

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

Hossein Shirvani<sup>1</sup>,  
Saleh Rahmati-Ahmadabad<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Assistant Professor, Exercise Physiology Research Center, Life Style Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>2</sup> 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 VO<sub>2</sub>max. 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 training 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

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

حسین شیروانی<sup>۱</sup>  
صالح رحمتی احمدآباد<sup>۲</sup>

### 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، به صورت 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 ( $p=0/03$ ). بیان ژن UCP2 در گروه تعاملی بیش‌تر از کنترل ( $p=0/008$ ) و تمرین ( $p=0/008$ ) بود. در مورد UCP3، تمرین به طور معنی‌داری باعث افزایش بیان ژن UCP3 نسبت به گروه کنترل شد. بیان ژن UCP3 در گروه تمرین ( $p=0/05$ ) و تعاملی ( $p=0/05$ ) به طور معنی‌داری بالاتر از مکمل بود. هم‌چنین در گروه تعاملی به طور معنی‌داری بیش‌تر از کنترل بود ( $p=0/03$ ). 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 ( $p=0/008$ ).

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

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

### مقدمه

مشغول کرده است. زندگی مدرن و ماشینی که با سبک زندگی غیرفعال توأم شده است، باعث به وجود آمدن

بهبود سلامت و جلوگیری بیماری در انسان از جمله موضوعاتی است که ذهن پژوهشگران را به خود

Email: Shirvani@bmsu.ac.ir

**مؤلف مسئول:** حسین شیروانی: تهران: دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران

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 تصویب: ۱۳۹۶/۸/۲۷

تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۶/۳/۱۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۲۴

می‌شود (۶، ۷). بنابراین پیشگیری کننده قوی برای مقابله با بیماری‌های قلبی عروقی می‌باشد. تاکنون پژوهش‌های بسیاری در مورد تاثیر فعالیت‌های بدنی و مکمل‌های گیاهی بر عوامل مربوط به چاقی (پپتیدهای اشتهاپی) و بیماری‌های قلبی عروقی (ژن‌های درگیر در فرآیند انتقال معکوس کلسترول، غلظت لیپیدها و لیوپروتئین‌های پلاسما) شده است. آن‌ها به خوبی نشان داده‌اند 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 مکمل‌های طبیعی ممکن است باعث تغییراتی شود که تاکنون در مطالعه‌ای 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 آلفالیولینیک 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) پرداخته‌اند. مطالعات نشان داده‌اند استفاده از مکمل کتان می‌تواند باعث کاهش تری‌گلیسرید (۱۸)، افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۱۹) و کاهش التهاب (۱۷، ۲۰) شود. به هر حال تاکنون مطالعه‌ای به بررسی اثر این روغن بر بیان

چاقی و تشدید بیماری‌های قلبی عروقی شده است. بنا بر 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، گرمایی 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

انجام شد<sup>۱</sup> و کلیه اصول اخلاقی در مورد نحوه کار با حیوانات آزمایشگاهی از جمله در دسترس بودن آب و غذا، شرایط نگهداری مناسب و عدم اجبار و بدرفتاری در تمرینات مد نظر قرار گرفت. مطالعه حاضر با اجازه نامه کتبی از معاونت تحقیقات و فن آوری دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) انجام گرفت. پنج روز پس از آخرین جلسه تمرین، رت ها با ترکیبی از زایلین و کتامین بیهوش شدند (۲۵)، خونگیری از قلب انجام و بافت قلب براشته شد. سپس به دو قسمت تقسیم و با سالین سرد شسته شد، در تیوب مخصوص قرار گرفت و با نیتروژن مایع منجمد گردید. نمونه ها در فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد تا زمان ارسال به آزمایشگاه نگهداری شدند.

دانه تازه کتان از مناطق رویش آن در شهرستان مهریز واقع در استان یزد جمع آوری شد و روغن آن با استفاده از دستگاه روغن گیری استخراج شد و پس از تایید توسط گروه تغذیه (آزمایشگاه کنترل کیفی) دانشگاه بقیه الله (عج) بر اساس وزن موش با دوز ۳۰ mg/kg به گروه های مربوطه خورانده شد (۲۵) و برای یکسان سازی اثر گاوآژ به گروه های دیگر سالین خورانده شد.

در این پژوهش، رت ها پس از انتقال به مرکز حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله به مدت سه روز برای سازگاری با محیط نگهداری شدند. آشناسازی رت ها با پروتکل ورزشی تناوبی شدید با ۱۰ جلسه تمرین در دو هفته انجام شد، به این صورت که در روز اول تمرین، رت ها با نهایت دقت و آرامش روی تردمیل قرار گرفتند و با سرعت بسیار پایین و یکنواخت شروع به تمرین کردند و در جلسات بعد که رت ها به خوبی و همگام با برنامه پیش آمدند، جهت آشنایی با پروتکل تناوبی مورد نظر با سرعت های کم از تمرین تناوبی استفاده شد تا رت ها به نوع تمرین عادت کنند و با پروتکل آشنا شدند (۲۶). طی دو هفته زمان تمرین نیز افزایش یافت تا در پایان دو هفته، رت ها به زمان واقعی

ژن های UCP2، UCP3 و eNOS پرداخته است. مطالعات پیشین نشان داده است مصرف امگا ۳ و مواد دارای امگا ۳ مانند روغن ماهی باعث افزایش بیان ژن UCP3 را می شود (۲۰، ۲۱). هم چنین مطالعات پیشین نشان می دهند بیان ژن و فعالیت eNOS نیز پس از مصرف امگا ۳ افزایش می یابد (۲۲، ۲۳). از این جهت ممکن است بذر کتان نیز به علت اسیدچرب فراوان امگا ۳ بتواند باعث تغییراتی در بیان ژن های مورد نظر شود که نیاز به بررسی دارد. هم چنین تعامل مکمل و تمرین ممکن است باعث افزایش اثر تمرین، کاهش اثر تمرین یا عدم تغییر در بیان ژن های مورد نظر شود که تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته است. بنابراین هدف از پژوهش حاضر، بررسی تاثیر یک دوره طولانی مدت (ده هفته ای) فعالیت HIIT و مکمل سازی روغن بذر کتان بر بیان ژن های UCP2، UCP3 و eNOS در موش های نر می باشد.

## مواد و روش ها

آزمودنی های پژوهش حاضر را موش های صحرایی بالغ نر از نژاد ویستار تشکیل دادند. حیوانات که به صورت تصادفی انتخاب شده بودند، در حیوان خانه دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله با دمای  $22 \pm 2$  درجه سانتی گراد، رطوبت ۵۰-۴۵ درصد و چرخه تاریکی روشنایی (۱۲ ساعت نورف ۱۲ ساعت تاریکی) در قفس های مخصوص از جنس PVC با درپوش فلزی که کف آن ها با تراشه های تمیز چوب پوشانده شده بود، نگهداری شدند. از غذای فشرده مخصوص موش صحرایی آزمایشگاهی ساخت شرکت بهپرور کرج و آب تصفیه شده شهری در بطری های ۵۰۰ میلی لیتری به صورت آزاد برای تغذیه حیوانات استفاده شد (۲۵). رت ها، به صورت تصادفی به چهار گروه (پنج سر در هر گروه) شامل کنترل سالین، تمرین سالین، کنترل+ روغن بذر کتان و تمرین+ روغن بذر کتان تقسیم شدند. این مطالعه بر اساس اصول مراقبت از حیوانات آزمایشگاهی

1. NIH-Publication

با توجه به عدم دسترسی به ابزار مستقیم مانند دستگاه تجزیه و تحلیل 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 میلی گرم 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 سانتی گراد نگهداری شد تا برای واکنش‌های Real-time PCR مورد استفاده قرار گیرد. Real-time PCR به وسیله دستگاه کربت<sup>۱</sup> انجام گرفت. برای اندازه گیری هر ژن یک میلی لیتر مستر سایبر گرین (SRBR Green Master Mix, Yekta) (Tajhiz Azma, Cat No: YT2551) را با پنج میکرولیتر آب RNase Free مخلوط و یک میکرولیتر آغازگر رفت<sup>۲</sup> و یک میکرولیتر آغازگر برگشت<sup>۳</sup> به همراه یک میکرولیتر از cDNA اضافه شد. سپس تیوپ‌ها در

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 هوایی (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 اندازه گیری شد و رت‌ها بر طبق پروتکل تمرینی که بر اساس درصدی از حداکثر اکسیژن مصرفی (که به متر بر دقیقه تبدیل می گردید)، 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  $VO_{2max}$  روی نوارگردان مخصوص جوندگان، رأس ساعت ۱۸:۰۰ بود؛ انجام دادند و در همین زمان، گروه کنترل برای یکسان سازی 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)

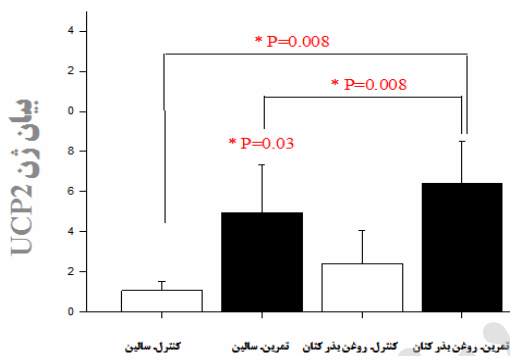
مراحل تمرین مؤلفه تمرین	بدنه اصلی تمرین (۳ تناوب)		گرم کردن	مراحل تمرین مؤلفه تمرین (دقیقه)
	تناوب کم شدت	تناوب شدید		
زمان تمرین (دقیقه)	۲ دقیقه	۴ دقیقه	۶ دقیقه	۶ دقیقه
شدت تمرین ( $VO_{2max}$ )	۶۰ تا ۶۵ درصد	۱۰۰ تا ۹۰ درصد	۶۰ تا ۵۰ درصد	

شیب تردمیل در طول تمامی مراحل تمرین صفر درجه بود.

1. Corbet  
2. Forward  
3. Reverse

## یافته ها

استفاده از آزمون کروسکال والیس نشان داد تفاوت معنی داری بین گروه های پژوهش در مورد ژن UCP2 وجود داشت ( $p=0/01$ ). استفاده از آزمون تعقیبی من ویتنی نشان داد تمرین به طور معنی داری باعث افزایش بیان ژن UCP2 نسبت به گروه کنترل شده است ( $p=0/03$ ). هم چنین تفاوت معنی داری بین گروه کنترل با تمرین مکمل ( $p=0/008$ ) و تمرین با تمرین مکمل ( $p=0/008$ ) 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 گروه های پژوهش وجود دارد ( $p=0/01$ ). استفاده از آزمون تعقیبی من ویتنی نشان داد تفاوت معنی داری بین گروه کنترل و تمرین وجود دارد ( $p=0/008$ ). تمرین به طور معنی داری باعث افزایش بیان ژن UCP3 نسبت به گروه کنترل شد. بیان ژن UCP3 در گروه تمرین ( $p=0/05$ ) و تعاملی ( $p=0/05$ ) به طور معنی داری بالاتر از مکمل بود. هم چنین در گروه تعاملی به طور معنی داری بیش تر از کنترل بود ( $p=0/03$ ). (نمودار شماره ۲).

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

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

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

نام	آغاز گرفت	آغازگر برگشت
eNOS	TATTTGATGCTCGGAGCTGC	AAGATTGCCTCGGTTTGTTG
UCP2	GCATTGGGCTCTACGACTCT	CTGGAAGCGGACCTTACC
UCP3	GCAGCTGTTTGTCTGCTCT	GGTTCCTCCCTTGGATGTG
ITGAL	TATCGCAATGAGCGGTTCC	AGCACTGTGTGGCATAGAGG

تعیین کمیت Real-time به وسیله اندازه گیری افزایش تشعشع فلورسنس، در نتیجه اتصال رنگ سایبرگرین به DNA دو رشته ای در انتهای هر چرخه تکثیر انجام شد. در انتهای PCR، عمل گسستن رشته های DNA و ایجاد منحنی ذوب به وسیله حرارت دادن آهسته نمونه ها از ۷۲ تا ۹۵ درجه سانتی گراد 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 می شود، برای هر یک از نمونه ها تعیین شد. مقدار eNOS mRNA و UCP2 و UCP3 با استفاده از روش پافل محاسبه شد (۲۳).

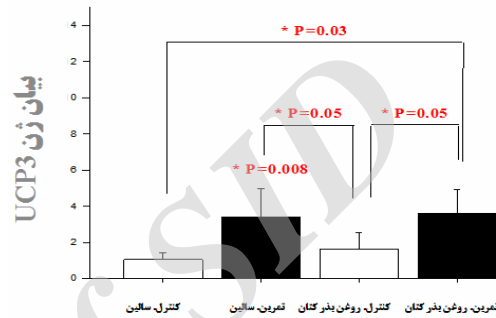
برای دسته بندی و تعیین شاخص های پراکنندگی از آمار توصیفی استفاده شد. با توجه به تعداد آزمودنی در هر گروه آمار ناپارامتریک استفاده شد. برای بررسی تغییرات بین گروه ها از آزمون کروسکال - والیس (Kruskal-Wallis) استفاده شد. برای تشخیص معنی داری بین کدام دو گروه نیز از آزمون من - ویتنی (Mann-Whitney) استفاده شد. سطح معنی داری  $p < 0/05$  در نظر گرفته شد و کلیه محاسبات با نرم افزار آماری SPSS19 انجام شد.

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 ژن‌ها و برخی کاهش بیان این ژن‌ها در اثر فعالیت بدنی را نشان داده اند.

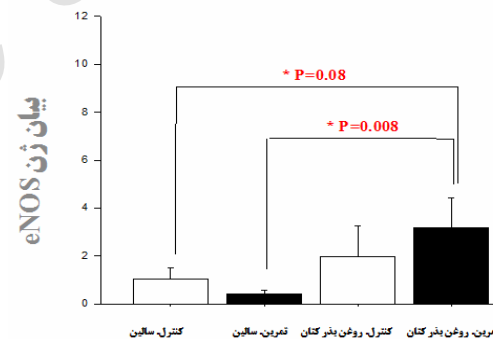
Bo و همکاران (۲۴) در پژوهشی نشان دادند بعد از شش هفته تمرین ورزشی، اعمال یک دوره کوتاه مدت و حاد ورزش باعث افزایش چهار برابری در میزان بیان UCP2 نسبت به سطح استراحت در میوکارد می‌شود که این افزایش در گروه بدون تمرین ورزشی بیش تر بود. البته این افزایش گذرا بوده و بعد از ۹۰ دقیقه در هر دو گروه به سطح استراحت 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 هفته‌ای و یک مرحله حاد تمرین HIIT روی UCP2 و UCP3 قلب موش‌های صحرایی پرداخت. آن‌ها 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 آن‌ها 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

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 گروه‌های مختلف پژوهش (میانگین ± انحراف استاندارد)



نمودار شماره ۳: بیان ژن eNOS در گروه‌های 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 گروه‌های کنترل و تمرین شده است. از سوی دیگر تعامل تمرین-مکمل باعث افزایش بیش تر بیان ژن UCP3 نسبت به گروه‌های مکمل شد و

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 رت‌هایی 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 یافته‌ها نشان داد رت‌هایی که با روغن ماهی مکمل سازی شدند بیان ژن بیش تری از UCP3 را نسبت به رت‌هایی نشان دادند که با روغن ذرت مکمل سازی شده بودند (۲۹).

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد eNOS در گروه تعاملی افزایش معنی‌داری یافته است. در سال‌های اخیر در مورد مکانیسم‌های موثر بر eNOS مطالعاتی صورت گرفته است. مطالعات نشان داده‌اند که رادیکال‌های آزاد (ROS) که در شرایط مختلفی مانند فعالیت بدنی به وجود می‌آیند می‌تواند باعث کاهش eNOS و متعاقباً 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 احتمالاً 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 مطالعه‌ای انجام نشده است. اما برخی مکانیسم‌های تاثیر امگا ۳ بر بیان ژن eNOS موجود می‌باشد. تاثیر امگا ۳ روی سلول‌های اندوتلیال به وسیله اتصال آن به غشای زیستی فسفولیپیدها اتفاق می‌افتد. سلول‌های اندوتلیال حفره غشایی<sup>۱</sup> 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

Uncoupling در عضلات اسکلتی و قلب می‌باشد که باعث کاهش در اتلاف انرژی در این بافت‌ها می‌گردد. از طرفی کاهش بیان ژن پروتئین‌های 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 موش‌ها می‌شود که این افزایش در گروه بدون تمرین ورزشی بیش تر 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 صحرائی کاهش می‌دهد که محققین دلیل این موضوع را بالابودن فعالیت MnSOD در قلب موش صحرائی تحت تمرین مزمن ورزشی نسبت دادند که باعث حذف قسمتی از یون سوپراکساید به عنوان تحریک کننده بالقوه UCP2 می‌شود. بنابراین به نظر می‌رسد پروتکل HIIT در پژوهش حاضر به شکلی بوده که پس از ده هفته در رت‌ها باعث سازگاری نشده بوده و احتمالاً 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

1. Caveolae



جسمانی تناوبی شدید (HIIT) علیرغم تمام فواید تایید شده قلبی (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.

ممکن است با تغییر ترکیب‌بندی حفره غشایی اثرات مفید خود را مانند افزایش تولید NO و کاهش میانجی‌های پیش‌تهابی 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 مستقیماً روی بیان ژن و پروتئین eNOS اثر می‌گذارد که به وسیله چندین مطالعه تایید شده است (۳۵). در مجموع این‌گونه نتیجه‌گیری می‌شود که تمرین

## References

- Loos RJ, Bouchard C. Obesity: is it a genetic disorder? *J Int Med* 2003; 254(5): 401-25.
- 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.
- Oelkrug R, Polymeropoulos ET, Jastroch M. Brown adipose tissue: physiological function and evolutionary significance. *J Comp Physiol B* 2015; 185(6): 587-606.
- 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.
- Trenker M, Malli R, Fertschai I, Levak-Frank S, Graier WF. Uncoupling proteins 2 and 3 are fundamental for mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniport. *Nat Cell Biol* 2007; 9(4): 445-452.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Rezende TM, Sponton CH, Malagrino PA, Bezerra MA, Penteadó 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, Shandize LA, Parulava GK. The fatty acid composition of ordinary flax seed oil (*Linum usitatissimum* L.) cultivated in Georgia and its biological 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-1 $\alpha$ . *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-1 $\alpha$  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 eribotrya japonica flower extract on Parkinsonian rats. *J Kerman Univ Med Sci* 2017;24(4):289-297.