



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

سعید نقیعی: 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 سطوتی نیری: گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

محمدرضا علیزاده میراشرفی: کارشناسی ارشد فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اردبیل، اردبیل، ایران

### چکیده

#### کلیدواژه‌ها

شیوه تمرینی MIT

HIT

HIIT

بیان ژنی HNFa/STAT3

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 نژاد ویستار صورت گرفت.

**روش کار:** در این مطالعه تعداد ۳۳ سر رت نر نژاد ویستار با میانگین سنی ۶ هفته و وزن  $178 \pm 11$  گرم انتخاب شد. موش‌ها به صورت تصادفی به چهار گروه کنترل، تمرین با شدت متوسط، تمرین پرشدت، تمرین تناوبی پرشدت 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 پرشدت 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.

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



## The effect of 8 weeks of continuous and periodic training on HNFa 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](mailto: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,  
HNFa / 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-wilk 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

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 تناوبی (MIT Moderate Intensity Training) HIT، (High Intensity Training) HIIT و (High-intensity interval Training) HIIT مورد توجه قرار گرفته است (۱). توانایی برنامه‌های HIT، MIT و HIIT در بهبود سریع ظرفیت ورزشی و متابولیسم انرژی عضله‌ی اسکلتی بوسیله‌ی محققان مختلف بررسی شده است (۲). تمرینات تناوبی 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 داخل سلولی بوده و کارشان میانجی‌گری و حضور در ایمنی، رشد، تمایز و آپوپتوز سلول‌هاست (۵). این پروتئین‌ها توسط جانوس کیناز (Janus kinase: JAK) فعال می‌شوند و هرگونه اختلال تنظیمی در این مسیر پیغام‌رسانی، منجر به افزایش احتمال بروز تومور می‌شود و آنژیوژنز (رگ‌زایی) را تشدید می‌کند که این موضوع نیز به نوبه خود منجر به افزایش بقای تومور و سرکوب دستگاه ایمنی بدن می‌شود (۶). مولکول‌های مبدل سیگنال و فعال‌کننده نسخه‌برداری (STAT) در پی اتصال هورمون‌های رشد، انسولین و هورمون‌های گلوکوکورتیکوئیدی به گیرنده خود فعال 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 ۷۵۰-۸۵۰ اسید آمینه تشکیل شده‌اند و موقعیت کروموزومی و پروتئین‌های شناسایی

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 فعال شده و سپس در ادامه از کمپلکس گیرنده‌های همودایمر یا هتروداایمر جدا شده و از سیتوپلاسم به هسته، جایی که با اثر بر پروموتور ژن‌های خاص که نهایتاً در تنظیم بیان ژن نقش دارند، جابه‌جا 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 هیپاتوبلاست‌ها به حالت بالغ عمل می‌کند (۱۰). همچنین اخیراً مشخص شد که HNF یک تنظیم‌کننده بیان miR-۱۲۲ بوده و افزایش بیان این عامل طی تکامل کبدی جنین موش هم جهت با افزایش بیان miR-۱۲۲ 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 اولیه‌ی افزایش گلوکز ناشتایی 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 فسفوانول پیرووات کربوکسی کیناز درگیر در مسیر گلوکونئوژنز، 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 فعال شده تکثیری پروکسیزومی (PGC-1 $\alpha$ ) سیرتوئین و پروتئین مبدل سیگنال و فعال‌کننده رونویسی ۶ (STAT3) تنظیم می‌شوند (۱۴). همچنین نتایج مطالعه‌ای نشان داد یکی از مکانیسم‌هایی که اثر انسولین بر گلوکونئوژنز را مهار می‌کند، به توانایی کاهش بیان HNF-4 $\alpha$  و Foxo1 در کبد بستگی دارد. بیان شده است که HNF-4 $\alpha$  متابولیسم گلوکز در کبد

این حیوانات پس از انتقال به محیط آزمایشگاه جانوری، به صورت گروه‌های ۴ سر موش در قفس‌های پلی کربنات شفاف در محیطی با دمای  $22 \pm 1/4$  درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۴۵ 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 تدوامی با شدت متوسط (MIT) (۸ سر)، تمرین تدوامی شدید (HIT) (۸ سر) و تمرین تناوبی شدید (HIIT) (۸ سر) تقسیم شدند. نگهداری حیوانات مطابق با راهنمای انستیتوی 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 به‌پرو 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. حداکثر اکسیژن مصرفی ( $VO_2max$ ) حیوانات با توجه به عدم دسترسی به ابزار مستقیم، با آزمون فرآینده بر روی نوارگردان و به‌طور 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  $VO_2max$  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 فسفوانول پیرووات کربوکسی کیناز تعدیل 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 بافت‌هایی 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 کبد از طریق مسیر HNF-4a در موش‌های مقاوم به انسولین پرداخته است که نتایج آن حاکی از تنظیم کاهش 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 آنژیوژنز 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  $237 \pm 33$  گرم از استیتو پاستور خریداری شدند.

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

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

تمرین، نمونه‌برداری از حیوانات ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی انجام شد. بدین منظور ابتدا حیوانات با استفاده از تزریق صفاقی کتامین (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  $-70^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد منتقل شد. کیت سنتز cDNA توسط Thermo Scientific که با شماره کاتالوگ K1622 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 total RNA به نسبت ۱ به ۱۲ در QIAzol Reagent Lysis هموزن گردید.

**تعیین بیان ژن‌های *pary1* به روش *real-time PCR***  
واکنش Real-Time PCR در دستگاه ای.بی.آی (ABA) ساخت کشور آمریکا انجام شد. درون هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای، مخلوطی به حجم ۲۵ میکرولیتر متشکل از ۱۲/۵ میکرولیتر مخلوط اصلی سایبرگرین مسترمیکس (SYBR green master mix)، ۲ میکرولیتر از پرایمرهای اختصاصی هر ژن، ۴ میکرولیتر از DNA ژنومی و ۶/۵ میکرولیتر آب مقطر تهیه 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 فعال سازی آنزیم پلیمرز 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 فزاینده 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 وهله 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 وهله 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 وهله 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 وهله 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 بدنه 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 پرایمرها 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'- GACATGCCGCCTGGAGAAAAC -3' Rev: 5'- AGCCAGGATGCCCTTTAGT -3'

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

### یافته‌ها

جدول ۳ میانگین و انحراف معیار وزن موش‌های صحرای گروه‌های مختلف تحقیق را نشان می‌دهد. نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان داد که تفاوت معناداری در وزن موش‌های گروه‌های مختلف تحقیق وجود ندارد ( $p=0.09$ ).

نتایج بدست آمده از اجرای آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین ۴ گروه پژوهش در مقادیر بیان ژن STAT3 وجود دارد ( $P=0.001$ ). مقایسه بین گروهی با آزمون توکی نشان داد که تفاوت معنی‌داری در بیان ژن STAT3 در بافت کبد رت‌های نر ویستار میان گروه‌های MIT و HIT نسبت به گروه HIIT وجود ندارد (به ترتیب:  $P=0.46$  و  $P=0.313$ ). همچنین اختلاف معنی‌داری میان گروه‌های HIIT و کنترل مشاهده گردید ( $P \leq 0.001$ ), به طوری که در گروه HIIT به میزان  $0.006$  واحد نسبت به گروه کنترل کاهش داشت. با این حال میان گروه HIT و MIT تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ( $P=0.147$ ). از سویی دیگر اختلاف معنی‌داری میان گروه‌های HIT و MIT نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ( $P \leq 0.001$ ), به طوری که در گروه HIT و MIT به میزان  $0.004$  واحد نسبت به گروه کنترل کاهش داشت (شکل ۱).

نتایج بدست آمده از اجرای آزمون تحلیل واریانس

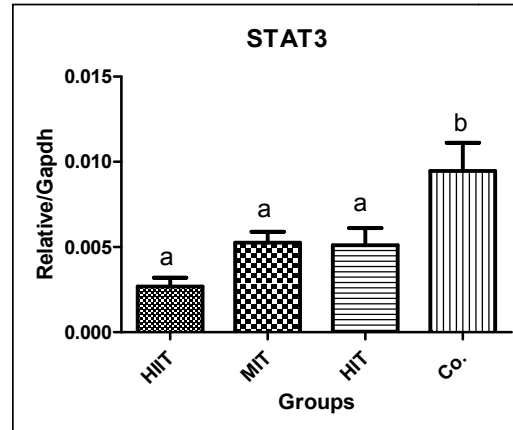
صورت متناوب در طول ۴۰ چرخه با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه انجام شد. در مرحله سوم به منظور رسم منحنی تفکیک، برنامه دمایی مورد استفاده شامل دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه بود. در این مرحله، کاهش دما از ۹۵ درجه سانتی‌گراد به ۶۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت  $0.3/0$  درجه سانتی‌گراد بر ثانیه انجام شد و حدوداً ۲۰ دقیقه طول کشید. پس از اتمام مرحله سوم، منحنی‌های تکثیر و تفکیک با استفاده از نرم‌افزار SDS ABI تحلیل شد. تفاوت Ct ژن هدف به ژن رفرنس به صورت  $\Delta Ct$  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 IGF1 از سایت NCBI استخراج شد.

پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار AllelID و توسط شرکت CinnaGen ساخته شده و پس از آن هر پرایمر توسط نرم‌افزار BLAST مورد ارزیابی قرار گرفت تا از قرارگیری جفتی پرایمرها اطمینان حاصل شود. در این تحقیق، ژن GAPDH به‌عنوان 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 سانتی‌گراد و برای ۳۰ ثانیه تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. پرایمرهای مربوط به رت‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است.

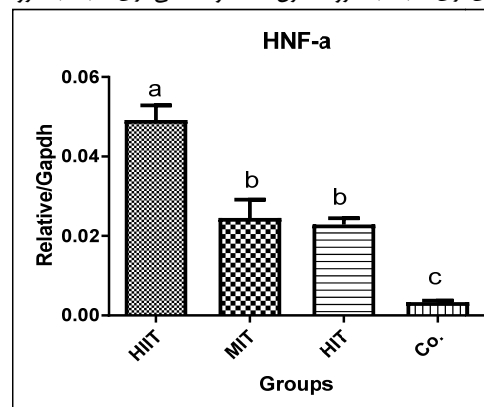
**روش‌های آماری:** بعد از تحلیل آزمایشگاهی نمونه‌ها، برای توصیف کمی داده‌ها از شاخص‌های آمار توصیفی شامل میانگین و انحراف استاندارد و آمار استنباطی استفاده شد. ابتدا جهت تعیین طبیعی بودن

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

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



شکل ۱- تغییرات بیان ژن STAT3 در بافت کبد رت‌های نر و بیستار در گروه‌های پژوهش  
a: تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل؛ b: تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه‌های تمرینی



شکل ۲- تغییرات بیان ژن HNFa در بافت در بافت کبد رت‌های نر و بیستار  
a: تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل؛ b: تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه‌های تمرینی

نشد ( $P=0/552$ ). همچنین بررسی آزمون تعقیبی در گروه‌های تمرینی نشان داد که اختلاف معنی‌داری در بیان ژن HNFa میان گروه‌های MIT و HIT نسبت به گروه کنترل وجود دارد ( $P\leq 0/001$ )، به طوری که در گروه MIT به میزان  $0/21$  واحد و در گروه HIT به میزان  $0/19$  واحد نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است (شکل ۲).

### بحث و نتیجه‌گیری

نتایج بدست آمده از اجرای آزمون تحلیل واریانس

یک‌طرفه نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین ۴ گروه پژوهش در مقادیر بیان ژن HNFa وجود دارد ( $P=0/001$ ). مقایسه بین گروهی با آزمون تعقیبی توکی نتایج نشان داد که میان گروه‌های MIT، HIT و کنترل نسبت به گروه HIIT تفاوت معنی‌داری در بیان ژن HNFa وجود دارد ( $P\leq 0/001$ )، به طوری که در گروه MIT به میزان  $0/24$  واحد، در گروه HIT به میزان  $0/26$  واحد و در گروه کنترل به میزان  $0/45$  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. همچنین از دیگر نتایج این پژوهش افزایش آنتی آپوپتوز 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 گلوکونئوزن به تولید گلوکز منجر می‌شود (۲۵). با توجه به اینکه فعالیت ورزشی بر روی بهبود دیابت مؤثر است و HNF و STAT3 نیز از ژن‌های مهم سیگنالینگ انسولین در بافت کبد و درگیر در دیابت است، از این رو با اندازه‌گیری بیان آن در کنار تغییرات انسولین و گلوکز 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 افزایش نفوذ دیابت زودرس همراه است (۲۶). HNF-1 $\alpha$  در ترویج حمل و نقل کاتیون‌های 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 اثرگذاری 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 آپوپتوز و افزایش بقا بدن در جهت آگاه‌سازی جامعه، به تشویق آنها در ورزش‌های همگانی پرداخته شود.

یک‌طرفه نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین ۴ گروه پژوهش در مقادیر بیان ژن STAT3 و HNF $\alpha$  وجود دارد. آپوپتوز، مرگ فیزیولوژیک سلولی است که در شرایط طبیعی سبب حذف سلول‌های پیر، آسیب دیده، اضافی و مضر می‌شود و برای تکامل و هموستاز بافتی ضروری است. آپوپتوز در ترمیم و نوسازی بافتی و نیز حذف سلول‌های خود واکنش‌گر نقش دارد. جلوگیری از آسیب سلولی ناشی از آپوپتوز بسیار با اهمیت است و در چند سال اخیر تأثیر تمرینات مختلف بر روی آپوپتوز 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 آپوپتوز 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 تردمیل باعث افزایش متغیرهای آنتی آپوپتوزیسی بافت قلبی بعد از آسیب ایسکمی-رپرفیوژن موش‌ها می‌شود (۲۲). در مقابل نتایج تحقیقات اسینبرگ (Eisenberg) و همکاران (۲۰۰۹) نشان داده است که تمرینات استقامتی طولانی مدت می‌تواند آپوپتوز قلبی را به وسیله استرس اکسیداتیو تحریک کند. تمرینات ورزشی باعث تغییر بیان ژنی شده و متعاقب آن باعث کاهش تحریک آپوپتوز 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 تنهایی باعث افزایش رادیکال‌های آزاد شده و احتمالاً در کوتاه مدت باعث افزایش آپوپتوز گردد ولی اگر به صورت منظم و تدوami انجام گیرد باعث افزایش فعالیت مسیر AKT/MTOR 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 TAJL, 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 Therc 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, Beitler 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.