in Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran

### Abstract

**Background & Aims:** STAT factors are a family of cytoplasmic proteins that are activated in response to cytokines, various growth factors as well as hormones. STAT proteins are activated by phosphorylation and then cleaved from the complex of homodimers or heterodimer receptors and transported from the cytoplasm to the nucleus, where they act by promoting specific genes that ultimately regulate gene expression. HNF is an important transcription factor that plays a very important role in the morphological and functional differentiation of the liver and also acts as a prominent factor in the differentiation of mature hepatoblasts. Studies show a significant role for HNF in liver development. It seems that intense intermittent exercise can reduce the rate of tumor progression by reducing the expression of some of the prognostic factors of angiogenesis, and an effective non-pharmacological method can be used to reduce tumor growth. According to the results of studies, limited studies have been performed on the effect of exercise with different intensities on the expression of HNF and STAT3. There is also no study that directly measures the effect of exercise on the expression of HNF and STAT3 in liver tissue. Therefore, the present study was conducted to answer this question: Is there a significant difference between the effect of three training methods with different intensities on HNF and STAT3 gene expression in the liver tissue of male Wistar rats?

**Methods:** The present study was approved by the ethics committee of Payame Noor University with the code IR.PNU.REC.1398.059. In terms of purpose, it is fundamental-applied, which was implemented experimentally. In the present study, 32 8-week-old male Wistar rats with an average weight of  $237 \pm 33$  g were purchased from the Pasteur Institute. After being transferred to the animal laboratory environment, these animals are housed in transparent polycarbonate cages in an environment with a temperature of  $22 \pm 1.4$  °C, the humidity of 45 to 55%, four heads in each cage with free access to water and closed. Foods were maintained according to a 12-hour sleep-wake cycle. Animals were randomly divided into 5 groups: control group (Co) (8 heads), moderate intensity training (MIT) (8 heads), high-intensity training (HIT) (8 heads), and high-intensity interval training (HIIT) (8 heads) were divided.

The MIT protocol was performed in such a way that in the first week, 5 minutes of

### Keywords

MIT training method,  
HIT,  
HIIT,  
HNF<sub>a</sub> / STAT3 gene  
expression

Received: 04/06/2021

Published: 04/09/2021

warm-up, 5 minutes of cooling, and 20 minutes of the main body of the exercise, including running at 65% VO<sub>2</sub>max at a speed of 20 m/min, was added to the training time every week. In the sixth week, the training time reached 37 minutes and remained constant until the end of the eighth. Also, the training speed was unchanged from the first week to the eighth week and was equal to 20 meters per minute.

The HIT protocol in the first week included: 5 minutes of warm-up, 5 minutes of cooling, and 20 minutes of running training with 65% VO<sub>2</sub>max at a speed of 20 m/min and an increasing slope of the treadmill. The training time was increased every week, so that in the sixth week the training time reached 30 minutes and remained constant until the end of the eighth. On the other hand, the slope of the strip was 2% in the first and second weeks and 2% was added to the slope every 2 weeks to reach 8% in the seventh and eighth weeks. Also, the training speed from the first week to the eighth week was 20 meters per minute and was kept constant.

The HIIT protocol also included 10 minutes of warm-up before the workout, in the first to fourth weeks including 3 intense intermittent runs with an intensity of 90 to 100% VO<sub>2</sub>max and a speed of 30 meters per minute in 4 minutes and 3 low-intensity intermittent runs. With 50 to 60% VO<sub>2</sub>max and at a speed of 20 meters per minute in 3 minutes. From the fifth to the eighth week, it also includes 4 intense intermittent runs with an intensity of 90 to 100% VO<sub>2</sub>max at a speed of 30 meters per minute in 4 minutes and 3 low-intensity intermittent runs with 50 to 60% VO<sub>2</sub>max at a speed of 20 meters per minute. It took 3 minutes. The main body time of the exercise was 28 minutes per repetition. Mice in the control group did not participate in any exercise program but were placed on a stationary treadmill for 10 to 15 minutes per session to adapt to the environment to create the same conditions. After *in vitro* analysis of the samples, descriptive statistics including standard mean and standard deviation and inferential statistics were used to quantitatively describe the data. First, the Shapiro-vilk test was used to determine the normality of data distribution, and the Leven test was used to determine the homogeneity of variance. Due to the normal distribution of data, parametric tests including one-way analysis of variance and Tukey's post hoc test were used at a significance level of  $p \geq 0.05$ .

**Results:** The results of the Tukey post hoc test showed that there was no significant difference in STAT3 gene expression in the liver tissue of male Wistar rats between MIT and HIT groups compared to the HIIT group. There is a gap between the HIIT and control groups. The results also showed that there was a significant difference in the expression of the HNF $\alpha$  gene between MIT, HIT, and control groups compared to the HIIT group.

**Conclusion:** The results showed that intense intermittent training compared to other training intensities leads to a greater decrease in STAT3 gene expression and a further increase in HNF $\alpha$  expression, so the use of this training method is recommended in the development of liver tissue function.

**Conflicts of interest:** None

**Funding:** None

#### Cite this article as:

Naghibi S, Amirkhani M, Barzegari A, Amirkhani E, Satvati Niri Z, Alizadeh Mirashrafi MR. The effect of 8 weeks of continuous and periodic training on HNF $\alpha$  and STAT3 gene expression in liver tissue of male rats. Razi J Med Sci. 2021;28(6):39-49.

\*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

## مقدمه

شده آن، نشان‌دهنده این حقیقت است که آن‌ها از یک ژن مشتق شده‌اند (۹). فاکتورهای STAT، از خانواده پروتئین‌های سیتوپلاسمی هستند که در پاسخ به سیتوکین‌ها، فاکتورهای مختلف رشد و نیز هورمون‌ها، فعال می‌شوند. پروتئین‌های STAT از طریق فسفریلاسیون فعل شده و سپس در ادامه از کمپلکس گیرنده‌های همودایمر یا هترودایمر جدا شده و از سیتوپلاسم به هسته، جایی که با اثر بر پرومотор ژن‌های خاص که نهایتاً در تنظیم بیان ژن نقش دارند، جایه جا می‌شوند (۱۰).

HNF یک عامل مهم رونویسی است که عملکرد بسیار مهمی در تمایز ریخت‌شناسی و عملکردی کبد ایفا می‌کند و همچنین به عنوان عامل برجسته در تمایز هپاتوبلاست‌ها به حالت بالغ عمل می‌کند (۱۰). همچنین اخیراً مشخص شد که HNF یک تنظیم‌کننده بیان miR-122 بوده و افزایش بیان این عامل طی تکامل کبدی جنین موش هم جهت با افزایش بیان miR-122 است (۱۱). این مطالعات نشان دهنده نقش برجسته HNF در تکامل کبدی است. نتایج مطالعات نشان داده است که اختلال در عملکرد انسولین یا ترشح ناکافی انسولین به دیابت نوع دو منجر می‌شود. یکی از محل‌های اولیه و مهم تولید گلوکز، کبد است (۱۲). ناتوانی انسولین در مهار تولید گلوکز درون‌زا در دیابت به افزایش سطح گلوکز خون منجر می‌شود. افزایش تولید گلوکز کبد مسئول اولیه افزایش گلوکز ناشتاپی و بخش مهمی از افزایش گلوکز بعد از خوردن وعده غذایی در افراد دیابتی است (۱۳). انسولین به وسیله کنترل بیان دو آنزیم گلوکز-۳-فسفاتاز و فسفوanol پیروات کربوکسی کیناز در گیر در مسیر گلوکونئوزن، تولید گلوکز را در کبد مهار می‌کند. ژن این آنزیم‌ها به وسیله برخی از ژن‌ها شامل پروتئین فاکس ۱ (Foxo1) ژن عامل هسته‌ای کبدی (HNF-4 $\alpha$ ) ژن گیرنده فعل شده تکثیری پروکسیزومی (PGC-1 $\alpha$ ) سیرتئین و ۶ پروتئین مبدل سیگنال و فعل‌کننده رونویسی (STAT3) تنظیم می‌شوند (۱۴). همچنین نتایج مطالعه‌ای نشان داد یکی از مکانیسم‌هایی که اثر انسولین بر گلوکونئوزن را مهار می‌کند، به توانایی کاهش بیان HNF-4a و Foxo1 در کبد بستگی دارد. بیان شده است که HNF-4a متابولیسم گلوکز در کبد

ورزشکاران اغلب به یک برنامه‌ی تمرینی برای رسیدن به حداکثر آمادگی در یک دوره‌ی زمانی کوتاه به ویژه پس از دوره‌های کم‌تمرینی و بی‌تمرینی نیاز دارند. در چنین شرایطی، تمرین تنابوی (Moderate) HIT (intensity High Intensity) (High intensity training) و HIIT (Training High-intensity interval) (HIIT) مورد توجه قرار گرفته است (۱). توانایی برنامه‌های HIT و HIIT در بهبود سریع ظرفیت ورزشی و متابولیسم انرژی عضله‌ی اسکلتی بوسیله‌ی محققان مختلف بررسی شده است (۲). تمرینات تنابوی شدید به عنوان یک رویکرد مؤثر در بهبود آمادگی در مدت زمان کوتاه به کار گرفته می‌شود. در کنار تمرینات ورزشی باید به نقش عوامل ژنی مختلف در بهبود اجرای فعالیت‌های ورزشی اشاره نمود (۳). ژن‌هایی که بر اندام مختلف ممکن است تأثیرات مثبت و یا منفی داشته باشند. یکی از ابزارهای مورد استفاده در مطالعه‌ی عوامل ژنتیکی مؤثر بر صفات اقتصادی، شناسایی ژن‌های بزرگ اثر مؤثر بر آنها است (۴). از جمله ژن‌های بزرگ اثر، مجموعه ژن‌های گروه STAT هستند که در واقع، فاکتور رونویسی داخل‌سلولی بوده و کارشان میانجی گری و حضور در اینمی، رشد، تمایز و آپوپتوز سلول‌هاست (۵). این پروتئین‌ها توسط جانوس کیناز Janus kinase JAK تنظیمی در این مسیر پیغام‌رسانی، منجر به افزایش احتمال بروز تومور می‌شود و آنژیوژن (رگ‌زایی) را تشید می‌کند که این موضوع نیز به توبه خود منجر به افزایش بقای تومور و سرکوب دستگاه اینمی بدن می‌شود (۶). مولکول‌های مبدل سیگنال و فعل‌کننده نسخه‌برداری (STAT) در پی اتصال هورمون‌های رشد، انسولین و هورمون‌های گلوکوکورتیکوئیدی به گیرنده خود فعل می‌شوند و اثرات خود را اعمال می‌کنند (۷). STAT پروتئینی از فاکتورهای رونویسی است که سیگنال‌های بیولوژیک را از فضای خارج به داخل هسته عبور می‌دهد و کلاس جدیدی از فاکتورهای رونویسی هستند که نقش‌های بیولوژیک مختلفی در بدن دارند (۸). در پستانداران، ۷ خانواده از کلاس STAT‌ها شناسایی شده که از ۸۵۰-۷۵۰ اسید آمینه تشکیل شده‌اند و موقعیت کروموزومی و پروتئین‌های شناسایی

این حیوانات پس از انتقال به محیط آزمایشگاه جانوری، به صورت گروههای ۴ سر موش در قفسهای پلی کربنات شفاف در محیطی با دمای  $1/4 \pm 22$  درجه سانتی گراد، رطوبت ۵۵ تا ۵۵ درصد و چرخه تاریکی- روشنایی ۱۲:۱۲ ساعت نگهداری شدند. حیوانات به طور تصادفی در چهار گروه شامل: گروه کنترل (Co) (۸ سر)، تمرین تداومی با شدت متوسط (MIT) (۸ سر)، تمرین تداومی شدید (HIT) (۸ سر) و تمرین تناوبی شدید (HIIT) (۸ سر) تقسیم شدند. نگهداری حیوانات مطابق با راهنمای استیتوی بین‌المللی سلامت و پروتکل‌های این مطالعه با رعایت اصول اعلامیه هلسینکی (Helsinki) و ضوابط اخلاق پزشکی انجام شد. همچنین این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه پیام نور با کد IR.PNU.REC.1398.059 تأیید گردید. طی دوره تحقیق، غذای ساخت شرکت بهپرور به صورت پلت و با توجه به وزن کشی هفتگی به میزان ۱۰ گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن در اختیار حیوانات قرار داده شد. آب موردنیاز حیوانات نیز به صورت آزاد در دسترس قرار داده شد.

**پروتکل‌های تمرین:** به منظور آشناسازی با شرایط آزمایشگاه و نوار گردان، حیوانات به مدت ۲ هفته، ۵ روز در هر هفته و در هر روز به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه با سرعت ۵ تا ۱۵ متر بر دقیقه بر روی نوار گردان دویدند. حداقل اکسیژن مصروفی ( $\text{VO}_{\text{2max}}$ ) حیوانات با توجه به عدم دسترسی به ابزار مستقیم، با آزمون فزاینده بر روی نوار گردان و به طور غیرمستقیم ارزیابی شد (۱۸). جزئیات نحوه اجرای پروتکل‌های تمرینی در جدول ۱ آورده شده است.

پروتکل MIT بدین صورت اجرا شد که در هفته اول ۵ دقیقه گرم کردن، ۵ دقیقه سرد کردن و ۲۰ دقیقه بدنه اصلی تمرین شامل دویدن با شدت ۶۵ درصد  $\text{VO}_{\text{2max}}$  با سرعت ۲۰ متر بر دقیقه انجام شد و به صورت هفتگی به زمان تمرین افزوده می‌شد، به طوری که در هفته ششم زمان تمرین به ۳۷ دقیقه رسید و تا پایان هشتم نیز ثابت ماند. همچنین سرعت تمرین از هفته اول تا هفته هشتم بدون تغییر بوده و معادل ۲۰ متر بر دقیقه بود.

پروتکل HIT در هفته اول، شامل: ۵ دقیقه گرم کردن، ۵ دقیقه سرد کردن و ۲۰ دقیقه تمرین دویدن

را با کنترل بیان ژن‌های گلوکز ۶-فسفات و فسفوanol پیروات کربوکسی کیناز تعديل می‌کند (۱۵). اغلب فعالیت ورزشی به دلیل تأثیرات مفید بر روی کنترل گلوکز برای درمان دیابت نوع دو توصیه می‌شود. تمرینات ورزشی عملکرد انسولین را بهبود می‌بخشند و اثر چشمگیری بر مسیرهای سیگنالینگ انسولین دارند. همچنین فعالیت ورزشی هوموستاز گلوکز و حساسیت به انسولین را بهبود می‌بخشد. بعد از فعالیت ورزشی حاد حساسیت به انسولین در بافت‌های مانند عضله اسکلتی، چربی کبد و هیپوتالاموس افزایش می‌یابد (۱۶). با وجود این، با اینکه مطالعات ژنتیکی به ارتباط متقابل مسیرهای سیگنالینگ انسولین با بیان HNF و STAT3 اشاره کرده‌اند، اما تاکنون مطالعه‌ای که مستقیماً اثر ورزش و تمرینات ورزشی را روی عملکرد آن‌ها در بافت کبد بررسی کند، به ندرت انجام گرفته است. تنها یک مطالعه به اثر فعالیت ورزشی حاد بر کاهش تولید گلوکز از کید از طریق مسیر HNF-4a در موش‌های مقاوم به انسولین پرداخته است که نتایج آن حاکی از تنظیم کاهشی HNF-4a بود و در نتیجه فعالیت ورزشی حاد هوموستاز گلوکز را بهبود بخشید (۱۷). به نظر می‌رسد تمرینات تناوبی شدید از طریق کاهش بیان برخی از عوامل پیش‌برنده آنتیوژن می‌تواند سرعت پیشرفت تومورها را کاهش دهد و یک روش غیردارویی مؤثری در جهت کاهش رشد تومورها مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به نتایج مطالعات، مطالعات محدودی در خصوص تأثیر تمرین ورزشی با شدت‌های مختلف بر بیان HNF و STAT3 انجام گرفته است. همچنین مطالعه‌ای که مستقیماً اثر تمرینات ورزشی را روی بیان HNF و STAT3 در بافت کبد را اندازه‌گیری کند، وجود ندارد. از این رو مطالعه حاضر با هدف پاسخ به این سؤال انجام گردید: آیا بین تأثیر سه شیوه تمرینی با شدت‌های مختلف بر بیان ژنی HNF و STAT3 در بافت کبد رت‌های نر نژاد ویستار تفاوت معناداری وجود دارد؟

## روش کار

تحقیق حاضر از نوع تجربی بود، بدین منظور ۳۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار ۸ هفت‌های با میانگین وزنی  $۲۳۷ \pm ۳۳$  گرم از استیتو پاستور خریداری شدند.

جدول ۱- جزئیات پروتکل برنامه تمرین ۸ هفته‌ای برای گروه‌های مختلف تحقیق

گروه MIT			گروه HIT			گروه HIIT			هفتہ		
زمان (دقیقه)	سرعت (متر/دقیقه)	شیب	زمان (دقیقه)	سرعت (متر/دقیقه)	شیب	زمان (دقیقه)	سرعت در تناوب دوم (متر/دقیقه)	شیب	تکرار اول (متر/دقیقه)	تکرار ۳	۱
۲۰	۲۰	%۲	۲۰	۲۰		۲۰	۳۰		۳۰	۳	۱
۲۲	۲۰	%۲	۲۲	۲۰		۲۰	۳۰		۳۰	۳	۲
۲۵	۲۰	%۴	۲۵	۲۰		۲۰	۳۰		۳۰	۳	۳
۲۵	۲۰	%۴	۲۵	۲۰		۲۰	۳۰		۳۰	۳	۴
۳۰	۲۰	%۶	۲۵	۲۰		۲۰	۳۰		۳۰	۴	۵
۳۷	۲۰	%۶	۳۰	۲۰		۲۰	۳۰		۳۰	۴	۶
۳۷	۲۰	%۸	۳۰	۲۰		۲۰	۳۰		۳۰	۴	۷
۳۷	۲۰	%۸	۳۰	۲۰		۲۰	۳۰		۳۰	۴	۸

تمرین، نمونه‌برداری از حیوانات ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی انجام شد. بدین منظور ابتدا حیوانات با استفاده از تزریق صفاقی کتابمین (۳۰-۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۳-۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بی‌هوش شده و بعد از عمل جراحی قفسه سینه، بافت چربی زیرپوستی جدا شده و در میکروتیوب‌های مخصوص در مایع نیتروژن قرار داده شد. سپس برای نگهداری به فریزر دمای ۷۰-درجه سانتی‌گراد منتقل شد. کیت سنتز cDNA توسط K1622 Thermo Scientific که با شماره کاتالوگ Real-Time PCR تولید شده است، در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. برای استخراج RNA و cDNA، حدود ۵۰ میلی‌گرم میلی‌گرم از بافت کبد رت‌ها به صورت جداگانه جهت استخراج RNA total به نسبت ۱ به ۱۲ در QIAzol Reagent Lysis تعیین بیان ژن‌های pparγ1 به روش real-time PCR و اکنش (PCR) ای‌بی‌ای (ABA) ساخت کشور آمریکا انجام شد. درون هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای، مخلوطی به حجم ۲۵ میکرولیتر متشكل از ۱۲/۵ میکرولیتر مخلوط اصلی سایبرگرین مسترمیکس (SYBR green master mix)، ۲ میکرولیتر از پرایمرهای اختصاصی هر ژن، ۴ میکرولیتر از DNA زنومی و ۶/۵ میکرولیتر آب مقطّر تهییه شد. برنامه زمانی و دمایی واکنش انجام شده در دستگاه real-time PCR مدل ABI در سه مرحله عبارت بود از: مرحله اول در یک چرخه به منظور فعلی سازی آنزیم پلیمراز و دناتوره اولیه DNA الگو با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه؛ مرحله دوم به

با ۶۵ درصد  $\text{VO}_{2\text{max}}$  با سرعت ۲۰ متر بر دقیقه و با شیب فزاً ینده نوارگردان بود. به صورت هفتگی به زمان تمرین افزوده می‌شد، به طوری که در هفته ششم زمان تمرین به ۳۰ دقیقه رسید و تا پایان هشتم نیز ثابت ماند. از سوی دیگر، شیب نوارگردان در هفته اول و دوم ۲ درصد بود و هر ۲ هفته ۲ درصد به شیب افزوده شد تا در هفته هفتم و هشتم به ۸ درصد برسد. همچنین سرعت تمرین از هفته اول تا هفته هشتم نیز ۲۰ متر بر دقیقه بود و ثابت نگه داشته شد.

پروتکل HIIT نیز شامل ۱۰ دقیقه گرم کردن قبل از انجام تمرین بود، در هفته اول تا چهارم شامل ۳ وله دویدن تناوبی شدید با شدت ۹۰ تا ۱۰۰ درصد  $\text{VO}_{2\text{max}}$  و با سرعت ۳۰ متر بر دقیقه در زمان ۴ دقیقه و ۳ وله دویدن تناوبی کم شدت با ۵۰ تا ۶۰ درصد  $\text{VO}_{2\text{max}}$  و با سرعت ۲۰ متر بر دقیقه در زمان ۳ دقیقه بود. از هفته پنجم تا هشتم نیز شامل ۴ وله دویدن تناوبی شدید با شدت ۹۰ تا ۱۰۰ درصد  $\text{VO}_{2\text{max}}$  و با سرعت ۳۰ متر بر دقیقه در زمان ۴ دقیقه و ۳ وله دویدن تناوبی کم شدت با ۵۰ تا ۶۰ درصد  $\text{VO}_{2\text{max}}$  و با سرعت ۲۰ متر بر دقیقه در زمان ۳ دقیقه بود.

زمان بدنی اصلی تمرین در هر تکرار به مدت ۲۸ دقیقه بود. موش‌های گروه کنترل در هیچ‌گونه برنامه فعالیت ورزشی شرکت نکردند ولی برای ایجاد شرایط کاملاً یکسان ۵ بار در هفته به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در هر جلسه برای سازگاری با محیط بر روی نوارگردان بی‌حرکت قرار داده شدند.

**نحوه نمونه‌برداری بافتی:** جهت حذف اثر حاد

جدول ۲- توالی پرایمروها و اندازه محصولات ژن هدف

Genes	Primer sequence
HNFa	For: 5'- ATGCTGAGGAAGAAGATGTGGA -3' Rev: 5'- ATGAAACTGCGTGGATGGGA -3'
STAT3	For: 5'- AGAAGAGGAAGGCAAGGATAGG -3' Rev: 5'- GAAGAGGGAGAAGATGAAGAGGA -3'
GAPDH	For: 5'- GACATGCCGCCTGGAGAAC -3" Rev: 5'- AGCCCAGGATGCCCTTAGT -3"

توزیع داده ها از آزمون شاپیروویلک و برای تعیین تجانس واریانس از آزمون لون استفاده شد. با توجه به طبیعی بودن نحوه توزیع داده ها، از آزمون های پارامتریک شامل آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی در سطح معنی داری  $\leq 0.05$  استفاده شد. انجام کلیه امور آماری با نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ و EXCEL انجام شد.

### یافته ها

جدول ۳ میانگین و انحراف معیار وزن موش های صحرای گروه های مختلف تحقیق را نشان می دهد. نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد که تفاوت معناداری در وزن موش های گروه های مختلف تحقیق وجود ندارد ( $p=0.09$ ).

نتایج بدست آمده از اجرای آزمون تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد که اختلاف معنی داری بین ۴ گروه پژوهش در مقادیر بیان ژن STAT3 وجود دارد ( $P=0.001$ ). مقایسه بین گروهی با آزمون توکی نشان داد که تفاوت معنی داری در بیان ژن STAT3 در بافت HIT بکسرت های نر ویستار میان گروه های MIT و HIT نسبت به گروه HIIT وجود ندارد (به ترتیب:  $P=0.46$  و  $P=0.313$ ). همچنین اختلاف معنی داری میان گروه های HIIT و کنترل مشاهده گردید ( $P\leq 0.001$ )، به طوری که در گروه HIIT به میزان ۰.۰۰۶ واحد نسبت به گروه کنترل کاهش داشت. با این حال میان گروه HIT و MIT تفاوت معنی داری مشاهده نشد ( $P=0.147$ ). از سویی دیگر اختلاف معنی داری میان گروه های HIT و MIT نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ( $P\leq 0.001$ )، به طوری که در گروه HIT و MIT به میزان ۰.۰۰۴ واحد نسبت به گروه کنترل کاهش داشت (شکل ۱).

نتایج بدست آمده از اجرای آزمون تحلیل واریانس

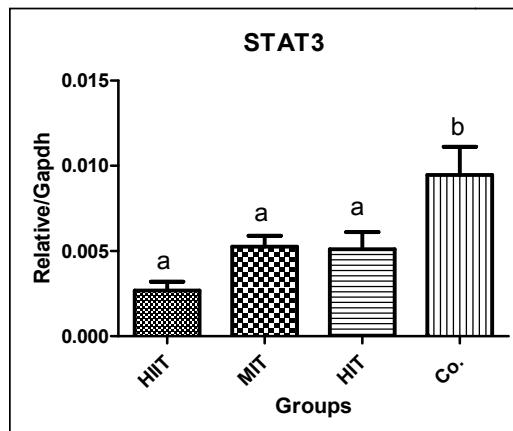
صورت متناوب در طول ۴۰ چرخه با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه انجام شد. در مرحله سوم به منظور رسم منحنی تفکیک، برنامه دمایی مورد استفاده شامل دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه بود. در این مرحله، کاهش دما از ۹۵ درجه سانتی گراد به ۶۰ درجه سانتی گراد با سرعت ۰/۰۳ درجه سانتی گراد بر ثانیه انجام شد و حدوداً ۲۰ دقیقه طول کشید. پس از اتمام مرحله سوم، منحنی های تکثیر و تفکیک با استفاده از نرم افزار SDS ABI  $\Delta Ct$  ژن هدف به ژن رفرنس به صورت شد. تفاوت  $Ct$  ژن هدف به ژن رفرنس به صورت  $\Delta\Delta Ct$  برای هر نمونه محاسبه شد. سپس برای هر مورد،  $\Delta\Delta Ct$  به دست آمد. علاوه بر این، در این آزمایش تجزیه و تحلیل منحنی ذوب جهت اطمینان از ویژگی محصول PCR انجام شد. در ابتدا توالی mRNA مربوط به ژن IGFBP-1 از سایت NCBI استخراج شد.

پرایمروها با استفاده از نرم افزار AllelID و توسط شرکت CinnaGen ساخته شده و پس از آن هر پرایمرو توسط نرم افزار BLAST مورد ارزیابی قرار گرفت تا از قرارگیری جفتی پرایمروها اطمینان حاصل شود. در این تحقیق، ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. برای هر دور PCR، ۴۰ چرخه منظور گردید، به طوری که دمای هر چرخه برای ۱۵ ثانیه تا ۹۴ درجه سانتی گراد و برای ۳۰ ثانیه تا ۶۰ درجه سانتی گراد تنظیم شد. پرایمروها مربوط به رت ها در جدول ۲ نشان داده شده است.

**روش های آماری:** بعد از تحلیل آزمایشگاهی نمونه ها، برای توصیف کمی داده ها از شاخص های آمار توصیفی شامل میانگین و انحراف استاندارد و آمار استنباطی استفاده شد. ابتدا جهت تعیین طبیعی بودن

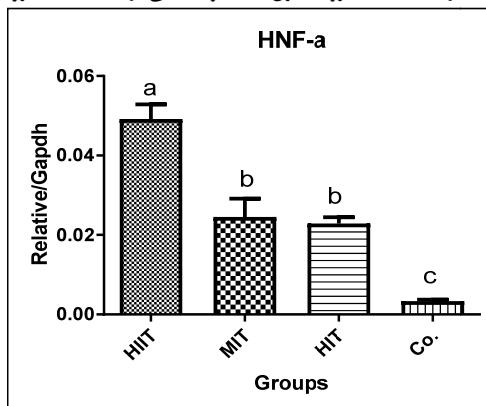
جدول ۳- میانگین و انحراف معیار وزن در گروههای مختلف تحقیق

گروهها	CO	MIT	HIT	HIIT
میانگین وزنی (گرم)	۳۱۲/۸±۲۵/۸	۳۱۳/۷±۲۸/۶	۳۱۰/۳±۳۱/۴	۲۹۵/۶±۲۷/۲



شکل ۱- تغییرات بیان زن STAT3 در بافت کبد رت‌های نر ویستار در گروه‌های پژوهش

a: تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل؛ b: تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه‌های تمرینی



شکل ۲- تغییرات بیان زن HNFa در بافت کبد رت‌های نر ویستار

a: تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل؛ b: تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه‌های تمرینی

نشد ( $P=0.552$ ). همچنین بررسی آزمون تعییبی در گروههای تمرینی نشان داد که اختلاف معنی‌داری در بیان زن HNFa میان گروههای MIT و HIT نسبت به گروه کنترل وجود دارد ( $P\leq0.001$ )، به طوری که در گروه MIT به میزان  $0.021$  واحد و در گروه HIT به میزان  $0.019$  واحد نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است (شکل ۲).

### بحث و نتیجه‌گیری

نتایج بدست آمده از اجرای آزمون تحلیل واریانس

یک طرفه نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین ۴ گروه پژوهش در مقادیر بیان زن HNFa وجود دارد ( $P=0.001$ ). مقایسه بین گروهی با آزمون تعییبی توکی نتایج نشان داد که میان گروههای HIT و کنترل نسبت به گروه HIIT تفاوت معنی‌داری در بیان زن HNFa وجود دارد ( $P\leq0.001$ )، به طوری که در گروه HIT به میزان  $0.024$  واحد، در گروه HIT به میزان  $0.026$  واحد و در گروه کنترل به میزان  $0.045$  واحد نسبت به گروه HIIT کاهش داشته است. در حالی که تفاوت معنی‌داری میان گروههای HIT و MIT مشاهده

طور قابل توجهی مرگ سلولی را کاهش می‌دهد. همچنانی از دیگر نتایج این پژوهش افزایش آنتی آپویتوز HNF-1 $\alpha$  در گروه‌های آزمایش نسبت به گروه کنترل بود. در انسان، جهش در HNF1A باعث دیابت می‌شود که به داروهای سولفونیل اوره با دوز پایین پاسخ می‌دهد. هایپرگلیسمی از مشکلات افراد دیابتی و ناشی از اختلال در مسیر سیگنالینگ انسولین در کبد است که از ژن‌های درگیر در این مسیر HNF و STAT3 است که با افزایش بیان ژن‌های درگیر در گلوكونوزنر به تولید گلوكز منجر می‌شود (۲۵). با توجه به اینکه فعالیت ورزشی بر روی بهبود دیابت مؤثر است و HNF و STAT3 نیز از ژن‌های مهم سیگنالیگ انسولین در بافت کبد و درگیر در دیابت است، از این رو با اندازه‌گیری بیان آن در کنار تغییرات انسولین و گلوكز می‌تواند اطلاعات مفیدی از وضعیت دیابت در نتیجه تمرینات ورزشی به عنوان یکی از مکانیسم‌های مهم نشان دهد. بر اساس تحقیقات پژوهشگران تغییر ژنتیکی رایج در HNF1A با خطر ابتلا به دیابت نوع ۲ و HNF-1 $\alpha$  افزایش نفوذ دیابت زودرس همراه است (۲۶). در ترویج حمل و نقل کاتيون‌های آلی کبدی، که کلاس‌های خاصی از داروها را جذب می‌کنند، دخیل است. از این رو، از بین رفتن عملکرد آن می‌تواند به مشکلات متابولیسم دارو منجر شود. علاوه بر این، HNF-1 $\alpha$  بیان پروتئین‌های فاز حاد، مانند فیبرینوژن، پروتئین واکنشی C و گیرنده‌های اینترلوکین ۱، که با التهاب درگیر هستند، تنظیم می‌کند (۲۷). علاوه بر این، سطح قابل توجهی پایین تر از HNF-1 $\alpha$  در تومورهای لوزالمعده و آدنومهای کبدی از بافت مجاور طبیعی مشاهده شد، نشان می‌دهد که HNF-1 $\alpha$  ممکن است نقش مهارکننده تومور احتمالی را بازی کند. نتایج نشان داد تمرینات تناوبی پرشدت می‌تواند با افزایش بیان ژن HNF-1 $\alpha$  در افزایش بقا بدن نقش اثرباری داشته باشد (۲۸). پیشنهاد می‌شود گروه‌های دستاندر کار آموزش پزشکی با کمک گروه‌های کار آزموده و متخصصین علوم ورزشی با توجه به نقش تمرین تناوبی پرشدت به عنوان یک مداخله غیر دارویی در کاهش آپویتوز و افزایش بقا بدن در جهت آگاه سازی جامعه، به تشویق آنها در ورزش‌های همگانی پرداخته شود.

یک طرفه نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین ۴ گروه پژوهش در مقادیر بیان ژن STAT3 و HNFα وجود دارد. آپویتوز، مرگ فیزیولوژیک سلولی است که در شرایط طبیعی سبب حذف سلول‌های پیر، آسیب دیده، اضافی و مضر می‌شود و برای تکامل و هموستان بافتی ضروری است. آپویتوز در ترمیم و نوسازی بافتی و نیز حذف سلول‌های خود واکنش‌گر نقش دارد. جلوگیری از آسیب سلولی ناشی از آپویتوز بسیار با اهمیت است و در چند سال اخیر تأثیر تمرینات مختلف بر روی آپویتوز مورد توجه بسیاری از پژوهشگران علوم ورزشی بوده است (۱۹). محققانی همچون دو (Du) و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کرده‌اند که تمرینات منظم و با شدت متوسط می‌تواند آپویتوز را کاهش دهد. که این نتیجه با نتایج پژوهش حاضر همسو می‌باشد (۲۰). پترسون و همکاران نشان دادند که ۹ هفته تمرین با شدت متوسط می‌تواند باعث کاهش سطوح پروتئین BAX، فعالیت کاسپاز و قطعه قطعه شدن DNA در بافت قلبی موش‌های چاق شود (۲۱). همچنین قوامی (Ghavami) و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند تمرین روی ترمیل باعث افزایش متغیرهای آنتی آپوپتوزیسی بافت قلبی بعد از آسیب ایسکمی-ریپریوژن موش‌ها می‌شود (۲۲). در مقابل نتایج تحقیقات اسینبرگ (Eisenberg) و همکاران (۲۰۰۹) نشان داده است که تمرینات استقامتی طولانی مدت می‌تواند آپویتوز قلبی را به وسیله استرس اکسیداتیو تحрیک کند. تمرینات ورزشی باعث تغییر بیان ژنی شده و متعاقب آن باعث کاهش تحریک آپویتوز و بسیاری صدمات میتوکندری می‌گردد (۲۳). در هر مرحله از مرگ سلولی، سلول با توجه به ماهیت تحریکات و خصوصیات و محتویات سلولی و محیط پیرامون خود تصمیم می‌گیرد که کدام مسیر را به کار گیرد ولی بسیاری از این مسیرها در تعامل با هم بوده و از تنظیم‌کننده‌های مولکولی و مکانیسم‌های بیوشیمیایی مشترکی استفاده می‌کنند. به عنوان مثال انجام تمرینات استقامتی به تنها ی باعث افزایش رادیکال‌های آزاد شده و احتمالاً در کوتاه مدت باعث افزایش آپویتوز گردد ولی اگر به صورت منظم و تداومی AKT/MTOR انجام گیرد باعث افزایش فعالیت مسیر شده فرایند سنتز پروتئین را تحریک کند (۲۴). به طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که تمرین ورزشی به

Q, et al. HNF-1a promotes pancreatic cancer growth and apoptosis resistance via its target gene PKLR. *Acta Biochim Biophys Sinica*. 2020;52(3):241-50.

13. Pors J, Segura S, Cheng A, Ji JX, Tessier-Cloutier B, Cochrane D, et al. Napsin-A and AMACR are superior to HNF-1 $\beta$  in distinguishing between mesonephric carcinomas and clear cell carcinomas of the gynecologic tract. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2020;28(8):593-601.

14. Wang JW, Chen Y, Liu QC, Liu GZ, Zhang SY, Guo YJ, et al. HNF-1 binding point mutation of the AFP gene promotes cirrhosis in post-menopausal women. *Int J Biol Markers*. 2020;35(1):41-6.

15. Tan SY, Little HC, Sarver DC, Watkins PA, Wong GW. CTRP12 inhibits triglyceride synthesis and export in hepatocytes by suppressing HNF-4 $\alpha$  and DGAT2 expression. *FEBS Lett*. 2020;594(19):3227-39.

16. Rædergård HG, Falch HN, Tillaar Rvd. Effects of Strength vs. Plyometric Training on Change of Direction Performance in Experienced Soccer Players. *Sports*. 2020;8(11):144.

17. Richard TJAJL, Seipb L. Genetics of the Adaptation to Exercise. *Healthy Agriculture, Healthy Nutrition, Health People*. 2011;102:144-9.

18. Lu K, Wang L, Wang C, Yang Y, Hu D, Ding R. Effects of high-intensity interval versus continuous moderate-intensity aerobic exercise on apoptosis, oxidative stress and metabolism of the infarcted myocardium in a rat model. *Mol Med Rep*. 2015;12(2):2374-82.

19. Pearson ER, Boj SF, Steele AM, Barrett T, Stals K, Shield JP, et al. Macrosomia and hyperinsulinaemic hypoglycaemia in patients with heterozygous mutations in the HNF4A gene. *PLoS Med*. 2007;4(4):e118.

20. Baciu C, Pasini E, Angeli M, Schwenger K, Afrin J, Humar A, et al. Systematic integrative analysis of gene expression identifies HNF4A as the central gene in pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *PLoS One*. 2017;12(12):e0189223.

21. Stephanie-May R, John WS, Tuomo R, Claude B, Marie-Claude V, Louis P. Interaction between HNF4A polymorphisms and physical activity in relation to type 2 diabetes-related traits: results from the Quebec Family Study. *Diabetes Res Clin Pract*. 2009;84(3):211-8.

22. Stern E, Strihan C, Potievsky O, Nimri R, Shalitin S, Cohen O, et al. Four novel mutations, including the first gross deletion in TCF1, identified in HNF4a, GCK and TCF1 in patients with MODY in Israel. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2007;20(8):909-22.

23. Jung SY, Papp JC, Sobel EM, Pellegrini M, Yu H, Zhang ZF. Pro-inflammatory cytokine polymorphisms in ONECUT2 and HNF4A and primary colorectal carcinoma: a post genome-wide

## تقدیر و تشکر

مقاله حاضر بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی ورزشی دانشگاه پیام نور مرکز کرج حاصل شده است و بدین وسیله از معاونت پژوهشی این دانشگاه که ما را در اجرای این طرح یاری نموده‌اند تشکر و قدردانی می‌شود.

## References

1. Su L, Fu J, Sun S, Zhao G, Cheng W, Dou C, et al. Effects of HIIT and MICT on cardiovascular risk factors in adults with overweight and/or obesity: A meta-analysis. *PLoS One*. 2019;14(1):e0210644.
2. Khodadadi H, Rajabi H, Seyyed Reza Attarzadeh SR, Abbasian S. The effect of high intensity interval training (HIIT) and pilates on levels of irisin and insulin resistance in overweight women. *Iranian J Endocrinol Metab*. 2014;16(3):190-6.
3. Grace F, Herbert P, Elliott AD, Richards J, Beaumont A, Sculthorpe NF. High intensity interval training (HIIT) improves resting blood pressure, metabolic (MET) capacity and heart rate reserve without compromising cardiac function in sedentary aging men. *Experim Gerontol*. 2018;109:75-81.
4. Gaetano R, Rago V. Preliminary study on effects of hiit-high intensity intermittent training in youth soccer players. *J Physic Educ Sport*. 2014;14(2).
5. Johnson DE, O'Keefe RA, Grandis JR. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. *Nature Rev Clin Oncol*. 2018;15(4):234.
6. Hillmer EJ, Zhang H, Li HS, Watowich SS. STAT3 signaling in immunity. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2016;31:1-15.
7. Zou S, Tong Q, Liu B, Huang W, Tian Y, Fu X. Targeting STAT3 in Cancer Immunotherapy. *Mol Cancer*. 2020;19(1):1-19.
8. Ma J-h, Qin L, Li X. Role of STAT3 signaling pathway in breast cancer. *Cell Commun Signal*. 2020;18(1):1-13.
9. Siersbæk R, Scabia V, Nagarajan S, Chernukhin I, Papachristou EK, Broome R, et al. IL6/STAT3 Signaling Hijacks Estrogen Receptor  $\alpha$  Enhancers to Drive Breast Cancer Metastasis. *Cancer Cell*. 2020;38(3):412-23. e9.
10. Im JY, Kim BK, Lee KW, Chun SY, Kang MJ, Won M. DDIAS promotes STAT3 activation by preventing STAT3 recruitment to PTPRM in lung cancer cells. *Oncogenesis*. 2020;9(1):1-11.
11. Kawahara N, Mizutani A, Matsubara S, Takeda Y, Kobayashi H. GSK-3 $\beta$  mediates the effects of HNF-1 $\beta$  overexpression in ovarian clear cell carcinoma. *Experim Therac Med*. 2020;20(5):1-.
12. Fan Z, Fan K, Deng S, Gong Y, Qian Y, Huang

gene-lifestyle interaction study. Am J Cancer Res. 2020;10(9):2955.

24. Radi S, Deol P, Deans JR, Fekry B, Eckel-Mahan K, Sladek FM. SUN-LB119 Role of HNF4a Isoforms in the Carbohydrate/Lipid Switch in the Liver and Responsiveness to AMPK. J Endocrine Soc. 2020;4(Supplement\_1):SUN-LB119.

25. Xiao C, Beitzler JJ, Higgins KA, Chico CE, Withycombe JS, Zhu Y, et al. Pilot Study of Combined Aerobic and Resistance Exercise on Fatigue for Patients with Head and Neck Cancer: Inflammatory and Epigenetic Changes. Brain Behav Immun. 2020.

26. Qu M, Duffy T, Hirota T, Kay SA. Nuclear receptor HNF4A transrepresses CLOCK: BMAL1 and modulates tissue-specific circadian networks. Proceed Natl Acad Sci. 2018;115(52):E12305-E12.

27. Marable SS, Chung E, Adam M, Potter SS, Park J-S. Hnf4a deletion in the mouse kidney phenocopies Fanconi renotubular syndrome. JCI Insight. 2018;3(14).

28. Zhang X, Xu Y, Qian Z, Zheng W, Wu Q, Chen Y, et al. circRNA\_104075 stimulates YAP-dependent tumorigenesis through the regulation of HNF4a and may serve as a diagnostic marker in hepatocellular carcinoma. Cell Death Dis. 2018;9(11):1-14.