ORIGINAL ARTICLE

The Combined Effect of High Intensity Interval Training and Flaxseed Oil Supplement on Cardioprotection: by UCP2, UCP3 and eNOS mRNA expression

Hossein Shirvani[1],
Saleh Rahmati-Ahmadabad[2]

[1] Assistant Professor, Exercise Physiology Research Center, Life Style Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Physical Education, Pardis Branch, Islamic Azad University, Pardis, Iran

(Received May 14, 2017 ; Accepted November 18, 2017)

Abstract

Background and purpose: Creating cardiovascular protection with proper exercise and nutrition are important issues. The aim of this study was to investigate the combined effects of high intensity interval training (HIIT) and flaxseed oil supplement on the expression of genes involved in cardiac protection (UCP2, UCP3 and eNOS) in healthy male rats.

Materials and methods: Twenty adult wistar rats were randomly divided into four groups (n=5) including control-saline (CS), training-saline (TS), control-flaxseed oil (CO), and training-flaxseed oil (TO). The training groups were given high-intensity interval training (10 weeks, five sessions in week) on a rodent treadmill at 90–95% of VO2max. The supplement groups received flaxseed oil at 30 mg/kg per cage. Five days after the last training session, rats were sacrificed and samples were collected.

Results: UCP2 and UCP3 gene expression significantly increased in training group compared with control group. Interestingly, we found that UCP2 gene expression in combined group was significantly higher than those of the control and training groups (P=0.008). Also, the expression of UCP3 was significantly higher in the exercise training group (P=0.05) and combined group (P=0.05). eNOS gene expression significantly increased in combined group compared with control and trainig groups (P=0.008).

Conclusion: High intensity interval training combined with flaxseed oil supplement contributes to cardiac protection by increasing the expression of UCP2, UCP3 and eNOS genes.

Keywords: uncoupling proteins, endothelial nitric oxide synthase, cardioprotection, flaxseed oil supplementation, high intensity interval training

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 28 (160): 8-18 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هشتم شماره ۱۶۰ اردیبهشت سال ۱۳۹۷ (۱۸-۸)

اثر ترکیبی تمرین تناوبی شدید و مکمل روغن بذر کتان بر محافظت قلبی: به واسطه بیان ژن‌های UCP2، UCP3 و eNOS

حسین شیروانی[۱]
صالح رحمتی احمدآباد[۲]

چکیده

سابقه و هدف: ایجاد محافظت قلبی عروقی با فعالیت ورزشی و تغذیه مناسب از جمله موضوعات مهم و جذاب است. مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر تعاملی یک دوره تمرین تناوبی شدید و مصرف مکمل روغن بذر کتان بر بیان ژن‌های درگیر در محافظت قلبی (UCP2، UCP3 و eNOS) در رت‌های نر سالم انجام شده است.

مواد و روش‌ها: ۲۰ سر رت بالغ نر، به‌صورت تصادفی به چهار گروه ۵ تایی شامل: کنترل سالین (CS)، تمرین سالین (TS)، مکمل بذر کتان (CO) و تمرین مکمل بذر کتان (TO) تقسیم شدند. گروه‌های تمرینی، به مدت ۱۰ هفته و هر هفته پنج جلسه، تمرین اینتروال را با شدت ۹۰ تا ۹۵ درصد VO2max روی نوارگردان مخصوص جوندگان انجام دادند و گروه‌های مکمل نیز عصاره روغنی بذر کتان را با دوز ۳۰ mg/kg دریافت می‌کردند. پنج روز پس از آخرین جلسه تمرینی رت‌ها قربانی شدند. سپس بافت برداری قلب انجام و مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج پژوهش حاضر نشان داد تمرین به طور معنی‌داری باعث افزایش بیان ژن UCP2 نسبت به گروه کنترل شده است (p= ۰/۰۳). بیان ژن UCP2 در گروه تعاملی بیش‌تر از کنترل (p= ۰/۰۰۸) و تمرین (p= ۰/۰۰۸) بود. در مورد UCP3، تمرین به طور معنی‌داری باعث افزایش بیان ژن UCP3 نسبت به گروه کنترل شد. بیان ژن UCP3 در گروه تمرین (p= ۰/۰۵) و تعاملی (p= ۰/۰۵) به‌طور معنی‌داری بالاتر از مکمل بود. هم‌چنین در گروه تعاملی به طور معنی‌داری بیش‌تر از کنترل بود (p= ۰/۰۳). در مورد eNOs، گروه تعاملی بیان ژن eNOS بیش‌تری را نسبت به کنترل نشان دادند. هم‌چنین بیان ژن eNOS در گروه تعاملی از گروه تمرین بیش‌تر بود (p= ۰/۰۰۸).

استنتاج: تمرین تناوبی شدید همراه با مصرف مکمل روغن بذر کتان بواسطه افزایش بیان ژن‌های UCP2، UCP3 و eNOS باعث محافظت قلبی می‌شود.

واژه های کلیدی: پروتئین‌های جفت نشده، نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی، محافظت قلبی، مکمل سازی بذر کتان، تمرین تناوبی شدید

مقدمه

بهبود سلامت و جلوگیری بیماری در انسان از جمله موضوعاتی است که ذهن پژوهشگران را به خود مشغول کرده است. زندگی مدرن و ماشینی که با سبک زندگی غیرفعال توام شده است، باعث به‌وجود آمدن

مولف مسئول: حسین شیروانی: تهران: دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران Email: Shirvani@bmsu.ac.ir
۱. استادیار، مرکز تحقیقات فیزیولوژی ورزشی، پژوهشکده سبک زندگی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران
۲. استادیار، گروه تربیت بدنی، واحد پردیس، دانشگاه آزاد اسلامی، پردیس، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۶/۲/۲۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :۱۳۹۶/۳/۱ تاریخ تصویب : ۱۳۹۶/۸/۲۷

چاقی و تشدید بیماری‌های قلبی عروقی شده است. بنابر گزارش‌های موجود، سالانه حدود ۱۲ میلیون نفر جان خود را در اثر بیماری‌های قلبی عروقی از دست می‌دهند. نشان داده شده است که چاقی ۳۰ تا ۷۰ درصد منشا ژنتیکی دارد(۱).

پژوهش‌های متعددی به بررسی ارتباط بین تغییرات توالی DNA در ژن‌های خاص و فنوتیپ‌های چاقی پرداخته‌اند(۲). در این راستا، ۲۲ ژن وجود دارند که ارتباط هر یک از آن‌ها با فنوتیپ‌های چاقی به خوبی مورد تایید قرار گرفته است(۲) که پروتئین جفت نشده ۲ و ۳ (UCP2 و UCP3) از این ژن‌ها می‌باشد. مطالعات گذشته بیان ژن UCP ها در بافت‌های مختلف از جمله قلب و عضله اسکلتی را نشان داده‌اند. UCP2 در بافت‌های مختلفی از جمله قلب بیان می‌شود. UCP3 به مقدار زیادی در عضله اسکلتی بیان می‌شود و بیان آن در قلب کم‌تر است. UCP3 به واسطه‌ی افزایش انتقال پروتون از غشای داخلی میتوکندری، گرمازایی سازشی را در عضله کاتالیز می‌کند(۳). نشت پروتون‌ها از راه UCP3، اکسیداسیون سوبسترا را از فسفریلاسیون ADP به ATP جدا کرده و منجر به مصرف سریع اکسیژن و تولید گرما می‌شود. بنابراین، شرایطی که در آن تغییرات متابولیکی رخ دهد (از جمله پس از فعالیت بدنی)، می‌تواند منجر به پاسخ بیان ژن و پروتئین بیش‌تر UCP3 شود. نقش UCP3 در تنظیم وزن بسیار مورد توجه است، چنانچه نشان داده شده است با افزایش مصنوعی بیان این ژن در موش‌ها، با این که پرخوری می‌کردند، اما از موش‌های معمولی لاغرتر بودند(۴). به‌طور کلی UCP2 و ۳ نقش مهمی در تنظیم متابولیسم ایفا می‌کنند. هم‌چنین هموستاز کلسیم را نیز تنظیم می‌کنند(۵). UCP2 و ۳ به نارسایی قلبی نیز مربوط می‌باشند.

نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی (eNOS) آنزیم سازنده NO است و از طریق NO باعث کاهش چسبندگی لکوسیتی، کاهش تجمع در پلاکت‌ها، کاهش تکثیر سلول‌های عضله صاف و اتساع رگ می‌شود(۶، ۷). بنابراین پیشگیری کننده قوی برای مقابله با بیماری‌های قلبی عروقی می‌باشد. تاکنون پژوهش های بسیاری در مورد تاثیر فعالیت‌های بدنی و مکمل‌های گیاهی بر عوامل مربوط به چاقی (پپتیدهای اشتهایی) و بیماری‌های قلبی عروقی (ژن‌های درگیر در فرآیند انتقال معکوس کلسترول، غلظت لیپیدها و لیپوپروتئین‌های پلاسما) شده است. آن ها به خوبی نشان داده اند که فعالیت بدنی و استفاده از مواد طبیعی می‌تواند بر بیان ژن‌ها و پروتئین‌ها تاثیر داشته باشد. در مورد فعالیت بدنی مطالعات نشان دادند که می‌تواند بیان ژن‌های UCP2 (۸)، UCP3 (۹، ۱۰) و eNOS (۱۱، ۱۲) را تغییر دهد. مطالعات در مورد تاثیر فعالیت طولانی مدت HIIT بسیار محدود می‌باشد. اخیراً مطالعه‌ای به بررسی تاثیر هشت هفته فعالیت شدید تناوبی بر بیان ژن‌های UCP2، UCP3 و eNOS پرداخته است. نتایج آن‌ها نشان داد فعالیت HIIT از طریق کاهش بیان ژن UCP ها و افزایش بیان ژن eNOS ممکن است کارایی و عملکرد بدنی را بهبود بخشد(۱۳). اما گذشته از نقش فعالیت بدنی، استفاده از مکمل های طبیعی ممکن است باعث تغییراتی شود که تاکنون در مطالعه ای مورد بررسی قرار نگرفته است.

بذر کتان در قرن‌های متوالی در طب سنتی مدیترانه‌ای به‌عنوان دارو استفاده شده است. روغن به دست آمده از این بذر نیز حاوی بخش عمده‌ای از خواص و فواید بذر کتان می‌باشد. این گیاه حاوی ریزمغذی‌های زیادی هم‌چون فیبر خوراکی، منگنز، ویتامین B1 و اسیدچرب ضروری آلفالینولینک اسید (معروف به امگا ۳)، می‌باشد(۱۴، ۱۵). تاکنون برخی مطالعات به بررسی اثرات این گیاه بر عوامل مربوط به گرفتگی قلبی عروقی(۱۶) و چاقی(۱۷) پرداخته اند. مطالعات نشان داده اند استفاده از مکمل کتان می‌تواند باعث کاهش تری گلیسرید(۱۸)، افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی(۱۹) و کاهش التهاب(۱۷، ۲۰) شود. به هرحال تاکنون مطالعه ای به بررسی اثر این روغن بر بیان

ژن‌هـــای UCP2، UCP3 و eNOS نپرداختـــه اســـت. مطالعات پیشین نشان داده است مـصرف امگـا ۳ و مـواد دارای امگا ۳ مانند روغن ماهی باعـث افـزایش بیـان ژن UCP3 را می شـود(۲۰، ۲۱). هـم چنـین مطالعـات پیـشین نـشان مـی‌دهنـد بیـان ژن و فعالیـت eNOS نیـز پـس از مصرف امگـا ۳ افـزایش مـی‌یابـد(۲۲، ۲۳). از ایـن جهـت ممکن است بذر کتان نیز به علت اسیدچرب فراوان امگا ۳ بتواند باعث تغییراتی در بیان ژن‌هـای مـورد نظـر شـود که نیاز به بررسی دارد. هم چنین تعامل مکمـل و تمـرین ممکن است باعث افزایش اثر تمرین، کاهش اثر تمـرین یا عدم تغییر در بیان ژن‌های مورد نظر شـود کـه تـاکنون مـورد بررسـی قـرار نگرفتـه اسـت. بنـابراین هـدف از پژوهش حاضر، بررسی تـاثیر یـک دوره طـولانی مـدت (ده هفته‌ای) فعالیـت HIIT و مکمـل‌سـازی روغـن بـذر کتـان بـر بیـان ژن‌هـای UCP2، UCP3 و eNOS در موش‌های نر می‌باشد.

مواد و روش ها

آزمودنی‌های پژوهش حاضر را موش‌های صحرایی بالغ نر از نـژاد ویـستار تـشکیل دادنـد. حیوانـات کـه بـه صورت تـصادفی انتخـاب شـده بودنـد، در حیـوان خانـه دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله با دمای ۲±۲۲ درجه سانتی گراد، رطوبت ۵۰-۴۵ درصد و چرخه تاریکی روشـنایی (۱۲ سـاعت نـورف ۱۲ سـاعت تـاریکی) در قفـس‌هـای مخـصوص از جـنس PVC بـا درپـوش فلـزی کـه کـف آن‌هـا بـا تراشـه‌هـای تمیـز چـوب پوشـانده شـده بـود، نگهـداری شـدند. از غـذای فـشرده مخـصوص مـوش صحرایی آزمایشگاهی سـاخت شـرکت بهپـرور کـرج و آب تصفیه شده شهری در بطری‌هـای ۵۰۰ میلـی لیتـری به صورت آزاد بـرای تغذیـه حیوانـات اسـتفاده شـد(۲۵). رت‌ها، به‌صورت تصادفی به چهار گروه (پنج سر در هـر گروه) شامل کنترل سالین، تمرین سالین، کنترل+ روغن بذر کتان و تمرین+ روغن بذر کتان تقـسیم شـدند. ایـن مطالعه بر اساس اصول مراقبت از حیوانات آزمایـشگاهی انجام شد[1] و کلیه اصول اخلاقی در مـورد نحـوه کـار بـا حیوانات آزمایشگاهی از جمله در دسـترس بـودن آب و غذا، شرایط نگهداری مناسب و عدم اجبـار و بـدرفتاری در تمرینات مد نظر قرار گرفت. مطالعه حاضـر بـا اجـازه نامه کتبی از معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) انجام گرفت. پنج روز پس از آخرین جلسه تمـرین، رت هـا بـا ترکیبـی از زایلـزین و کتـامین بیهوش شدند(۲۵)، خونگیری از قلب انجام و بافـت قلـب براشته شد. سپس به دو قسمت تقسیم و با سالین سرد شـسته شد، در تیوب مخصوص قرار گرفت و بـا نیتـروژن مـایع منجمد گردید. نمونه‌ها در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گـراد تا زمان ارسال به آزمایشگاه نگهداری شدند.

دانه تـازه کتـان از منـاطق رویـش آن در شهرسـتان مهریز واقع در استان یزد جمع‌آوری شد و روغـن آن بـا استفاده از دستگاه روغن‌گیـری اسـتخراج شـد و پـس از تاییـد توسـط گـروه تغذیـه (آزمایـشگاه کنتـرل کیفـی) دانـشگاه بقیـه الله (عـج) بـر اسـاس وزن مـوش بـا دوز ۳۰mg/kg به گروه‌های مربوطه خورانده شد(۲۵) و بـرای یکـسان سـازی اثـر گـاواژ بـه گـروه‌هـای دیگـر سـالین خورانده شد.

در ایـن پـژوهش، رت‌هـا پـس از انتقـال بـه مرکـز حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشـکی بقیـه‌الله بـه مدت سه روز برای سازگاری با محیط نگـه‌داری شـدند. آشناسازی رت‌ها با پروتکل ورزشی تناوبی شدید بـا ۱۰ جلسه تمرین در دو هفته انجام شد، به این صورت که در روز اول تمرین، رت‌ها بـا نهایـت دقـت و آرامـش روی تردمیل قرار گرفتند و با سرعت بسیار پایین و یکنواخـت شروع به تمرین کردند و در جلسات بعـد کـه رت‌هـا بـه خوبی و همگام با برنامه پیش آمدنـد، جهـت آشـنایی بـا پروتکل تناوبی مورد نظر با سـرعت‌هـای کـم از تمـرین تناوبی استفاده شد تا رت ها به نوع تمرین عادت کنند و با پروتکل آشنا شدند(۲۶). طی دو هفته زمان تمـرین نیـز افزایش یافت تا در پایان دو هفته، رت‌ها به زمـان واقعـی

1. NIH-Publication

تمرین یعنی ۱۸ دقیقه در بدنه اصلی تمرین رسیدند. بعد از دو هفته، بدون هیچ نوع مشکلی در پروتکل و آشنایی رت‌ها، تمرین اصلی به مدت ۱۰ هفته شروع و به پایان رساندند. برنامه پروتکل فعالیت ورزشی(۲۱) با توجه به اصول طراحی برنامه‌های تناوبی شدید برای به حداکثر رساندن عملکرد دستگاه هوازی (هم جذب اکسیژن و هم ظرفیت اکسیداتیو عضلات اسکلتی) در شدتی نزدیک به VO_{2max} و مدت آن بین دو الی چهار دقیقه و زمان برگشت به حالت اولیه فعال بین دو الی سه دقیقه باشد طراحی شده بود(۴). هر جلسه اجرای HIIT شامل ۳۰ دقیقه فعالیت ورزشی بود که در جدول شماره ۱ آورده شده است. در انتهای دو هفته آشنایی، حداکثر اکسیژن مصرفی رت‌ها اندازه‌گیری شد و رت‌ها بر طبق پروتکل تمرینی که بر اساس درصدی از حداکثر اکسیژن مصرفی (که به متر بر دقیقه تبدیل می‌گردید)، تمرین را آغاز کردند. در پایان هر دو هفته آزمون، حداکثر اکسیژن مصرفی برآورد و سرعت تمرینی جدیدی در هفته بعد، اعمال شد.

گروه تمرینی، به مدت ۱۰ هفته و هر هفته پنج جلسه، تمرینات HIIT را که شامل دویدن با شدت ۹۰ تا ۹۵ درصد VO2max روی نوارگردان مخصوص جوندگان، رأس ساعت ۱۸:۰۰ بود؛ انجام دادند و در همین زمان، گروه کنترل برای یکسان‌سازی تأثیر استرس به مدت ۱۵ دقیقه روی تردمیل با سرعت دو متر در دقیقه قرار داده شدند(۳). در زمان تمرین گروه (HIIT)، شیب تردمیل تغییری نداشت (شیب صفر درجه). پروتکل تمرینی تا ۵ روز قبل از قربانی کردن رت‌ها ادامه داشت.

جدول شماره ۱: طرح پروتکل تمرین تناوبی شدید(۲۱)

مراحل تمرین	گرم کردن	بدنه اصلی تمرین (۳ تناوب)		سرد کردن
مؤلفه تمرین		تناوب شدید	تناوب کم شدت	
زمان تمرین (دقیقه)	۶ دقیقه	۴ دقیقه	۲ دقیقه	۶ دقیقه
شدت تمرین ($VO2_{max}$)	۵۰ تا ۶۰ درصد	۹۰ تا ۱۰۰ درصد	۵۰ تا ۶۰ درصد	۵۰ تا ۶۰ درصد

شیب تردمیل در طول تمامی مراحل تمرین صفر درجه بود.

با توجه به عدم دسترسی به ابزار مستقیم مانند دستگاه تجزیه و تحلیل‌گر گازهای تنفسی با توجه به پژوهش‌های انجام شده اخیر توسط Hoydal و همکارانش(۲۲)، پروتکل غیرمستقیم ولی با دقت زیاد به شرح زیر مورد استفاده قرار گرفت: در ابتدا ۱۰ دقیقه گرم کردن با سرعت پایین (۱۰ متر بر دقیقه) انجام گرفت. بعد از گرم شدن، آزمون با دویدن رت‌ها با سرعت ۱۵ متر در دقیقه به مدت دو دقیقه شروع و سپس سرعت نوار گردان هر دو دقیقه یک بار به میزان ۰/۰۳ متر بر ثانیه (۱/۸ تا ۲ متر بر دقیقه) افزایش یافت تا حیوانات، دیگر قادر به دویدن نبودند. این سرعت به عنوان ۱۰۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی در نظر گرفته شد و حداکثر اکسیژن مصرفی کم تر، به عنوان درصدی از این شدت محاسبه شد(۲۶).

اندازه گیری بیان ژن

استخراج RNA توسط کیت مخصوص و با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد که از ۸۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بافت قلب استفاده شد (Total RNA Extraction Kit, Yekta Tajhiz Azma, Cat No: YT9065). ساخت cDNA نیز با استفاده از کیت مخصوص و با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت (Yekta Tajhiz Azma, Cat No: YT4509). cDNA ساخته شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا برای واکنش‌های Real- time PCR مورد استفاده قرار گیرد. Real- time PCR به‌وسیله دستگاه کربت[1] انجام گرفت. برای اندازه‌گیری هر ژن یک میلی لیتر مستر سایبرگرین (SRBR Green Master Mix, Yekta Tajhiz Azma, Cat No: YT2551) را با پنج میکرولیتر آب RNAse Free مخلوط و یک میکرولیتر آغازگر رفت[2] و یک میکرولیتر آغازگر برگشت[3] به همراه یک میکرولیتر از cDNA اضافه شد. سپس تیوپ‌ها در

1. Corbet
2. Forward
3. Reverse

دستگاه Real-time PCR با برنامه شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای پنج دقیقه و پس از آن ۳۰-۴۵ بار در یک برنامه ۹۰ درجه سانتی‌گرادی به مدت پنج ثانیه و به دنبال آن در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه قرار گرفتند.

جدول شماره ۲: آغازگرهای اختصاصی استفاده شده در مرحله ریل تایم (Real- time PCR)

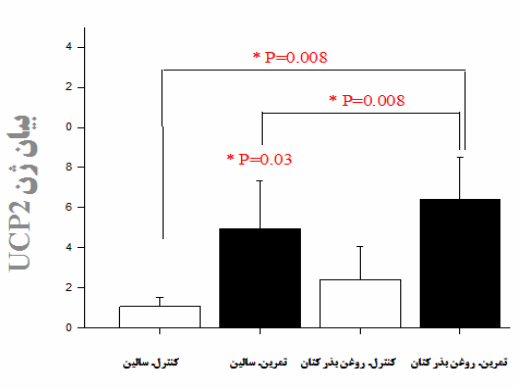
نام	آغازگر رفت	آغازگر برگشت
eNOS	TATTTGATGCTCGGGACTGC	AAGATTGCCTCGGTTTGTTG
UCP2	GCATTGGGCTCTACGACTCT	CTGGAAGCGGACCTTTACC
UCP3	GCAGCCTGTTTTGCTGCTCT	GGTTCTCCCCTTGGATGTG
ITGAL	TATCGGCAATGAGCGGTTCC	AGCACTGTGTTGGCATAGAGG

تعیین کمیت Real-time به وسیله اندازه‌گیری افزایش تشعشع فلورسنس، در نتیجه اتصال رنگ سایبرگرین به DNA دو رشته‌ای در انتهای هر چرخه تکثیر انجام شد. در انتهای PCR، عمل گسستن رشته‌های DNA و ایجاد منحنی ذوب به وسیله حرارت دادن آهسته نمونه‌ها از ۷۲ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ثبت مستمر کاهش در فلورسنس در نتیجه افتراق دو رشته DNA انجام شد. چرخه آستانه (CT) که در آن افزایش فلورسنس ثبت شده در حد بیش تر از خط پایه برای اولین بار قابل تشخیص می‌شود، برای هر یک از نمونه‌ها تعیین شد. مقدار eNOS mRNA، UCP2 و UCP3 با استفاده از روش پافل محاسبه شد(۲۳).

برای دسته‌بندی و تعیین شاخص‌های پراکندگی از آمار توصیفی استفاده شد. با توجه به تعداد آزمودنی در هر گروه آمار ناپارامتریک استفاده شد. برای بررسی تغییرات بین گروه‌ها از آزمون کروسکال – والیس (Kruskal–Wallis) استفاده شد. برای تشخیص معنی‌داری بین کدام دو گروه نیز از آزمون من- ویتنی (Mann-Whitney) استفاده شد. سطح معنی‌داری p<۰/۰۵ در نظر گرفته شد و کلیه محاسبات با نرم افزار آماری SPSS19 انجام شد.

یافته ها

استفاده از آزمون کروسکال والیس نشان داد تفاوت معنی داری بین گروه های پژوهش در مورد ژن UCP2 وجود داشت (p= ۰/۰۱). استفاده از آزمون تعقیبی من ویتنی نشان داد تمرین به طور معنی‌داری باعث افزایش بیان ژن UCP2 نسبت به گروه کنترل شده است (p= ۰/۰۳). هم‌چنین تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل با تمرین مکمل (p= ۰/۰۰۸) و تمرین با تمرین مکمل (p= ۰/۰۰۸) وجود داشت. بیان ژن UCP2 در گروه تعاملی بیش تر از کنترل و تمرین بود (نمودار شماره ۱).

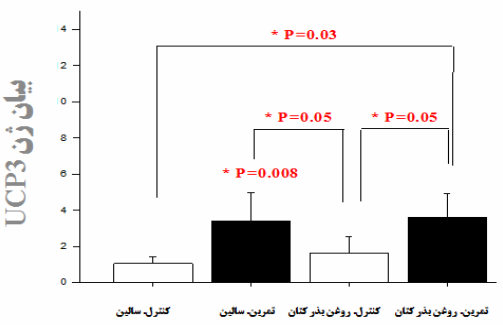


نمودار شماره ۱: بیان ژن UCP2 در گروه های مختلف پژوهش (میانگین ± انحراف استاندارد)

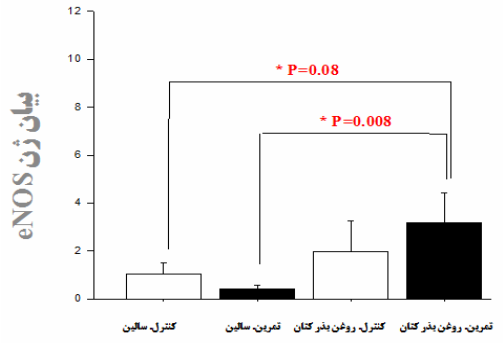
در مورد UCP3، استفاده از آزمون کروسکال والیس نشان داد اختلاف معنی داری بین گروه‌های پژوهش وجود دارد (p= ۰/۰۱). استفاده از آزمون تعقیبی من ویتنی نشان داد تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل و تمرین وجود دارد (p= ۰/۰۰۸). تمرین به طور معنی‌داری باعث افزایش بیان ژن UCP3 نسبت به گروه کنترل شد. بیان ژن UCP3 در گروه تمرین (p= ۰/۰۵) و تعاملی (p= ۰/۰۵) به طور معنی داری بالاتر از مکمل بود. هم چنین در گروه تعاملی به طور معنی‌داری بیش‌تر از کنترل بود (p= ۰/۰۳). (نمودار شماره ۲).

استفاده از آزمون کروسکال والیس نشان داد تفاوت معنی داری بین گروه های پژوهش در مورد eNOS

وجود داشت (p= ۰/۰۱). استفاده از آزمون تعقیبی من ویتنی نشان داد بین گروه کنترل و تعامل تمرین و مکمل تفاوت معنی داری وجود داشت (p= ۰/۰۰۸). گروه تعاملی بیان ژن eNOS بیش تری را نسبت به کنترل نشان دادند. هم چنین بیان ژن eNOS در گروه تعاملی از گروه تمرین بیش تر بود (p= ۰/۰۰۸) (نمودار شماره ۳).



نمودار شماره ۲: بیان ژن UCP3 در گروه های مختلف پژوهش (میانگین±انحراف استاندارد)



نمودار شماره ۳: بیان ژن eNOS در گروه های مختلف پژوهش (میانگین ± انحراف استاندارد)

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تمرین HIIT باعث افزایش بیان ژن UCP2 و UCP3 نسبت به گروه کنترل شده است و تعامل تمرین و مکمل باعث افزایش بیان ژن UCP2 نسبت به گروه های کنترل و تمرین شده است. از سوی دیگر تعامل تمرین- مکمل باعث افزایش بیش‌تر بیان ژن UCP3 نسبت گروه‌های مکمل شد و بیان ژن eNOS در گروه تعاملی نسبت به گروه‌های کنترل و تمرین بالاتر بود. تاکنون مطالعاتی که به بررسی اثر تمرین بر بیان ژن های UCP2 و UCP3 پرداخته اند، نتایج متناقضی را گزارش کرده اند. برخی از آن‌ها افزایش بیان این ژن ها و برخی کاهش بیان این ژن ها در اثر فعالیت بدنی را نشان داده اند.

Bo و همکاران(۲۴) در پژوهشی نشان دادند بعد از شش هفته تمرین ورزشی، اعمال یک دوره کوتاه مدت و حاد ورزش باعث افزایش چهار برابری در میزان بیان UCP2 نسبت به سطح استراحت در میوکارد می‌شود که این افزایش در گروه بدون تمرین ورزشی بیش‌تر بود. البته این افزایش گذرا بوده و بعد از ۹۰ دقیقه در هر دو گروه به سطح استراحت برگشت. پژوهش‌های دیگری نیز افزایش بیان UCP3 mRNA پس از فعالیت بدنی حاد را نشان داده اند(۲۵، ۲۶). در مقابل Boss و همکاران در تحقیقی نشان دادند که تمرین استقامتی در موش‌های صحرایی موجب کاهش بیان ژن UCP3 گردید(۲۷).

فلاحی و همکاران به بررسی یک دوره ۸ هفته ای و یک مرحله حاد تمرین HIIT روی UCP2 و UCP3 قلب موش‌های صحرایی پرداخت. آن ها افزایش بیان UCP3 را به دنبال مرحله حاد گزارش کردند. هم چنین گزارش کردند که بیان ژن UCP2 و UCP3 پس از یک دوره HIIT کاهش یافته است(۱۳). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که UPCs در پاسخ به ۱۰ هفته تمرین تناوبی شدید افزایش یافته است. در یک جمع بندی از مطالب بالا به نظر می‌رسد پاسخ بیان UCPs ها مربوط به نوع فعالیت ورزشی نمی‌شود چرا که در مطالعه حاضر و مطالعه فلاحی و همکاران هر دو از HIIT استفاده شده بود، بلکه احتمالاً شدت فعالیت است که بر بیان ژن آن ها نقش دارد. فلاحی و همکاران اظهار داشتند سازگاری با تمرین باعث کاهش بیان UCPs شده است، چنانچه افزایش بیان UCP3 را پس از فعالیت حاد نشان دادند. Boss و همکاران پیشنهاد می‌کنند کارآمدی متابولیک بالاتر همراه با کاهش بیان پروتئین‌های

Uncoupling در عضلات اسکلتی و قلب می‌باشد که باعث کاهش در اتلاف انرژی در این بافت‌ها می‌گردد. از طرفی کاهش بیان ژن پروتئین های UCP2 و UCP3 ممکن است هم‌چنین به بازیافت سریع وزن بعد از آن که تمرین ورزشی متوقف می‌شود کمک نماید(۲۷).

Bo و همکاران در پژوهشی نشان دادند بعد از شش هفته تمرین ورزشی، اعمال یک دوره کوتاه مدت و حاد ورزش باعث افزایش چهار بربری در میزان بیان UCP2 نسبت به سطح استراحت در میوکارد می‌شود که این افزایش در گروه بدون تمرین ورزشی بیش‌تر بود. البته این افزایش گذرا بوده و بعد از ۹۰ دقیقه در هر دو گروه به سطح استراحت برگشت. این محققین نتیجه‌گیری کردند که افزایش بیان UCP2 ممکن است قسمتی از پاسخ اولیه دفاع آنتی‌اکسیدانی با هدف کاهش استرس اکسیداتیو میتوکندری و حفظ عملکرد تنفسی باشد(۲۴). تنظیم افزایشی بیان UCP2 یک مکانیسم مهم برای کاهش تولید رادیکال‌های آزاد از طریق زنجیره انتقال الکترون است که در طی مراحل اولیه ورزش به وجود می‌آید. این مطالعه هم‌چنین اثبات می‌کند تمرین استقامتی برای شش هفته افزایش بیان ژن UCP2 القا شده توسط ورزش حاد را در قلب موش صحرایی کاهش می‌دهد که محققیق دلیل این موضوع را بالابودن فعالیت MnSOD در قلب موش صحرایی تحت تمرین مزمن ورزشی نسبت دادند که باعث حذف قسمتی از یون سوپراکساید به عنوان تحریک‌کننده بالقوه UCP2 می‌شود. بنابراین به‌نظر می‌رسد پروتکل HIIT در پژوهش حاضر به شکلی بوده که پس از ده هفته در رت ها باعث سازگاری نشده بوده و احتمالا به خاطر عواملی چون بالا بودن مقدار رادیکال‌های آزاد که البته در پژوهش حاضر اندازه‌گیری نشده است، موجب افزایش در بیان UCPs شده است. یافته‌های پژوهش حاضر افزایش بیان UCPs را در گروه‌های مصرف کننده مکمل بذر کتان نشان داد. در مورد تاثیر روغن کتان بر بیان ژن UCPs تاکنون مطالعه‌ای انجام نشده است. اما از آن جایی که بیش‌ترین اسیدچرب تشکیل دهنده این روغن، امگا ۳ می‌باشد، به بررسی تاثیر امگا ۳ بر بیان ژن UCPs می‌پردازیم. پژوهشگران نشان دادند رت هایی که با امگا ۳ مکمل سازی شده بودند بیان ژن بیش تری از UCP3 را نشان دادند(۲۸). در مطالعه ای که روی ۳۴۴ رت انجام شد یافته ها نشان داد رت هایی که با روغن ماهی مکمل سازی شدند بیان ژن بیش تری از UCP3 را نسبت به رت هایی نشان دادند که با روغن ذرت مکمل سازی شده بودند(۲۹).

یافته های پژوهش حاضر نشان داد eNOS در گروه تعاملی افزایش معنی‌داری یافته است. در سال‌های اخیر در مورد مکانیسم های موثر بر eNOS مطالعاتی صورت گرفته است. مطالعات نشان داده اند که رادیکال های آزاد (ROS) که در شرایط مختلفی مانند فعالیت بدنی به وجود می‌آیند می تواند باعث کاهش eNOS و متعاقبا کاهش NO و افزایش پراکسید نیترات شود(۳۰، ۳۱). بنابراین با کاهش NO التهاب عروقی و بیماری قلبی عروقی به وجود خواهد آمد. eNOS در پژوهش حاضر در اثر تمرین تغییر معنی‌داری نداشته است اما متمایل به کاهش بوده است. اما افزایش اثر آن در گروه تعاملی احتمالا بازتاب اثرات مفید روغن کتان می‌باشد که البته در گروه روغن نیز به طور غیر معنی دار متمایل به افزایش بوده است. در مورد تاثیر روغن کتان بر بیان ژن eNOS تاکنون مطالعه ای انجام نشده است. اما برخی مکانیسم‌های تاثیر امگا ۳ بر بیان ژن eNOS موجود می‌باشد. تاثیر امگا ۳ روی سلول های اندوتلیال به وسیله اتصال آن به غشای زیستی فسفولیپیدها اتفاق می‌افتد. سلول‌های اندوتلیال حفره غشایی[1] دارد که چندین گیرنده پیام در آن وجود دارد(۳۲). حفره غشایی سیگنال‌های مختلفی مانند مسیر نیتریک اکساید cGMP، NADPH اکسیداز، سیکلواکسیژناز (COX-2) و پروستاگلاندین E2 را میانجیگری می‌کند(۳۳). امگا ۳

1. Caveolae

ممکن است با تغییر ترکیب‌بندی حفره غشایی اثرات مفید خود را مانند افزایش تولید NO و کاهش میانجی‌های پیش‌التهابی بگذارد. شواهد علمی وجود دارد که نشان می‌دهد بیان ژن و فعالیت eNOS به دنبال مصرف امگا ۳ از طریق این مکانیسم افزایش یافته است(۳۴). اما مکانیسم دیگری وجود دارد که نشان می‌دهد امگا ۳ مستقیما روی بیان ژن و پروتئین eNOS اثر می گذارد که به وسیله چندین مطالعه تایید شده است(۳۵).

در مجموع این‌گونه نتیجه‌گیری می‌شود که تمرین جسمانی تناوبی شدید (HIIT) علیرغم تمام فواید تایید شده قبلی (۳۶، ۳۷)، باعث افزایش بیان ژن‌های UCPs شده است که این افزایش احتمالاً به دلیل مقابله با شدت بالای فعالیت (تولید ROS) بوده است. هم‌چنین استفاده از روغن بذر کتان نیز به باعث افزایش بیان ژن UCPs شده است و تعامل تمرین و روغن کتان باعث افزایش بیان ژن UCPs و eNOS شده است که اشاره به خواص قلبی عروقی روغن بذر کتان دارد که با فعالیت اثر هم‌افزایی داشته است.

References

1. Loos RJ, Bouchard C. Obesity: is it a genetic disorder? J Int Med 2003; 254(5): 401-25.
2. Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, et al. The human obesity gene map: the 2005 update. Obesity (Silver Spring) 2006; 14(4): 529-644.
3. Oelkrug R, Polymeropoulos ET, Jastroch M. Brown adipose tissue: physiological function and evolutionary significance. J Comp Physiol B 2015; 185(6): 587-606.
4. Clapham JC, Arch JR, Chapman H, Haynes A, Lister C, Moore GB, et al. Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. Nature 2000; 406(6794): 415-418.
5. Trenker M, Malli R, Fertschai I, Levak-Frank S, Graier WF. Uncoupling proteins 2 and 3 are fundamental for mitochondrial Ca2+ uniport. Nat Cell Biol 2007; 9(4): 445-452.
6. Tousoulis D, Kampoli AM, Tentolouris C, Papageorgiou N, Stefanadis C. The role of nitric oxide on endothelial function. Curr Vasc Pharmacol 2012; 10(1): 4-18.
7. Balligand JL, Feron O, Dessy C. eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. Physiol Rev 2009; 89(2): 481-534.
8. Kim DH, Kim SH, Kim WH, Moon CR. The effects of treadmill exercise on expression of UCP-2 of brown adipose tissue and TNF-alpha of soleus muscle in obese Zucker rats. J Exerc Nutrition Biochem 2013; 17(4): 199-207.
9. Zhou M, Lin BZ, Coughlin S, Vallega G, Pilch PF. UCP-3 expression in skeletal muscle: effects of exercise, hypoxia, and AMP-activated protein kinase. Am J Physiol Endocrinol Metab 2000; 279(3): E622-629.
10. Noland RC, Hickner RC, Jimenez-Linan M, Vidal-Puig A, Zheng D, Dohm GL, et al. Acute endurance exercise increases skeletal muscle uncoupling protein-3 gene expression in untrained but not trained humans. Metabolism 2003; 52(2): 152-158.
11. Rezende TM, Sponton CH, Malagrino PA, Bezerra MA, Penteado CF, Zanesco A. Effect of exercise training on the cardiovascular and biochemical parameters in women with eNOS gene polymorphism. Arch Physiol Biochem 2011; 117(5): 265-269.

12. Ramirez-Velez R, Bustamante J, Czerniczyniec A, Aguilar de Plata AC, Lores-Arnaiz S. Effect of exercise training on eNOS expression, NO production and oxygen metabolism in human placenta. PLoS One 2013; 8(11):e80225.
13. Fallahi AA, Shekarfroush S, Rahimi M, Jalali A,Khoshbaten A. Alteration in cardiac uncoupling proteins and eNOS gene expression following high-intensity interval training in favor of increasing mechanical efficiency. Iran J Basic Med Sci 2016; 19(3): 258-264 (Persian).
14. Kakilashvili B, Zurabashvili DZ, Turabelidze DG, Shanidze LA, Parulava GK. The fatty acid composition of ordinary flax seed oil (Linum usitatissimum L.) cultivated in Georgia and its byological activity. Georgian Med News 2014; (227): 86-88.
15. Kargar R, Forouzanfar M, Ghalamkari G, Nasr Esfahani MH. Dietary flax seed oil and/or vitamin E improve sperm parameters of cloned goats following freezing-thawing. Cryobiology 2016; 74: 110-114.
16. Devarshi PP, Jangale NM, Ghule AE, Bodhankar SL, Harsulkar AM. Beneficial effects of flaxseed oil and fish oil diet are through modulation of different hepatic genes involved in lipid metabolism in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. Genes Nutr 2013; 8(3): 329-342.
17. Cassani RS, Fassini PG, Silvah JH, Lima CM, Marchini JS. Retraction Note: Impact of weight loss diet associated with flaxseed on inflammatory markers in men with cardiovascular risk factors: a clinical study. Nutr J 2016; 15(1): 59.
18. Mirfatahi M, Tabibi H, Nasrollahi A, Hedayati M. Effects of Flaxseed Oil on Serum Lipids and Lipoproteins in Hemodialysis Patients: a Randomized Controlled Trial. Iran J Kidney Dis 2016; 10(6): 405-412 (Persian).
19. Lee P, Prasad K. Effects of flaxseed oil on serum lipids and atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. J Cardiovasc Pharmacol Ther 2003; 8(3): 227-235.
20. Ren GY, Chen CY, Chen GC, Chen WG, Pan A, Pan CW, et al. Effect of Flaxseed Intervention on Inflammatory Marker C-Reactive Protein: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. Nutrients 2016; 8(3): 136.
21. Shafiee A, kordi M, Gaeini A, Soleimani M, Nekouei A, Hadidi V. The Effect of Eight Week of High Intensity Interval Training on Expression of Mir-210 and EphrinA3 Mrna in Soleus Muscle Healthy Male Rats. Arak Med Univ J 2014; 17(3): 26-34 (Persian).
22. Hoydal MA, Wisloff U, Kemi OJ, Ellingsen O. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil 2007; 14(6): 753-760.
23. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 2001; 29(9): e45.
24. Bo H, Jiang N, Ma G, Qu J, Zhang G, Cao D, et al. Regulation of mitochondrial uncoupling respiration during exercise in rat heart: role of reactive oxygen species (ROS) and uncoupling protein 2. Free Radic Biol Med 2008; 44(7): 1373-1381.
25. Rahmati-Ahmadabad S, Shirvani H, Sobhani V. Long Term Effect of High Intensity Interval Training and Flaxseed Oil Supplementation on the Expression of Genes Involved in Reverse Cholesterol Transport in Male Rats. JMP 2018; 4(64): 59-75.
26. Pilegaard H, Saltin B, Neufer PD. Effect of short-

term fasting and refeeding on transcriptional regulation of metabolic genes in human skeletal muscle. Diabetes 2003; 52(3): 657-662.

27. Boss O, Samec S, Desplanches D, Mayet MH, Seydoux J, Muzzin P, et al. Effect of endurance training on mRNA expression of uncoupling proteins 1, 2, and 3 in the rat. FASEB J 1998; 12(3): 335-339.
28. Lopez D, Orta X, Casos K, Saiz MP, Puig-Parellada P, Farriol M, et al. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase in rat aorta after ingestion of fish oil-rich diet. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2004; 287(2): H567-H572.
29. Schrauwen P, Hesselink MK, Vaartjes I, Kornips E, Saris WH, Giacobino JP, et al. Effect of acute exercise on uncoupling protein 3 is a fat metabolism-mediated effect. Am J Physiol Endocrinol Metab 2002; 282(1): E11-E17.
30. Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. Circulation 2006; 113(13): 1708-1714.
31. Shirvani H, Arabzadeh E. Metabolic cross-talk between skeletal muscle and adipose tissue in high-intensity interval training vs. moderate-intensity continuous training by regulation of PGC-1α. Eat Weight Disorde 2018 Feb 26:1-8.
32. Williams JJ, Palmer TM. Cavin-1: caveolae-dependent signalling and cardiovascular disease. Biochem Soc Trans 2014; 42(2): 284-288.
33. Ramadoss J, Pastore MB, Magness RR. Endothelial caveolar subcellular domain regulation of endothelial nitric oxide synthase. Clin Exp Pharmacol Physiol 2013; 40(11): 753-764.
34. Stebbins CL, Stice JP, Hart CM, Mbai FN, Knowlton AA. Effects of dietary decosahexaenoic acid (DHA) on eNOS in human coronary artery endothelial cells. J Cardiovasc Pharmacol Ther 2008; 13(4): 261-268.
35. Gortan Cappellari G, Losurdo P, Mazzucco S, Panizon E, Jevnicar M, Macaluso L, et al. Treatment with n-3 polyunsaturated fatty acids reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in experimental menopause. J Nutr Biochem 2013; 24(1): 371-379.
36. Shirvani H, Aslani J. The effects of high-intensity interval training vs. moderate-intensity continuous training on serum irisin and expression of skeletal muscle PGC-1α gene in male rats. Tehran Univ Med J 2017; 75(7): 513-520 (Persian).
37. Shirvani H, TaheriChadorneshin H, Sarir H, Aslani J. Neuroprotective effects of voluntary wheel running and eriobotrya japonica flower extract on Parkinsonian rats. J Kerman Univ Med Sci 2017;24(4):289-297.