

اثر تمرین هوازی و آدنوزین بر بیان *SREBP-1C* و گیرنده *A1* کبدی در موش‌های صحرایی تغذیه شده با غذای پرچرب

ابوالحسن هدایتی کتولی^۱، محمدعلی آذربایجانی^۲، عبدالعلی بنائی فر^۳، سجاد ارشدی^۴

۱- دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب، تهران، ایران

۲- نویسنده مسئول: استاد گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران، پست الکترونیک: m_azarbayjani@iauctb.ac.ir

۳- دانشیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب، تهران، ایران

۴- استادیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران جنوب، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۷/۶/۱۵

تاریخ پذیرش: ۹۷/۹/۱۸

چکیده

سابقه و هدف: مطالعات اندکی به بررسی اثر تزریق آدنوزین بر گیرنده‌ها و مسیر پایین دست آن در متابولیسم چربی کبد پرداخته‌اند. هدف از مطالعه حاضر، بررسی نوع تمرین هوازی و آدنوزین بر بیان *SREBP-1c* (sterol regulatory binding protein 1c) و گیرنده *A1* (Adenosine receptor) کبد موش‌های صحرایی تغذیه شده با غذای پرچرب بود.

مواد و روش‌ها: ۴۰ سر موش صحرایی به صورت تصادفی به ۸ گروه کنترل نرمال، غذای پرچرب، غذای پرچرب + تزریق دارو نما، غذای پرچرب + تزریق آدنوزین، غذای پرچرب - تمرین HIIT (+High-intensity interval training) تزریق آدنوزین، غذای پرچرب - تمرین HIIT + تزریق دارونما، غذای پرچرب- تمرین استقامتی + تزریق آدنوزین، غذای پرچرب - تمرین استقامتی + تزریق دارونما تقسیم شدند. آزمودنی‌ها در مرحله اول ۱۳ هفته غذای پرچرب دریافت نمودند و در مرحله دوم به مدت ۱۲ هفته، هفته ای ۵ جلسه به تمرین پرداختند، جهت تحلیل داده‌ها در گروه‌های غذایی از آزمون تحلیل یک راهه واریانس مستقل و تعیین اثر تمرین و آدنوزین از تحیل دو راهه واریانس استفاده شد. جهت بررسی بیان ژن‌ها از روش Real time PCR استفاده شد.

یافته‌ها: ژن *SREBP1-c* و *A1* به ترتیب در گروه‌های غذای پرچرب ($P=0/016$)، ($P=0/019$) افزایش معنی‌داری داشتند، تمرین اینتروال شدید و استقامتی اثر معنی‌دار بر کاهش بیان ژن *SREBP1-c* و *A1* ($P=0/003$) و ($P=0/001$) داشتند. *SREBP1-c* و *A1* در گروه تزریق آدنوزین کاهش معنی‌داری ($P=0/004$)، ($P=0/002$) داشتند. تعامل تمرین استقامتی- آدنوزین کاهش معنی‌داری ($P=0/004$) از تمرین اینتروال شدید- آدنوزین ($P=0/019$) بر بیان *A1* داشت.

نتیجه‌گیری: صرف نظر از شدت تمرین به عنوان یک فاکتور مؤثر بر بیان ژن‌های لیپوژنز، دوز مصرفی آدنوزین همراه با کاهش گیرنده آن (*A1*) بدنال غذای پرچرب احتمالاً نقش مؤثری بر بیان ژن‌های لیپوژنتیک دارند.

واژگان کلیدی: تمرین هوازی، تمرین تناوبی شدید (HIIT)، *SREBP1-c*، گیرنده آدنوزین-*A1*، غذای پرچرب

• مقدمه

چرب غیر الکلی می‌شوند. در پستانداران کبد ارگان اصلی تنظیم کننده متابولیسم گلوکز و چربی است (۲). در این راستا، لیپوژنز کبد توسط تعدادی از فاکتورهای رونویسی از جمله *SREBP* (sterol regulatory element binding protein) تنظیم می‌شود (۳). خانواده *SREBP* شامل سه ایزوفرم می‌باشد، *SREBP-1c* فاکتور اصلی تنظیم کننده ژن‌های

منشأ شیوع بیماری‌های مزمن متابولیکی مانند هیپر لیپیدمی، دیابت و چاقی در دهه‌های اخیر در سرتاسر جهان افزایش یافته است، این اختلالات دلایل پیچیده ای شامل عوامل ژنتیکی، محیطی و تغذیه ای دارند (۱). بارگیری بلند مدت رژیم غذایی پرچرب و دی نو لیپوژنز ناشی از بارگیری کربوهیدرات موجب چاقی، مقاومت به انسولین و افزایش کبد

عملکردهای بافتی را از طریق فعال نمودن ۴ گیرنده پروتئینی متصل به پروتئین G تنظیم می‌کند (۱۹). گیرنده‌های آدنوزین به مهار کننده‌ها (A1, A3) یا فعال کننده‌ها (A2a, A2b) آدنیلات سیکلاز طبقه‌بندی می‌شوند (۲۰). بیان شده است، که فعالیت گیرنده A1 در بافت چربی اثر ضد لیپولیتیکی داشته و موجب کاهش سطوح اسید چرب در گردش می‌شود. طوریکه پیشنهاد شده است که اثرات مفیدی در درمان دیس لیپیدمی و دیابت نوع دو دارد (۲۱). اخیراً، گزارش شده است که فعال شدن گیرنده A1 آدنوزین فعالیت فاکتور رونویسی SREBP-1c را تنظیم می‌کند (۲۱). در حال حاضر مطالعات اندکی به بررسی اثر تزریق آدنوزین بر گیرنده‌ها و مسیر پایین دست آن در متابولیسم چربی کبد پرداخته‌اند. از این رو، مطالعه حاضر بدنبال بررسی اثرات نوع و شدت تمرین هوازی به عنوان عامل غیر دارویی همراه با آدنوزین بر بیان ژن لیپوژنیک گیرنده A1 و SREBP-1c می‌باشد.

• مواد و روش‌ها

آزمودنی‌ها: ۴۰ سر موش صحرایی ۵-۴ هفته‌ای با میانگین وزن اولیه 32 ± 128 گرم از انستیتو پاستور آمل خریداری شدند و طی دوره یک هفته‌ای آشنایی با محیط جدید، آشنایی با نوارگردان و همچنین دوره اجرای پروتکل در قالب گروه‌های ۵ سر موش در قفس‌های پلی کربنات شفاف به طول ۳۰، عرض و ارتفاع ۱۵ سانتی متر و در محیطی با دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد، رطوبت هوای 55 ± 5 درصد و چرخه تاریکی به روشنایی ۱۲:۱۲ ساعته با تهویه مناسب نگهداری شدند. پروتکل این مطالعه در کمیته اخلاق در پژوهش پژوهشگاه تربیت بدنی و علوم ورزشی، طبق منشور و موازین اخلاق پژوهش وزارت علوم تحقیقات و فناوری با کد اخلاق

IR.SSRI.REC.1395.115 مورد تأیید قرار گرفت

تغذیه آزمودنی‌ها: غذای آزمودنی‌ها، تولید شرکت دام‌به‌پرور کرج بود. به ازای هر ۱۰۰ گرم از وزن هر موش ۵ گرم غذا بر اساس وزن کشتی هر هفته یک بار، در قفس قرار داده شد. در این پژوهش آب مورد نیاز حیوان به صورت آزاد در بطری ۵۰۰ میلی لیتری ویژه حیوانات آزمایشگاهی در اختیار آن‌ها قرار گرفت. جیره غذایی گروه نرمال حاوی ۳٪ چربی (روغن سویا)، ۱۷٪ پروتئین کازئین، ۶۸٪ کربوهیدرات، ۸٪ مواد معدنی و ۱٪ ویتامین‌ها می‌شد. ترکیبات جیره غذایی پر چرب نیز ۲۰٪ چربی حیوانی (دمبه) و ۲۰٪ روغن سویا، ۱۳٪ پروتئین شامل (کازئین و سفیده تخم مرغ) و ۴۷٪ کربوهیدرات شامل (گندم- ذرت- جو) تهیه شد (۲۲) و طی ۱۳ هفته تمامی ۲۰ سر موش صحرایی از این رژیم استفاده کردند و پس از رسیدن

لیپوژن کبد است که در سنتز تری گلیسرید (TG) دخالت دارد (۴). علاوه بر موارد ذکر شده عدم فعالیت بدنی نیز یکی از فاکتور اصلی مرتبط با چاقی است (۵). تمرین ورزشی آنزیم‌های لیپوژنیک و بیان ژن‌های دی نو لیپوژن مانند SREBP-1c و Fatty acid synthase (FAS) را کاهش می‌دهد و دسترسی به اسیدهای چرب زنجیره بلند برای سنتز تری گلیسرید را تنظیم می‌کند (۶). نشان داده شده است که نوع و شدت فعالیت بدنی اثرات متفاوتی را بر متابولیسم انرژی ایفا می‌کنند (۷). فعالیت‌های ورزشی هوازی مانند پیاده روی، دوچرخه سواری صرف نظر از مکان، روش‌های کم هزینه درمانی هستند (۷) که با شدت پایین تا متوسط با زمان حداقل ۳۰ دقیقه و ۵ جلسه در هفته به منظور کاهش خطرات متابولیکی انجام می‌شوند (۸). هر چند، اغلب مردم به طور منظم قادر نیستند این برنامه‌ها را اجرا نمایند (۹). از این رو، نیاز به یک برنامه ورزشی مناسب می‌باشد. تمرینات هوازی شدید در مقایسه با تمرینات هوازی با شدت کم مزایای سودمندی را بر فاکتورهای خطرزای مهم متابولیسمی دارند (۱۰). اخیراً، تمرین اینتروال با شدت بالا به عنوان عامل اثرگذار بر سلامتی و اکسیداسیون چربی مورد توجه قرار گرفته است (۱۱). بنابر مطالعات انجام گرفته، شدت فعالیت ورزشی در مقابل حجم فعالیت عاملی مؤثرتر بر بهبود بیماری‌های متابولیکی می‌باشد (۱۲). تمرینات شدید (High-intensity interval training) به لحاظ زمانی جایگزینی مؤثر جهت برنامه‌های ورزشی سنتی هستند که عمدتاً شامل تمرینات با شدت کم، متوسط و مدت زمان طولانی می‌باشد، همچنین بیان شده که این نوع تمرین بر کاهش وزن اثر گذار می‌باشد (۱۳، ۱۴). در تعداد مطالعات اندکی، گزارش شده است که تمرین HIIT سطوح SREBP-1c کبدی را در مدل‌های حیوانی کاهش داده است (۱۵). از طرفی فعالیت دارویی یا مهاری تنظیم کننده SREBP-1c کبد و هیپرلیپیدمی پلاسمایی تا حدودی از طریق گیرنده‌های آدنوزین مورد تأیید قرار گرفته است (۱۶). آدنوزین تقریباً از تمام بافت‌ها و اندام‌های حاضر پستانداران ترشح می‌شود. افزایش غلظت آدنوزین ناشی از افزایش خروج آدنوزین، کاهش جذب آدنوزین و یا انتشار سلولی آدنین نوکلئوتیدها به خارج سلول می‌باشد، طوری که در خارج سلول به آدنوزین دی فسفریله می‌شوند (۱۷). تعداد زیادی از مطالعات نشان دادند، مقادیر بالاتر آدنوزین خارج سلولی از آدنین نوکلئوتیدهای رها شده از سلول‌ها مشتق می‌شود (۱۸). آدنوزین یک مولکول کلیدی سیگنالینگ خارج سلولی است که چندین جنبه از

شدت ۸۵٪ تا ۹۰٪ v_{max} (۲۵) معادل ۷ تلاش ۱ دقیقه ای و سرعت ۳۱ متر بر دقیقه و استراحت فعال بین اینتروال‌ها با ۶ تلاش و سرعت ۱۵ متر بر دقیقه در هفته ی اول انجام شد، که تدریجاً با افزایش متوسط ۲ متر بر دقیقه در هفته به ۱۰ تلاش ۱ دقیقه ای با سرعت ۵۵ متر بر دقیقه و استراحت فعال با ۹ تلاش ۱ دقیقه‌ای بین اینتروال‌ها با سرعت ۲۵ متر بر دقیقه در هفته ی ۱۲ رسید. لام به ذکر است مرحله گرم کردن با شدت ۴۰ تا ۵۰ درصد حداکثر سرعت و به مدت ۱۰ تا ۲۰ دقیقه و مرحله سرد کردن نیز به مدت ۱ دقیقه با شدت ۱۵ متر بر دقیقه و ۲ دقیقه با شدت ۱۰ متر بر دقیقه انجام گرفت.

استخراج mRNA و ساخت cDNA: RNA با استفاده از کیت Qiagen RNeasy Mini Kit شرکت استخراج گردید. سپس cDNA توسط کیت Quantitect Reverse Transcription Kit cDNA synthesis شرکت Qiagen از RNA ساخته شد و تا انجام Real Time PCR در دمای ۸۰- نگهداری شد. برای اندازه‌گیری میزان بیان ژنی از دستگاه Thermal Cycler™ (C1000) ساخت شرکت BIO RAD استفاده شد. برنامه زمانی - گرمایی دستگاه در سه مرحله انجام شد. مرحله اول که منجر به دناتوره شدن مولکول‌های DNA و فعال شدن آنزیم پلی مراز می‌گردد به صورت ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، مرحله دوم ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای ۴۵ سیکل متوالی و مرحله ی نهایی جهت ترسیم منحنی تفکیک (Dissociation Curve) یا منحنی ذوب به صورت ۵۵ تا ۹۵ درجه سانتی گراد، با افزایش نیم درجه در مدت ۵ ثانیه انجام شد. واکنش‌های Real-Time PCR در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر در پلیت‌های ۹۶ چاهکی انجام شدند. در مطالعه ی حاضر از ماده ای با رنگ فلوئورسنت سبز به نام SYBR-Green استفاده شد که قادر است در میان شیار کوچک مولکول DNA دو رشته ای قرار گرفته و نور فلوئورسنت منتشر کند. میزان تولید نور فلوئورسنت نسبت مستقیم با میزان تولید محصول PCR دارد. برای ژن‌های مورد مطالعه آغازگرهای اختصاصی طراحی گردید و توسط شرکت سیناکلون (Sinaclon) سنتز شد و پس از رقیق سازی بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده مورد استفاده قرار گرفت.

روش اندازه‌گیری بیان ژن‌ها: در مطالعه حاضر، جهت سنجش تعداد کپی‌های ژن‌های هدف و مرجع از روش مقایسه‌ای سیکل آستانه استفاده شد. این روش برای آنالیز بیان نسبی ژن‌ها بطور گسترده استفاده می‌شود. در این روش

به معیارهای چاقی، مرحله ی تمرین با رعایت رژیم غذایی پر چرب ادامه پیدا کرد.

گروه‌های تمرینی: پیش از شروع هر گونه مداخله، ۴۰ رت جهت دریافت رژیم غذایی پر چرب به استثنای گروه کنترل غذای نرمال، به صورت تصادفی و همچنین از طریق همسان سازی وزنی در ۸ گروه قرار گرفتند. آزمودنی‌ها طی یک مطالعه ی دو مرحله ای (مرحله ی چاق کردن و تمرین) به مدت ۱۳ هفته رژیم غذایی پرچرب با ۴۰٪ چربی دریافت کردند. سپس، گروه‌های پژوهش در مرحله ی دوم تمرین به مدت ۱۲ هفته به ۸ گروه کنترل و تجربی به شرح ذیل: ۱- کنترل رژیم غذایی نرمال ۲- کنترل غذای پر چرب ۳- غذای پرچرب و تزریق آدنوزین ۴- غذای پرچرب و تزریق دارو نما ۵- رژیم غذایی پرچرب و تمرین HIIT با تزریق آدنوزین ۶- رژیم غذایی پر چرب و تمرین HIIT با تزریق دارونما ۷- رژیم غذایی پر چرب و تمرین استقامتی با تزریق آدنوزین ۸- رژیم غذایی پر چرب و تمرین استقامتی با تزریق دارونما تقسیم شدند.

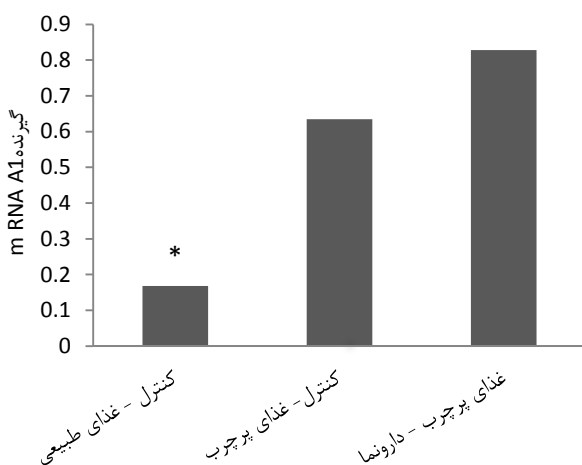
مقدار دوز آدنوزین مصرفی موش‌ها: گروه‌های تمرین- آدنوزین و کنترل - آدنوزین، آدنوزین را به مقدار ۰/۲ میلی گرم به ازای ۱ کیلوگرم به مدت دوازده هفته (هفت روز در هفته) به صورت زیر صفاقی ۳ ساعت قبل از تمرین دریافت کردند. گروه دارونما نیز به مقدار و روش مشابه با گروه‌های دریافت کننده آدنوزین، سرم فیزیولوژی دریافت نمودند.

پروتکل تمرینات هوازی: آزمودنی‌های گروه تمرینی قبل از شروع برنامه ورزشی اصلی به مدت یک هفته تمرین با سرعت‌های (۱۰، ۸، ۶ متر بر دقیقه) را به عنوان مرحله آشنایی با نوارگردان انجام دادند. سپس آزمودنی‌های گروه تمرینی به اجرای دوازده هفته تمرین پرداختند. گروه‌های تمرین در هر هفته ۵ روز تمرین نمودند. در این پژوهش ملاک واماندگی دستیابی به حداکثر سرعت قرار گرفت. سرعت نوار گردان هر دو دقیقه یکبار به میزان ۱/۸ تا ۲ متر بر دقیقه جهت رسیدن به حد واماندگی در طی تمرین افزایش یافت. پس از به دست آوردن میانگین حداکثر سرعت در تمامی رت‌های گروه‌های تمرینی ۶۵ درصد حداکثر سرعت برای گروه‌های تمرینات استقامتی و ۸۵ درصد حداکثر سرعت برای گروه‌های تمرین شدید تناوبی در شروع کار ثبت شد (۲۳، ۲۴). تمرین استقامتی با شدت متوسط با سرعت ۲۰ متر بر دقیقه و مدت زمان ۱۵ متر بر دقیقه در هفته ی اول شروع شد که تدریجاً به سرعت ۲۵ متر بر دقیقه و زمان ۳۱ دقیقه در هفته ۱۲ رسید. پروتکل تمرین شدید تناوبی با

جهت تعیین اثر گذاری دریافت غذای پرچرب بر پیامدهای مورد مطالعه ابتدا گروه‌های کنترل غذای طبیعی، کنترل دریافت کننده غذای پرچرب و کنترل دریافت کننده غذای پرچرب- دارونما با استفاده از تحلیل یک راهه واریانس برای گروه‌های مستقل مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. در صورت مشاهده تفاوت معنی‌دار از آزمون پیگیری توکی برای تعیین محل تفاوت بین گروه‌ها استفاده شد. سپس جهت تعیین اثر اصلی تمرین، اثر اصلی آدنوزین و تعامل تمرین × آدنوزین از تحلیل دوره‌ها واریانس برای گروه‌های مستقل استفاده شد. سطح معنی‌داری برای تمام محاسبات $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

• یافته‌ها

اثر غذای پر چرب و دارونما بر بیان ژن A1 بافت کبد: بیان ژن A1 در گروه کنترل غذای طبیعی کاهش معنی‌داری از گروه‌های کنترل غذای پرچرب ($P=0.019$) و غذای پرچرب دارونما ($P=0.017$) داشت. همچنین بیان ژن A1 در گروه کنترل تغذیه با گروه دارونما از تفاوت معنی‌دار برخوردار نبود ($P=0.616$) (شکل ۱).



شکل ۱. سطح بیان ژن A1 در گروه‌های غذایی

اثر نوع تمرین هوازی و آدنوزین بر بیان ژن A1 بافت کبد رت‌های نر تغذیه شده با غذای پر چرب: تمرین اثر معنی‌داری بر بیان ژن A1 کبد داشت ($P=0.0001$). دریافت آدنوزین نیز اثر معنی‌داری بر بیان ژن A1 کبدی داشت ($P=0.002$). تعامل تمرین و آدنوزین نیز اثر معنی‌داری بر بیان ژن A1 کبد داشت ($P=0.0001$). بیان ژن A1 در پایان دوره در گروه تمرین اینتروال شدید از گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت ($P=0.001$). و همچنین بیان ژن A1 در

فرض بر این است که هم ژن مورد نظر و هم ژن رفرنس با کارایی نزدیک به ۱۰۰ درصد (با ۵ درصد اختلاف یعنی از 100 ± 5) درون دستگاه PCR تکثیر می‌شوند. پیش از استفاده از روش $-\Delta\Delta CT$ لازم است که فرض ۱۰۰ درصد بودن کارایی دستگاه برای ژن‌های مورد نظر و ژن رفرنس تعیین شود که این کار با رسم منحنی استاندارد مشخص می‌شود. اگر معلوم شد که ژن‌های مورد نظر و ژن رفرنس با کارایی نزدیک به ۱۰۰ درصد تکثیر می‌شوند، می‌توان با استفاده از فرمول‌های زیر تفاوت در بیان ژن‌های مورد نظر و ژن رفرنس را تعیین کرد.

پس از تعیین CT هر ژن، CT ژن رفرنس از CT ژن هدف کم شده و ΔCT به دست آمد.

$$(\Delta CT = CT_{\text{target gene}} - CT_{\text{references gene}})$$

در ادامه ΔCT نمونه‌های گروه کنترل سالین را که در این مطالعه به عنوان کالیبراتور در نظر گرفته شده است از ΔCT نمونه‌های گروه تیمار کم شده تا $\Delta\Delta CT$ حاصل گردد:

$$\Delta\Delta CT = (CT_{\text{target gene}} - CT_{\text{references gene}})_{\text{treatment group}} - (CT_{\text{target gene}} - CT_{\text{references gene}})_{\text{calibrator group}}$$

در نهایت میزان $2^{-\Delta\Delta CT}$ با نسبت ژن هدف به ژن مرجع برابر است با:

برای هر یک از نمونه‌ها چرخه آستانه (Ct) در دستگاه Real Time PCR تعیین شد. بیان ژن GAP.DH به عنوان بیان ژن رفرنس استفاده شد. برای اندازه‌گیری بیان ژن‌ها از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده شد. پرایمر:

Adenosine Receptor1 (A1)

Forward: GTGCTTCATCGTGTCCTGG

Adenosine Receptor1 (A1)

Reverse: GCAGGTGTGGAAGTAGGTCT

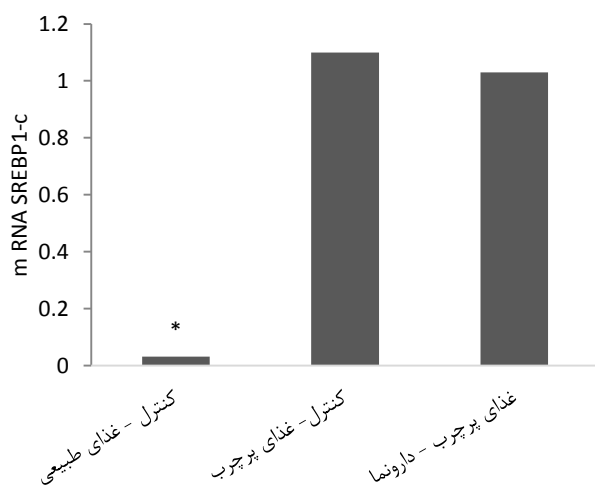
SREBP1-c Forward: GGAGCCATGGATTGCACATT

SREBP1-c Reverse: GCCCGGGAAGTCACTGT

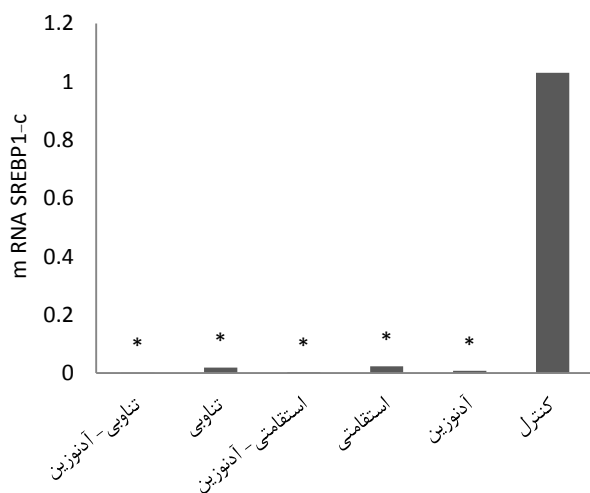
اندازه‌گیری وزن موش‌ها: وزن موش‌ها به وسیله ترازوی دیجیتال با حساسیت ۰/۰۱ گرم اندازه‌گیری شد. موش‌ها هر سه روز یک بار وزن می‌شدند

تجزیه و تحلیل آماری: تمام داده‌ها در اشکال، جداول و متن بر اساس میانگین و انحراف استاندارد گزارش شده است.

معنی‌داری در گروه تمرین اینتروال شدید نسبت به گروه کنترل ($P=0/003$) داشت، همچنین بیان ژن SREBP1-c در پایان دوره به طور کاهش معنی‌داری در گروه دریافت کننده آدنوزین از گروه کنترل ($P=0/004$) داشت. در اینجا اثر تمرین اینتروال شدید به تنهایی با اثر آدنوزین $0/027$ که اثر تعاملی تمرین اینتروال شدید آدنوزین $0/014$ است. برای تمرین استقامتی و آدنوزین نیز جمع اثر تک تک آنها $0/031$ است، در حالی که مقادیر به دست آمده از تعامل این دو $0/004$ بود، که نتیجه‌گیری می‌شود تعامل معنی‌دار و دارای اثر آنتاگونیستی می‌باشد. یعنی همزمانی این دو مداخله نسبت به جمع اثر تک تک هر یک اثر کاهنده بر بیان ژن پروتئین SREBP1-c داشته است. پس همزمانی تمرین با آدنوزین کاهش معنی‌داری بر بیان ژن پروتئین SREBP1-c دارد (شکل ۴).

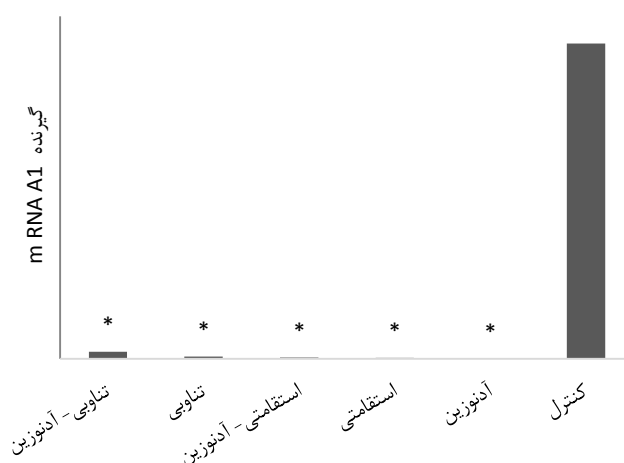


شکل ۳. سطح بیان ژن SREBP1-c در گروه‌های غذایی



شکل ۴. مقایسه میانگین SREBP1-c در گروه‌های تمرینی و آدنوزین

پایان دوره کاهش معنی‌داری در گروه دریافت کننده آدنوزین از گروه کنترل ($P=0/002$) داشت. در اینجا اثر تمرین اینتروال شدید به تنهایی با اثر آدنوزین $0/0066$ بود که اثر تعاملی تمرین اینتروال شدید آدنوزین $0/019$ است. برای تمرین استقامتی و آدنوزین نیز جمع اثر تک تک آنها $0/0036$ شده است، در حالی که مقادیر به دست آمده از تعامل این دو $0/004$ بود، که نتیجه‌گیری می‌شود تعامل معنی‌دار و دارای اثر سینرژیستی می‌باشد. یعنی همزمانی این دو مداخله نسبت به جمع اثر تک تک هر یک اثر کاهنده بر بیان ژن پروتئین A1 داشته است. پس همزمانی تمرین به ویژه تمرین استقامتی با آدنوزین اثر فزاینده بر بیان ژن پروتئین A1 دارد (شکل ۲).



شکل ۲. مقایسه میانگین A1 در گروه‌های تمرینی و آدنوزین

اثرات نوع تمرین و آدنوزین بر بیان ژن SREBP1-C
اثر غذای پرچرب و دارونما بر بیان ژن SREBP1-c بافت کبد: نتایج آزمون پیگیری توکی نشان داد بیان ژن SREBP1-c در گروه کنترل غذای نرمال از گروه کنترل غذای پرچرب ($P=0/016$) و غذای پرچرب دارونما ($P=0/023$) کاهش معنی‌دارتری داشت. همچنین بیان ژن SREBP1-c در گروه کنترل غذای پرچرب با گروه دارونما از تفاوت معنی‌دار برخوردار نبود ($P=0/979$) بود (شکل ۳).

اثر نوع تمرین هوازی و آدنوزین بر بیان ژن SREBP1-c بافت کبد رت‌های نر تغذیه شده با غذای پرچرب: تمرین اثر معنی‌داری بر بیان ژن SREBP1-c کبدی دارد ($P=0/001$). دریافت آدنوزین نیز اثر معنی‌داری بر بیان ژن SREBP1-c کبدی داشت ($P=0/004$). تعامل تمرین و آدنوزین اثر معنی‌داری بر بیان ژن SREBP1-c کبدی دارد ($P=0/001$). بیان ژن SREBP1-c در پایان دوره کاهش

• بحث

گیرنده‌های A1 و SREBP-1C می‌شود (۲۷). که نسبت به مقدار آدنوزین طبیعی موجود در خون محیطی که از ۰٫۳ تا ۱ میکرومول گزارش شده بالاتر است. علاوه بر این نشان داده شده است که اضافه نمودن مقادیر پایین تر آدنوزین به فضای خارج سلولی از طریق گیرنده‌های ENT1 و CNT2 می‌توانند فعالیت AMPK را افزایش دهد (۳۲). که در مطالعه ما مقدار AMPK افزایش داشت (بیان نشد)، که این امر به نوبه خود موجب مهار و کاهش فعالیت مسیر لیپوژنز و بیان ژن SREBP-1C کبد می‌شود (۳۳)، مستقل از عادات غذایی خطر بیماری مزمن از طریق بی تحرکی افزایش و در افراد با تمرین بدنی منظم کاهش می‌یابد (۲۶). ما مشاهده کردیم که هر دو تمرین هوازی با شدت‌های متفاوت اثرات مشابه و کاهش معنی‌داری بر بیان ژن‌های SREBP-1C و گیرنده A1 کبدی دارند. تمرین HIIT به عنوان یک برنامه آموزشی کم حجم و با شدت بالا (۳۴) نشان داده است که سطوح SREBP-1C کبد را کاهش می‌دهد (۳۵). Oh و همکاران نشان دادند که ۱۲ هفته تمرین هوازی با شدت بالا موجب کاهش سطوح SREBP-1C در سلول‌های گردش خون محیطی می‌شود (۳۶). در مطالعه ای دیگر بیان شد که ۴ هفته تمرین با تردمیل در موش‌ها باعث افزایش قابل توجهی در اکسیداسیون لیپیدهای کبد می‌شود (۳۷). از این رو به نظر می‌رسد فعالیت ورزشی عمدتاً از طریق افزایش مسیر اکسیداسیون بویژه از طریق افزایش AMPK و کاهش تعداد گیرنده‌های A1 سطح کبد موجب سرکوب مسیر لیپوژنز کبد شود.

افزایش استفاده از غذاهای پرچرب و بی تحرکی به عنوان برخی از مشکلات ناشی از صنعتی شدن جوامع در طی دهه‌های اخیر موجب شیوع بیماری‌های متابولیکی از جمله کبد چرب غیر الکلی شده است. لذا، با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه، صرف نظر از شدت تمرین به عنوان یک فاکتور مؤثر بر کاهش بیان ژن‌های لیپوژنز اثر گذار بر کبد چرب غیر الکلی، دوز مصرفی آدنوزین همراه با افزایش یا کاهش گیرنده آن (A1) بدنال غذای پرچرب احتمالاً نقش مؤثری بر پیشگیری از این بیماری دارند. با عنایت به واکنش‌های ناشی از روش‌های تجربی در مطالعه و عدم دقیق کنترل گیرنده آدنوزین، جهت تعیین بهتر اثر آدنوزین بر گیرنده‌های آن در فعالیت‌های ورزشی پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده از آگونیست‌ها و آنتاگونیست‌های گیرنده A1 جهت تعیین اثر فعالیت بدنی استفاده شود.

هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر نوع فعالیت هوازی همراه با آدنوزین بر پارامترهای لیپوژنیک چربی کبدی در موش‌های صحرائی تغذیه شده با غذای پرچرب بود. تا کنون تحقیقات اندکی اثرات آدنوزین را بر مسیر لیپوژنز کبد مورد بررسی قرار دادند، به نظر می‌رسد لیپوژنز کبد ناشی از رژیم غذایی پرچرب توسط دو فاکتور رونویسی اصلی یعنی SREBP-1C و ChREBP (carbohydrate response element binding protein) که به ترتیب ناشی از انسولین، اسید چرب و کربوهیدرات هستند، تنظیم می‌شود (۲۶). نتایج ما افزایش معنی‌دار بیان ژن SREBP-1C و A1 را در سلول‌های کبد بدنال رژیم غذایی پرچرب نشان داد، که با مطالعه پنگ و همکاران که به بررسی سیگنالینگ آدنوزین ناشی از اتانول در بیماران کبد چرب پرداخته بودند، همسوء بود (۲۷). آنها اظهار نمودند مکانیسم بیوشیمیایی کبد چرب ناشی از اتانول که با افزایش آدنوزین خارج سلولی منجر می‌شود، حداقل تا حدی بواسطه میانجیگری گیرنده A1 است که موجب تنظیم ژن‌های درگیر در سنتز چربی مانند SREBP-1C می‌شود (۲۷). علاوه بر این، مکانیسم‌های دیگری نیز در افزایش بیان ژن‌های لیپوژنیک کبدی ناشی از اتانول شامل تحریک مستقیم ژن SREBP-1C توسط مکانیسم‌های درون سلولی (۲۸) افزایش بیان پروتئین و ژن SREBP-1C از طریق مهار فعالیت AMPK (AMP-activated protein kinase) و کاهش بیان و ترشح آدیپونکتین که به نوبه خود، بیان SREBP-1C را از طریق کاهش فعالیت AMPK تنظیم می‌کند مطرح شده‌اند (۲۹). در مطالعه حاضر این امر شاید ناشی از افزایش معنی‌دار بیان ژن گیرنده A1 کبد و یا هیپرلیپیدمی ناشی از رژیم غذایی پرچرب باشد که تحت اثر انسولین ژن SREBP-1C را فعال می‌نماید (۳۰). از سوی دیگر Yang و همکاران اظهار نمودند بیان ژن SREBP-1C کبدی بطور معنی‌داری وابسته به آگونیست گیرنده A1 سلول‌های هپاتوسیت نمی‌باشد. چرا که چندان مطالعه در گذشته نشان دادند که گیرنده A1 آدنوزین بصورت کمی در کبد بیان شده است و این نقش حداقلی را در تنظیم فرآیندهای لیپوژنیک توسط این گیرنده نشان می‌دهد (۳۱). مطالعه حاضر نشان داد که بیان ژن SREBP-1C کبد در گروه مصرف کننده آدنوزین نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت، که در وهله اول شاید به دلیل کاهش گیرنده A1 در این گروه و سپس به دوز مصرفی و مدت زمان مصرف آدنوزین اشاره داشته باشد، چرا که مصرف مزمن اتانول در بیماران کبد چرب الکلی موجب افزایش آدنوزین و تحریک

سیاسگزاری

جنوب تصویب و اجرا شده است. بدینوسیله از مرکز تحقیقات بنیادی علوم ورزشی و پزشکی شهید میرغنی که در این تحقیق با ما همکاری نمودند کمال تشکر را داریم.

این مقاله بخشی از پایانامه مقطع دکتری گرایش فیزیولوژی ورزش است که در دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران

• References

- Alejandra V, Contreras, Nimbe Torres, and Armando R. Tovar. PPAR-a as a Key Nutritional and Environmental Sensor for Metabolic Adaptation: American Society for Nutrition 2013; 4: 439-452.
- Dentin R, Girard J, Postic C. Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. *Biochimie* 2005; 87(1):81-86
- Berlanga A, Guiu-Jurado E, Porras JA, Auguet T. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Gastroenterol* 2014; 7: p. 221-39.
- Aragno M, et al. SREBP-1c in nonalcoholic fatty liver disease induced by Western-type high-fat diet plus fructose in rats. *Free radical biology and Medicine* 2009; 47 (7), 1067-1074.
- Booth FW, Roberts CK, Laye MJ. Lack of exercise is major cause of chronic disease: *Compr. Physical* 2012; 2: 1143-1211.
- Russ Fiebig Margaret A. Griffiths Mitchell T. Gore David H. Baker Lawrence Oscai Denise M. Ney, et al. Exercise Training Down-Regulates Hepatic Lipogenic Enzymes in Meal-Fed Rats: Fructose versus Complex-Carbohydrate Diets: *The Journal of Nutrition*. 1998; 128: 810-817
- Ryuki Hashida, Takumi Kawaguchi, Masafumi Bekki, Takuji Torimura. Aerobic versus resistance exercise in Non-alcoholic fatty liver Disease: A systematic review. *Hepatology* 2017; 66: 142-152
- Nalcakan GR. The effects of sprint interval vs. continuous endurance training on physiological and metabolic adaptations in young healthy adults. *Journal of human kinetics* 2014; 44 (1), 97-109.
- Horton J D, Goldstein J L, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 2002; 109, 1125-1131
- swain DP, Frank BA. Comparison of cardioprotective benefit of vigorous versus moderate intensity aerobic. *Am J Cardio* 2006; 97:141-7
- Talanian J.L, Galloway S.D, Heigenhauser G.J, Bonen A. and Spriet L.L. Two weeks of high-intensity aerobic interval training increases the capacity for fat oxidation during exercise in women. *J Appl Physiol* 2007; 102: 1439-1447
- Francois ME, Little JP. Effectiveness and safety of high-intensity interval training in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Spectr* 2015; Jan; 28(1): 39-44
- De Feo P. Is high-intensity exercise better than moderate-intensity exercise for weight loss? *Nutr. Metab. Cardiovas: Dis* 2013; 23: 1037-1042
- Tjonna AE, Lee SJ, Rognmo O, Stolen TO, Bye A, Haram PM, et al. Aerobic interval training versus continues moderate exercise as a treatment for the metabolic syndrome: a pilot study. *Circulation* 2008; 118: 346-354
- M. Ebrahimi, R. Fathi, Z. Ansari Pirsaraei, E. Talebi Garakani and M. Najafi. How high-fat diet and high-intensity interval training affect lipid metabolism in the liver and visceral adipose tissue of rats. *Comparative Exercise Physiology*, 2015; 14 (1) : 55 - 62 [in persian]
- Koupenova M, Ravid K. Adenosine, Adenosine Receptors and Their Role in Glucose Homeostasis and Lipid Metabolism: *J Cell Physiol*. 04 March 2013; volume 228, pages 1703-1712
- Zimmermann, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol* 2000; 362:299-309
- Picher M, Burch LH, Hirsh AJ, Spychala J, Boucher RC. Ecto 5'-nucleotidase and nonspecific alkaline phosphatase. Two AMP-hydrolyzing ectoenzymes with distinct roles in human airways. *J. Biol. Chem* 2003; 278:13468-13479.
- Luca Antonioli, Corrado Blandizzi, Balázs Csóka, Pál Pacher, György Haskó. Adenosine signalling in diabetes mellitus—pathophysiology and therapeutic considerations. *Nature Reviews Endocrinology* 2015; volume 11, pages 228-241
- Milka Koupenova, Hillary Johnston-Cox, Alexander Vezeridis, Haralambos Gavras, Dan Yang, Vassilis Zannis, et al. A2b Adenosine Receptor Regulates Hyperlipidemia and Atherosclerosis: *American Heart Association* 2012; 125:354-363
- Ming Yang, Ruth Chu, Jehbery w. Chisholm, Holger Doege, Luzi Belardineli, Arvinder K, Dhalla. Adenosine A1 receptor do not play a major role in the regulation of lipogenic gene expression in hepatocytes: *Eur. J. Pharmacology*, 2012; 683: 332-339
- Frank M Sacks, George A. Bary, Vincent j. Cary, Steven R. Smith, Donna H. Ryan, Stephen D. Anton, et al. Comparison of weight-loss Diet with Different composition of Fat, Protein, and Carbohydrate: *N Engl Med*, 2009; 360 (9): 859-873
- Leandr CG, Levada A C, Hirabara S M, Manhães-de-Castro R A program of moderate physical training for Wistar rats based on maximal oxygen consumption: *Journal of Strength and Conditioning Research*, 2007; 21(3), 751
- Bedford TG, Tipton CM, Wilson NC, Oppliger RA, Gisolfi C V. Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures. *Journal of Applied Physiology* 1979; 47(6), 1278-1283.
- Chavanelle V, Boisseau N, Otero YF, Combaret L, Dardevet D, Montaurier C et al. Effects of high-intensity interval training and moderate-intensity

- continuous training on glycaemic control and skeletal muscle mitochondrial function in db/db mice. *Sci Rep.* 2017; 7: 204
26. Sudha B, Biddinger, Katrine Almind, Makoto Miyazaki, Efi Kokkotou, James M. Ntambi, et al. Effects of Diet and Genetic Background on Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c, Stearoyl-CoA Desaturase 1, and the Development of the Metabolic Syndrome: *DIABETES* 2005; 54(5): 1314-1323.
 27. Peng Z, Pier Borea A, Wilder T, Yee H, Chiriboga L, Michael R, et al. Adenosine signaling contributes to ethanol-induced fatty liver in mice: *J. Clin. Invest* 2009; 119, 582-594
 28. Crabb DW, Liangpunsakul S. Alcohol and lipid metabolism. *J. Gastroenterol. Hepatol* 2006; 21 (Suppl. 3), S56-S60.
 29. Purohit V, Gao B, Song BJ. Molecular mechanisms of alcoholic fatty liver. *Alcohol. Clin. Exp. Res* 2009; 33, 191-205.
 30. Qin S, Yin J, Huang K. Free Fatty Acids Increase Intracellular Lipid Accumulation and Oxidative Stress by Modulating PPAR α and SREBP-1c in L-02 Cells. *Lipids.* 2016 Jul;51(7):797-805.
 31. Dixon AK, Gubitza AK, Sirinathsinghji DJ, Richardson PJ, Freeman TC. Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 1996 ;18, 1461-68
 32. Sylvie Duflo, Barbara Riera, Sonia Fernández-Veledo, Vicent Casadó, Robert I. Norman, F. Javier Casado, et al. ATP-sensitive K(+) channels regulate the concentrative adenosine transporter CNT2 following activation by A(1) adenosine receptors: *Mol. Cell. Biol* 2004; 24, 2710-2719.
 33. Cho J, Lee I, Kim D, Koh Y, Kong J, Lee S, Kang H. Effect of aerobic exercise training on non-alcoholic fatty liver disease induced by a high fat diet in C57BL/6 mice: *J Exerc Nutr. Biochem* 2014; 18(4):339-346
 34. Weston M, Taylor KL, Batterham AM, Hopkins WG. Effects of Low-Volume High-Intensity Interval Training (HIT) on Fitness in Adults: A Meta-Analysis of Controlled and Non-Controlled Trials. *Sports Med.* 2014;44(7):1005-17.
 35. Kalaki-Jouybari F, Shanaki M, Delfan M, Gorgani-Firouzjae S, Khakdan S. High-intensity interval training (HIIT) alleviated NAFLD feature via miR-122 induction in liver of high-fat high-fructose diet induced diabetic rats. *Arch Physiol Biochem.* 2018 Oct; 13:1-8
 36. Oh S, Shida T, Yamagishi K, Tanaka K, So R, Tsujimoto T, Shoda J. Moderate to vigorous physical activity volume is an important factor for managing nonalcoholic fatty liver disease: a retrospective study. *Hepatology.* 2015 Apr; 61(4):1205-15.
 37. Moon H, Song P, Choi C, Ryu S, Suh P. Involvement of exercise-induced macrophage migration inhibitory factor in the prevention of fatty liver disease. *Journal of Endocrinology* 2013; 218(3), 339-348.

The Effect of Aerobic Training and Adenosine on the Expression of SREBP-1C and A1 Receptor in Hepatic Fat-fed Rats

Hedayati katooli A¹, Azarbayjani M.A^{*2}, Banaeifar A³, Arshadi S⁴

1- Ph.D. student, Dept of Sport Physiology, South Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2- *Corresponding author: Professor, Dept. of Exercise Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
Email: m_azarbayjani@iauctb.ac.ir

3- Associate Prof., Dept of Sport Physiology, South Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

4- Assistant Prof., Dept of Sport Physiology, South Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Received 6 Sept, 2018

Accepted 9 Dec, 2018

Background and Objectives: Few studies have examined so far the effect of adenosine receptors' injection and its downstream pathway on the liver's fat metabolism. The aim of this study was to investigate the type of aerobic exercise and adenosine on the expression of sterol regulatory binding protein 1c SREBP-1c and the adenosine receptor A1 in the liver in the rats fed with high-fat foods.

Materials and Methods: Forty rats were randomly divided into eight groups: control of standard diet, high fat diet, high fat diet and placebo, high fat diet and Adenosine injection, high fat diet+high-intensity interval training (HIIT) and adenosine injection, high fat diet+HIIT and placebo, high fat diet+aerobic training and adenosine injection, high fat diet+aerobic training, and placebo. The subjects received 13 weeks of high-fat diet in the first stage. In the second stage, they trained for 12 weeks each week for 5 sessions. An analysis of one-way independent variance was used to analyze the data in the diet groups, and two-way analysis of variance was used to determine the effect of exercise interaction and adenosine. Real time PCR was used to determine the expression of genes.

Results: SREBP1-c and A1 gene increased significantly in fatty diet (P=0.016, and P=0.019, respectively), HIIT and aerobic training had a significant effect on the reduction of SREBP1-c and A1 gene expression (P=0.003, and P=0.001, respectively). SREBP1-c and A1 in the adenosine injection group had a significant decrease (P=0.004, and P=0.002, respectively). The interaction of endurance training-adenosine had a significant decrease in the expression of A1 (P=0.004) comparing to HIIT-Adenosine training (P=0.019).

Conclusion: Regardless of the intensity of exercise as an effective factor in the expression of lipogenesis genes, the adenosine dosage with increasing or decreasing its receptor (A1) following consumption of a high fat diet may have a significant role in the lipogenic expression of genes.

Keywords: Aerobic exercise, High-intensity interval training (HIIT), SREBP1-c, Adenosine-A1 receptor, High fat diet