

## بررسی هشت هفته تمرین استقامتی تناوبی و تداومی بر MicroRNAs های مرتبط با انتقال معکوس کلسترول در موش‌های سالمند نژاد ویستار مهدی طاهری گندمانی<sup>۱</sup>، محمد فرامرزی<sup>۲</sup>، ابراهیم بنی طالبی<sup>۳</sup>، روح الله همتی<sup>۴</sup>

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه شهرکرد

۲. دانشیار فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه شهرکرد\*

۳. استادیار فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه شهرکرد

۴. استادیار بیوشیمی، دانشگاه شهرکرد

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۱/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۵/۱۳

### چکیده

سالمندی با تغییراتی در کلسترول خون و به دنبال آن، بیماری‌های قلبی-عروقی همراه است. هدف این پژوهش، بررسی تأثیر دو نوع تمرین تناوبی و تداومی بر MicroRNAهای مرتبط با انتقال معکوس کلسترول در موش‌های سالمند بود. تعداد ۳۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار مسن (۲۳ ماه) با میانگین وزنی ۴۴۱/۷۵ گرم به صورت تصادفی در دو گروه تمرینی و یک گروه کنترل شامل گروه تمرین تداومی (تعداد = ۱۰)، تمرین تناوبی (تعداد = ۱۰) و گروه کنترل (تعداد = ۱۰) قرار گرفتند. تمرین تداومی و تناوبی شامل هشت هفته تمرین روی تردمیل و پنج روز در هفته بود که گروه تداومی تمرین را با ۶۰ درصد سرعت بیشینه و به مدت ۱۶ دقیقه در هفته اول شروع کردند و با ۷۰ درصد سرعت بیشینه و مدت ۴۵ دقیقه از هفته چهارم به بعد ادامه دادند. گروه تناوبی تمرین را با شدت ۴۰ تا ۸۰ درصد سرعت بیشینه از هفته اول شروع کردند و با ۳۰ تا ۱۱۰ درصد سرعت بیشینه از هفته چهارم به بعد ادامه دادند. بعد از دوره تمرین، بیان miR-33a و miR-144 و بیان ژن ABCA1 به روش RT-PCR اندازه‌گیری شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون آنوا با سطح معناداری  $P < 0.05$  انجام شد. نتایج نشان داد که بیان miR-33a و miR-144 در دو گروه تداومی و تناوبی نسبت به گروه کنترل کاهش داشتند؛ اما این کاهش در هر دو گروه نسبت به گروه کنترل تنها در مورد miR-33a معنادار بود ( $P < 0.001$ ). بیان mRNA ژن ABCA1 در گروه تداومی و تناوبی پس از هشت هفته تمرین نسبت به گروه کنترل افزایش داشت؛ با این وجود، این افزایش تنها در گروه تناوبی نسبت به گروه کنترل معنادار بود ( $P = 0.002$ ). بین تأثیر تمرین تناوبی و تداومی بر بیان miR-33a و miR-144 تفاوت معناداری وجود نداشت؛ اما در مورد بیان mRNA ژن ABCA1 تفاوت معناداری در دو گروه تداومی و تناوبی مشاهده شد ( $P = 0.028$ ). با توجه به نتایج این مطالعه، به نظر می‌رسد که هر دو تمرین استقامتی تناوبی و تداومی می‌توانند باعث کاهش بیان miR-33a و به دنبال آن، افزایش بیان mRNA ژن ABCA1 شوند؛ اما این افزایش در تمرین تناوبی نسبت به تمرین تداومی بیشتر است.

واژگان کلیدی: miR-33a، miR-144، ABCA1، تمرین استقامتی تداومی و تناوبی

## مقدمه

آترواسکلروز<sup>۱</sup> در طبقه بیماری‌های مربوط به سن قرار می‌گیرد. بیماری‌های قلبی- عروقی با افزایش سن افزایش می‌یابند؛ بنابراین، افزایش سن عامل مستقلی برای افزایش آترواسکلروز است (۱). متداول‌ترین علل بیماری‌های قلبی- عروقی، حمله قلبی و سکته قلبی نیز ناشی از آترواسکلروز است که عبارت است از تنگ شدن عروق خونی در اثر تجمع چربی‌ها در دیواره عروق (۲). عوامل زیادی در بروز و گسترش آترواسکلروز نقش دارند که مهم‌ترین آن کلسترول در گردش است. هنگامی که مقدار آن در خون افزایش می‌یابد، لیپوپروتئین کم‌چگالی<sup>۲</sup> (LDL-C) در ارتباط با گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن آن را تعدیل می‌کند؛ در نتیجه، لیپوپروتئین کم‌چگالی اکسیداز شده به سرعت به وسیله ماکروفاژهای دیواره عروق برداشت می‌شود. این ماکروفاژهای مملو از لیپید به عنوان سلول‌های فوم شناخته می‌شوند که عامل اصلی پلاک‌های آترواسکلروز هستند (۳-۵). پژوهش‌های اخیر نشان داده‌اند بسیاری از تنظیم‌های متابولیسم چربی کبدی در سطح بیان ژن رخ می‌دهد و از این رو، MicroRNAها که بر پایداری mRNA و ترجمه اثر می‌کنند، خود را به عنوان تنظیم‌کننده کلیدی متابولیسم کبدی و به ویژه متابولیسم چربی‌ها اثبات کرده‌اند (۶، ۷). MicroRNAها زیرگروه بزرگی از RNAهای غیرکدکننده ۱۸-۲۵ نوکلئوتیدی هستند که از نظر تکاملی در ژنوم یوکاریتی حفاظت شده هستند. این مولکول‌ها بیان ژن را پس از رونویسی از طریق مهار ترجمه mRNA یا القای تجزیه آن کنترل می‌کنند و این کار را بیشتر از طریق اتصال به ناحیه ترجمه‌نشده (3'UTR) انتهای mRNAها انجام می‌دهند (۸).

پژوهش‌های زیادی نشان داده‌اند که MicroRNAها نقشی کلیدی در مراحل مختلف سوخت‌وساز بدن از جمله متابولیسم چربی‌ها دارند. در طول دهه گذشته، به MicroRNAها به عنوان تنظیم‌کننده‌های اصلی تمام جنبه‌های RCT، از جمله پیدایش HDL، جریان کلسترول سلولی و ترشح صفراوی توجه شده است (۹). مطالعات زیادی نشان داده‌اند که MicroRNAها نقش مهمی در مهار ABCA1، آپولیپروتئین‌های A-I و جریان کلسترول به HDهای نوپای تولیدشده در کبد و روده دارند و از طرفی، مهار MicroRNAهای درگیر در این فرایند با افزایش خروج کلسترول از سلول و در نهایت، افزایش میزان و ترکیب HDL پلازما همراه بوده است (۹، ۱۰). سلول‌های پستانداران نمی‌توانند کلسترول اضافی را کاهش دهند؛ بنابراین، حذف کلسترول اضافی داخل سلولی ضروری است. ذرات HDL سیستم اولیه‌ای هستند که قادر به حذف کلسترول اضافی از سلول‌های

- 
1. Atherosclerosis.
  2. Low Density Lipoprotein

محیطی از طریق انتقال معکوس کلسترول هستند. انتقال معکوس کلسترول<sup>۱</sup> (RCT) به فرایند جمع‌آوری کلسترول اضافی از بافت‌های پیرامونی از جمله ماکروفاژهای دیواره سرخرگی و بازگرداندن آن‌ها به کبد برای پاک‌سازی از طریق صفرا و دفع آن از طریق مدفوع گفته می‌شود که در این مرحله، ABCA1<sup>۲</sup> نقش مهمی ایفا می‌کند. این فرایند به‌ویژه برای ماکروفاژها در پلاک‌های آترواسکلروتیک مهم است (۳، ۴). اولین روند انتقال معکوس کلسترول وابسته به پذیرنده خارج سلولی آن؛ یعنی آپولیپوپروتئین A- عاری از لیپید یا دارای حداقل لیپید است که این فرایند توسط ناقل ABCA1 میانجیگری می‌شود و سبب تشکیل ذرات پری بتا<sup>۳</sup> HDL می‌شود. (۴، ۵).

به‌طور خاص، نشان داده شده است که miR-33، miR-144 نقشی کلیدی در سوخت‌وساز HDL در بدن ایفا می‌کند. گزارش شده است که miR-33a و miR-33b نقش مهمی در تنظیم ABCA1، عامل بسیار مهم در هر دو بیوزن HDL و جریان کلسترول (۱۰، ۶) دارند. نشان داده شده است که miR-144 از طریق مکانیسم‌های رونویسی و پس‌ترجمه‌ای، به میزان زیادی باعث تنظیم mRNA ژن پروتئین ABCA1 از طریق تأثیر بر گیرنده‌های LXR<sup>۴</sup> می‌شود. گیرنده‌های LXR باعث فعال شدن نسخه‌برداری فاکتورهای درگیر در متابولیسم کلسترول از جمله ABCA1 و ABCG1 می‌شوند. همچنین، ABCA1 به‌وسیله miR-33a که در اینترون ژن SREBP-2 کدگذاری شده است، به‌صورت پس‌ترجمه‌ای تنظیم می‌شود. MiR-33 به‌نوبه خود SREBP-2 را سرکوب می‌کند تا تنظیم هوموستاز کلسترول را با یک حلقه خودکار بازخورد تنظیم کند (۷). همسو با این نتایج، گزارش‌های اخیر در مدل‌های مختلف حیوانی نشان داده‌اند که مهار درمانی miR-33 به افزایش سطح سرمی HDL منجر می‌شود. اثرهای مشابه در موش‌های فاقد miR-33 مشاهده شد (۱۱، ۳). همچنین، مطالعات نشان داده‌اند که miR-144 باعث تنظیم جریان کلسترول ماکروفاژها و همچنین، پیدایش HDL می‌شود (۷). دی آگوار<sup>۵</sup> و همکاران (۱۲) نشان دادند که افزایش miR-144 باعث کاهش سطوح کبدی ABCA1 و HDL می‌شود. همچنین، آن‌ها نشان دادند که miR-144 باعث کاهش جریان کلسترول و کاهش سنتز HDL‌های نوپا می‌شود. درمقابل، خاموش کردن miR-144 باعث افزایش ABCA1 و HDL شد؛ بنابراین، به‌نظر می‌رسد از کاهش miR-144 می‌توان به‌عنوان یک عامل درمانی بالقوه برای درمان چربی خون و آترواسکلروز استفاده کرد (۱۲).

1. Reverse Cholesterol Transport
2. ATP-Binding Cassette Transporter Protein
3. Pre Beta-HDL Particles
4. Liver X Receptor
5. De Aguiar

افزون‌براین، پژوهش‌های زیادی نشان داده‌اند که تمرین‌های هوازی، مقاومتی و ترکیبی می‌توانند بر سطح و نوع کلسترول تأثیر مثبت داشته باشند. در یک مقاله مروری، استیون<sup>۱</sup> و همکاران (۱۴) نشان دادند که بین افزایش کلسترول و بیماری‌های قلبی-عروقی رابطه مستقیمی وجود دارد. پدرس و سالتین<sup>۲</sup> (۱۵) در بررسی ۱۳ مقاله پژوهشی دریافتند که تمرین ورزشی باعث ایجاد تغییرات مفیدی در HDL، LDL و کلسترول تام پلاسما می‌شود. آداهل<sup>۳</sup> و همکاران (۱۶) گزارش کردند که بین فعالیت ورزشی و بهبود در کلسترول تام، LDL، تری‌گلیسرید و HDL در افراد بین ۳۰-۶۰ سال رابطه معناداری وجود دارد؛ البته آن‌ها بیان کردند که فعالیت ورزشی باعث بهبود کلسترول شد؛ اما افزایش HDL تنها در مردان مشاهده شد. لیمورا<sup>۴</sup> و همکاران (۱۷) در یک مطالعه ۱۶ هفته‌ای کاهش قابل توجهی را در تری‌گلیسرید پلاسما و همچنین، افزایش HDL پلاسما مشاهده کردند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که مداخله کوتاه‌مدت به شرط آنکه حجم تمرین بالا باشد، می‌تواند در بهبود کلسترول مفید باشد. دانو وان<sup>۵</sup> و همکاران (۱۸) حجم تمرین را به‌طور مستقیم برای ارزیابی شدت تمرین، در دو گروه ورزش با شدت زیاد و شدت متوسط کنترل کردند. آن‌ها بهبود معناداری را در خصوصیات چربی (کاهش LDL و افزایش HDL) تنها در گروه با شدت بالا نشان دادند. آن‌ها نتیجه گرفتند که ورزش با شدت بالا می‌تواند نسبت به ورزش با شدت متوسط در افزایش HDL مؤثرتر باشد که این می‌تواند اثر مثبتی بر حذف LDL-c توسط HDL داشته باشد. قنبری نیاکانی (۱۹) در مطالعه‌ای نشان داد که ۱۲ هفته تمرین ورزشی استقامتی با تردمیل باعث افزایش بیان ABCA1 و افزایش غلظت پلاسمایی APO-A و Pre-B-HDL در موش‌های ویستار شد. توفیقی و همکاران (۲۰) نشان دادند که ۱۲ هفته تمرین هوازی منظم باعث افزایش بیان ABCA1 و APO-A شد. با توجه به پژوهش‌های ذکر شده در زمینه مکانیسم‌های سلولی مرتبط با اثر ورزش بر متابولیسم کلسترول، پژوهش‌هایی در سطح بیان ژن انجام شده‌اند که نشان می‌دهند تغییرات متابولیسم کلسترول ناشی از فعالیت ورزشی با بیان ژن همراه هستند و همچنین، اثرگذاری MicroRNAها بر انتقال معکوس کلسترول مشخص شده است؛ با این حال، مطالعه‌ای در مورد نقش تمرینات استقامتی تناوبی و تداومی بر MicroRNAهای مرتبط با این فرایند، به‌ویژه در آزمودنی‌های سالمند انجام نشده است؛ بنابراین، با توجه به پژوهش‌های پیش‌گفته، به‌نظر می‌رسد که به‌طور کلی تأثیر فعالیت‌های ورزشی بر تغییرات متابولیسم کلسترول و انتقال معکوس در

- 
1. Steven
  2. Pedersen & Saltin
  3. Aadah
  4. LeMura
  5. Donovan

سطح بیان ژن نشان داده شده است؛ ولی بیشتر مطالعات ذکر شده در آزمودنی‌های سالم یا افراد دیابتی غیرسالمند انجام شده‌اند و در کمتر مطالعه‌ای تأثیر شدت‌های مختلف تمرین بر تغییرات لیپوپروتئین‌های آزمودنی‌های سالمند بررسی شده است. همچنین، با توجه به موارد ذکر شده، اثر تمرین‌های ورزشی بر نوع و مقدار کلسترول تأیید شده است؛ ولی تأثیر شدت‌های تمرینات ورزشی مختلف بر تمامی جنبه‌های سلولی و مولکولی انتقال معکوس کلسترول مشخص نشده است و یکی از کاندیداهای مهم در این زمینه می‌تواند تأثیر تمرینات ورزشی استقامتی بر سطوح MicroRNAها باشد.

بنابراین، انتقال معکوس کلسترول و افزایش سطح HDL رابطه معکوسی با آترواسکلروز دارد (۱۴، ۱۳) و مطالعات زیادی به بررسی اثر MicroRNAهای مختلف بر متابولیسم کلسترول و انتقال معکوس کلسترول و HDL پرداخته‌اند (۱۵، ۳). همچنین، در مجموع نشان داده شده است که مهار درمانی این MicroRNAها باعث افزایش میزان و ترکیب HDL شده است؛ با این حال، عوامل خطر و بروز بیماری‌های قلبی-عروقی هنوز هم به‌طور نگران‌کننده‌ای بالا هستند و برای آن دسته از بیمارانی که مقاومت به درمان دارویی یا تحمل نکردن آن را نشان می‌دهند، گزینه‌های درمانی محدود هستند (۱۶)؛ بنابراین، بررسی عوامل اثرگذار دیگر، از جمله نقش تمرین‌های ورزشی استقامتی در مکانیسم‌های سلولی و مولکولی درگیر در متابولیسم کلسترول ضروری به نظر می‌رسد؛ از این رو، هدف از انجام این پژوهش بررسی تأثیر دو نوع تمرین استقامتی تناوبی و تداومی بر MicroRNAهای مرتبط با انتقال معکوس کلسترول (miR-33a و miR-144) در موش‌های سالمند بود.

### روش پژوهش

در پژوهش حاضر، تعداد ۳۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با میانگین وزنی ۴۴۱/۷۵ گرم که در شروع دوره ۲۳ ماه سن داشتند (۱۷)، از مؤسسه انستیتو پاستور ایران تهیه شدند و در شرایط دمایی  $22 \pm 3$  درجه سانتی‌گراد در شرایط ۱۲:۱۲ ساعت تاریکی و روشنایی نگهداری شدند و با غذای مخصوص موش صحرایی و آب تغذیه شدند. همچنین، همه قواین و نحوه رفتار با حیوانات (آشناسازی، تمرین، بیهوشی و کشتن حیوان)، براساس انجمن ارزیابی و اعتباربخشی بین‌المللی مراقبت از حیوانات آزمایشگاهی و با تأیید شورای پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه شهرکرد انجام شدند. بعد از گذشت یک هفته آشناکردن و سازگاری حیوانات با محیط آزمایشگاه، به صورت تصادفی آن‌ها در دو گروه تمرینی و یک گروه کنترل قرار گرفتند. گروه‌های تجربی شامل تمرین

تداومی (تعداد = ۱۰) و تمرین تناوبی (تعداد = ۱۰) بودند. گروه کنترل شامل ۱۰ سر موش صحرایی بود که تحت مداخله خاصی قرار نگرفتند و تنها برای شبیه‌سازی بیشتر، هفته‌ای سه جلسه به مدت ۱۵ دقیقه روی تردمیل با سرعت دو متر در دقیقه قرار گرفتند. گروه‌های تجربی پروتکل‌های تمرین تداومی را به شرح زیر انجام دادند.

حیوانات گروه‌های استقامتی در طول یک هفته با تردمیل و چگونگی دویدن روی تردمیل آشنا شدند و پس از ۴۸ ساعت استراحت از آخرین جلسه آشناسازی، برای مشخص کردن شدت‌های تمرین، از حیوانات آزمون وامانده‌ساز گرفته شد (۱۸). برای تخمین حداکثر اکسیژن مصرفی به صورت غیرمستقیم، از پژوهش لیندرو و همکاران (۲۵) استفاده شد و موش‌ها با توجه به سرعت معادل با درصد حداکثر اکسیژن مصرفی مدنظر که به متر در دقیقه تبدیل شد، به مدت پنج جلسه در هفته به مدت هشت هفته تمرینات را انجام دادند که در انتهای هفته چهارم، از حیوانات آزمون مجدد گرفته شد و سرعت تمرین براساس آزمون جدید تعیین شد.

پروتکل تمرین تناوبی و تداومی شامل سه قسمت بود: ۱- گرم کردن؛ ۲- تمرین شامل فعالیت‌های با شدت بالا و فعالیت با شدت پایین مربوط به گروه تناوبی و تمرین تداومی مربوط به گروه تداومی؛ ۳- سرد کردن (جدول شماره یک). تمرین تناوبی به‌گونه‌ای بود که پس از گرم کردن، موش‌های صحرایی ابتدا فعالیت با شدت بالا و پس از آن فعالیت با شدت پایین را انجام دادند. پس از انجام آخرین فعالیت با شدت بالا، موش‌های صحرایی به‌جای تمرین در سرعت معادل ۴۰ درصد سرعت بیشینه، به مدت پنج دقیقه با سرعت معادل ۵۰ درصد سرعت بیشینه، سرد کردن را انجام دادند. تعداد فعالیت با شدت بالا در هفته اول، دو تکرار فعالیت، در هفته دوم، چهار تکرار فعالیت، در هفته سوم، شش تکرار فعالیت و از ابتدای هفته چهارم به بعد شامل هشت تکرار فعالیت با شدت بالا بود؛ از این‌رو، زمان کل تمرین شامل فعالیت با شدت بالا، فعالیت با شدت پایین به‌همراه گرم کردن و سرد کردن در هفته اول ۱۶ دقیقه، در هفته دوم ۲۴ دقیقه، در هفته سوم ۳۲ و از ابتدای هفته چهارم به بعد ۴۰ دقیقه بود. در گروه تمرین تداومی، موش‌ها ابتدا به مدت پنج دقیقه روی نوار گردان برای گرم کردن دویدند. سپس، با سرعت معادل ۶۰ درصد سرعت بیشینه در هفته اول، ۶۵ درصد سرعت بیشینه در هفته دوم و ۷۰ درصد سرعت بیشینه از هفته سوم به بعد تمرین تداومی را انجام دادند. مسافت دویدن موش‌ها در گروه تمرین تداومی به‌گونه‌ای بود که با مسافت تمرین گروه تناوبی برابر باشد (۱۹).

جدول ۱- پروتکل تمرین

فعالیت	گرم کردن پنج دقیقه	تمرین تداومی	گروه تناوبی (هر تکرار دو دقیقه)	سرد کردن پنج دقیقه
هفته اول		آزمون سرعت بیشینه (میانگین ۳۴/۴ متر در دقیقه)	آزمون سرعت بیشینه (میانگین ۳۳/۸ متر در دقیقه)	
۱۶ دقیقه	پنج دقیقه با ۴۰ تا ۵۰ درصد	شش دقیقه با ۶۰ درصد	دو تکرار با ۸۰ درصد و ۱ تکرار با ۴۰ درصد	۴۰ تا ۵۰ درصد
هفته دوم	پنج دقیقه با ۴۰ تا ۵۰ درصد	۱۴ دقیقه با ۶۵ درصد	چهار تکرار با ۹۰ درصد و ۳ تکرار با ۴۰ درصد	۴۰ تا ۵۰ درصد
هفته سوم	پنج دقیقه با ۴۰ تا ۵۰ درصد	۲۲ دقیقه با ۷۰ درصد	شش تکرار با ۱۰۰ درصد و ۵ تکرار با ۴۰ درصد	۴۰ تا ۵۰ درصد
هفته چهارم	پنج دقیقه با ۴۰ تا ۵۰ درصد	۳۰ دقیقه با ۷۰ درصد	هشت تکرار با ۱۱۰ درصد و ۷ تکرار با ۳۰ درصد	۴۰ تا ۵۰ درصد
هفته پنجم تا هشتم		آزمون سرعت بیشینه (میانگین ۴۰/۵ متر در دقیقه)	آزمون سرعت بیشینه (میانگین ۳۹/۴ متر در دقیقه)	
۴۰ دقیقه	پنج دقیقه با ۴۰ تا ۵۰ درصد	۳۰ دقیقه با ۷۰ درصد	هشت تکرار با ۱۱۰ درصد و ۷ تکرار با ۳۰ درصد	۴۰ تا ۵۰ درصد

۷۲ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرین، موش‌های صحرایی با تزریق درون‌صفافی کتامین (۳۰ تا ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) بی‌هوش شدند و نمونه خونی از هر موش صحرایی حدود هشت سی‌سی به‌طور مستقیم از قلب جمع‌آوری شد که مقدار دو سی‌سی آن در تیوپ‌های حاوی ETDA برای استخراج گلبول سفید ریخته شد.

جداسازی لنفوسیت‌ها به‌وسیله محلول RBC Lysis Buffer شرکت سیناکولون با Cat No:EX6122) به شرح زیر طبق پروتکل گفته شده انجام شد: ۱- ابتدا محلول را با آب مقطر به حجم ۱۰ رساندیم. سپس، به‌ازای هر ۱۰۰ ماکرو لیتر خون یک میلی‌لیتر از محلول را به آن اضافه کردیم (۱۰ حجم از محلول رقیق شده را به یک حجم از خون اضافه کردیم)؛ ۲- به‌مدت ۱۰ دقیقه به‌صورت آهسته آن را در دمای اتاق اینورت کردیم؛ ۳- به‌مدت پنج دقیقه آن را در دمای چهار درجه سانتی‌گراد و دور ۴۰۰۰ سانتریفیوز کردیم؛ ۴- بعد از خالی کردن محلول رویی، دوباره مراحل ذکر شده را تا هنگامی که رنگ صورتی در اطراف یا داخل پلیت‌های گلبول سفید دیده می‌شوند،

تکرار کردیم تا گلبول‌های سفید کاملاً جداسازی شوند. در نهایت، گلبول‌های سفید جدا شدند و سپس، در دمای منفی ۸۰ درجه فریز شدند و به آزمایشگاه منتقل شدند. روش اندازه‌گیری متغیرها به صورت ذیل انجام گرفت:

#### ۱- استخراج RNA:

استخراج RNA به وسیله کیت استخراج RNA شرکت Roche آلمان (Cat. No:CK-12033674001) انجام شد. نحوه عملکرد کیت: نمونه‌های بافت توسط یک بافر دنا تورکننده حاوی جوهر نمکی گواندین شکسته و یکنواخت می‌شوند تا به‌طور آبی RNase غیرفعال شود و مطمئن شویم که RNA سالم ایزوله می‌شود. بعد از اضافه کردن اتانول، RNA به الیاف قرار گرفته در میکروتیوب‌ها متصل می‌شود و DNAهای موجود به وسیله DNase از بین می‌رود. طی دوره‌های پی‌درپی، شست‌وشو و سانتریفیوژ RNAها به فیبرهای دو لایه موجود در دیوپ‌ها متصل می‌شود. در نهایت، بافر نمکی اسید نوکلئیدهای باقی‌مانده در فیبرها را شست‌وشو می‌دهد تا RNA سالم استخراج شود.

#### رونویسی معکوس، سنتز cDNA و RT-PCR

برای رونویسی معکوس ژن ABCA1، از یک میکروگرم RNA و کیت نورژن<sup>۱</sup> کانادا با شماره تولید ۵۴۴۲۰ و براساس دستورالعمل کارخانه مربوط استفاده شد. تعیین سطح نسبی mRNA ژن ABCA1 به روش RT-PCR نیمه کمی و با استفاده از کیت نورژن کانادا با شماره تولید ۲۸۳۲۳ و

براساس دستورالعمل کارخانه مربوط استفاده شد. این روش به کمک پرایمرهای ABCA1 شامل

ABCA1- Forward: 5'-TCG ATT CAT GGA GTG TGT CAA C-3'

ABCA1 – Reverse: 3'-CTG TGA ACA CGA TAC CAG CC-5'

انجام شد و برای کنترل تکثیر آن از پرایمرهای ویژه بتا اکتین شامل

B-actin- Forward: 5'-CTA TGA GGG TTA CGC GCT CC-3'

B-actin –Reverse: 3'-ATG TCA CGC ACG ATT TCC CT-5'

استفاده شد. همه اندازه‌گیری‌ها دو بار روی هر نمونه انجام گرفت. فرایند RT-PCR با استفاده از نرم‌افزار روتور ژن کیو (کوربت)<sup>۲</sup> انجام شد.

پروتکل ریل تایم پی سی آر<sup>۳</sup> برای اندازه‌گیری فاکتورها بر مبنای روش سایبرگرین شامل ۱- دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه؛ ۲- ۴۰ سیکل مشتمل بر ۲۲ ثانیه (۹۵ درجه سانتی‌گراد)، ۲۲ ثانیه (۹۵ درجه سانتی‌گراد)، ۶۰ ثانیه (۷۰ درجه سانتی‌گراد) و در نهایت مرحله ملتینگ در دمای ۹۵-۵۵ درجه سانتی‌گراد بود.

- 
1. NORGEN
  2. Rotor-Gene Q (Corbett)
  3. Real Time PCR



برای طراحی پرایمرهای پیشرو mir-33a، mir-144 و SNORD47 از توالی‌های زیر استفاده شد:  
 mir-33a: TGCAATGCAACTACAATGCAC  
 mir-144: TACAGTATAGATGATGTAC  
 SNORD47: TAATGATTCTGCCAAATG'

سنتز cDNA برای miRNA و SNORD47 به‌عنوان کنترل داخلی به‌صورت اختصاصی و با استفاده از کیت اختصاصی و پرایمرهای معکوس از پیش طراحی شده توسط شرکت زیست رویش به روش ساقه-حلقه<sup>۱</sup> انجام شد.

cDNAهای سنتز شده با استفاده از ترکیبات و طبق دستورالعمل کیت برای واکنش RT-PCR آماده شدند. پس از اتمام تقسیم‌بندی، هر نمونه به درون دستگاه RT-PCR فرایند سنجش آغاز شد. همه اندازه‌گیری‌ها دو بار روی هر نمونه انجام شدند. فرایند RT-PCR با استفاده از نرم‌افزار روتور ژن کیو (کوربت) انجام شد.

پروتکل RT-PCR برای اندازه‌گیری فاکتورها بر مبنای روش سایبرگرین شامل ۱- دناتوراسیون به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد؛ ۲- ۴۰ سیکل مشتمل بر ۲۲ ثانیه (۹۵ درجه سانتی‌گراد)، ۶۰ ثانیه (۵۹ درجه سانتی‌گراد) و در نهایت، مرحله ملتینگ در دمای ۹۵-۵۵ درجه سانتی‌گراد بود.

پس از اتمام فرایند و به دست آمدن چرخه‌های آستانه (Ct)، سنجش بیان متغیرهای مورد نظر با استفاده از محاسبه ریاضیاتی  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  صورت گرفت (۲۰).  $\Delta Ct$  هر نمونه با استفاده از کنترل داخلی، B-actin برای ژن‌ها و کنترل داخلی، SNORD47 برای miRNAها محاسبه شدند (با تفریق Ctها از کنترل داخلی). سپس،  $\Delta\Delta Ct$  مربوط برای هر نمونه با کم کردن  $\Delta Ct$  آن نمونه از میانگین  $\Delta Ct$  گروه کنترل محاسبه شد. در نهایت، از رابطه ریاضیاتی  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  برای گزارش تغییرات بیان کمی متغیرها استفاده شد.

برای بررسی برابری واریانس‌ها از آزمون لوین و برای بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون کلموگروف-اسمیرنوف<sup>۲</sup> استفاده شد. از میانگین و انحراف استاندارد برای توصیف ویژگی‌های فردی و برای بررسی اثربخشی مداخلات از آزمون تحلیل واریانس یک راهه<sup>۳</sup> (۲۱) استفاده شد. برای بررسی این موضوع که کدام یک از مداخلات بر متغیرهای وابسته اثر بیشتری داشته‌اند، از آزمون

- 
1. Stem-Loop
  2. Kolmogorov-Smirnov Test
  3. One Way ANOVA

تعقیبی توکی<sup>۱</sup> استفاده شد. تحلیل آماری با نرم افزار اس.پی.اس.اس<sup>۲</sup> نسخه ۲۰ انجام شد. معنادار بودن تفاوت‌های داده‌ها در سطح ( $P \leq 0.05$ ) محاسبه شد.

## نتایج

جدول شماره دو، تغییرات وزن موش‌های صحرایی سالمند را در گروه‌های مختلف مطالعه نشان می‌دهد. جدول شماره سه و شکل شماره یک شاخص‌های توصیفی نمرات miR-144 و miR-33 را در موش‌های صحرایی سالمند برحسب مداخله نشان می‌دهد. همان‌طور که در جدول شماره دو مشاهده می‌شود، میانگین مقدار miR-33 و miR-144 در گروه‌های تمرین تداومی و تناوبی نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است؛ اما این کاهش در هر دو گروه تنها در مورد miR-33a معنادار است ( $P < 0.001$ ). همچنین، میانگین بیان mRNA ژن ABCA1 در گروه تداومی و تناوبی پس از هشت هفته تمرین نسبت به گروه کنترل افزایش داشت؛ با این وجود، این افزایش تنها در گروه تناوبی معنادار است ( $P < 0.002$ ). نتایج نشان می‌دهد که بین تأثیر تمرین تناوبی و تداومی بر بیان miR-33a و miR-144 تفاوت معناداری وجود ندارد؛ اما در مورد بیان mRNA ژن ABCA1 تفاوت معناداری در دو گروه تداومی و تناوبی مشاهده می‌شود ( $P < 0.028$ ). با توجه به ضریب F محاسبه شده در جدول شماره چهار مشاهده می‌شود که بین میانگین نمرات miR-33 و ABCA1 شرکت‌کنندگان برحسب عضویت گروهی (گروه‌های آزمایشی و گروه کنترل) تفاوت معنادار وجود دارد. برای بررسی این موضوع که کدام یک از مداخلات بر miR-33 و ABCA1 تأثیر بیشتری داشته‌اند، از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. با توجه به آزمون تعقیبی نشان داده شد که در متغیر وابسته miR-33 تفاوت معناداری بین هر دو گروه تداومی و تناوبی در مقایسه با گروه کنترل است و این تفاوت معنادار است ( $P < 0.001$ )؛ اما بین گروه تداومی و تناوبی تفاوت معناداری در هیچ کدام از متغیرها مشاهده نشد. همچنین، در متغیر وابسته ABCA1 تأثیر مداخله تمرین تناوبی بیشتر از هر دو گروه کنترل و تناوبی است و این تفاوت نسبت به هر دو گروه کنترل و تداومی معنادار است ( $P < 0.05$ ). بیان mRNA ژن ABCA1 در گروه تداومی نسبت به کنترل افزایش دارد؛ اما این تفاوت معنادار نیست.

- 
1. Tukey Post Hoc Test
  2. SPSS

جدول ۲ - میانگین تغییرات وزن (گرم)

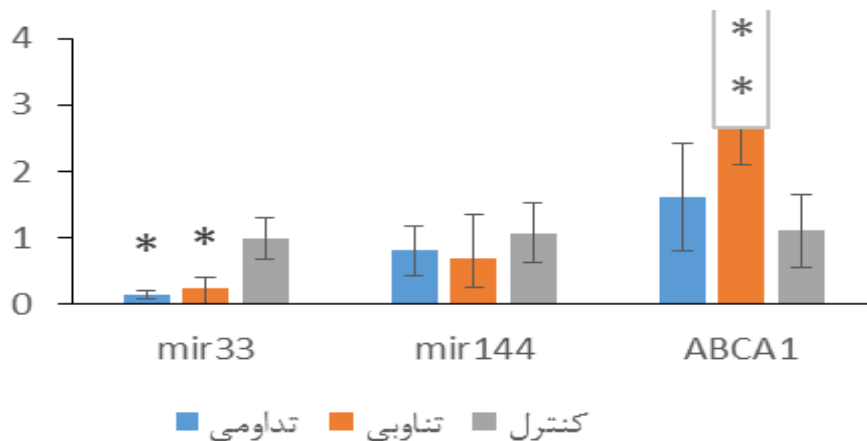
گروه‌ها	وزن اولیه (گرم)		وزن هفته چهارم (گرم)		وزن نهایی (گرم)	
	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار
تمرین تداومی	۴۴۷	۲۴/۰۹	۴۳۸	۲۱/۶۲	۴۳۴/۸۸	۱۵/۶۷
تمرین تناوبی	۴۳۲/۷۵	۴۸/۴۶	۴۲۲/۸۷	۴۹/۵۶	۴۱۶/۱۲	۴۲/۲۵
کنترل	۴۴۵/۵۰	۲۴/۰۷	۴۵۲	۳۰/۹۳	۴۴۱/۸۷	۲۷/۹۵

جدول ۳ - آمار توصیفی نمرات miR-33، miR-144 و ABCA1

گروه‌ها	miR-33		miR-144		ABCA1	
	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار
تمرین تداومی	۰/۱۳۶۲	۰/۰۶	۰/۷۹۹۸	۰/۳۷	۱/۵۹۹۵	۰/۸۱
تمرین تناوبی	۰/۲۴۲۳	۰/۱۶	۰/۶۹۸۴	۰/۶۶	۲/۶۴۰۱	۰/۸۸
کنترل	۰/۹۹۳۲	۰/۳۱	۱/۰۷۳۵	۰/۴۴	۱/۱۰۸۲	۰/۵۵

جدول ۴ - نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه در سه گروه مربوط به miR-33، miR-144 و ABCA1

متغیر	منبع تغییرات	مجموع مجذورات	درجه آزادی	میانگین مجذورات	F	سطح معناداری
miR-33	بین گروهی	۳/۵۹۱	۲	۱/۷۹۶	۴۳/۱۴	۰/۰۰۱
	درون گروهی	۰/۹۱۶	۲۲	۰/۰۴۲	-	-
miR-144	بین گروهی	۰/۶۰۵	۲	۰/۳۰۳	۱/۱۸۱	۰/۳۲۶
	درون گروهی	۵/۶۳	۲۲	۰/۲۵۶	-	-
ABCA1	بین گروهی	۹/۸۲	۲	۴/۹۱۰	۸/۳۴۴	۰/۰۰۲
	درون گروهی	۱۲/۹۴	۲۲	۰/۵۸۸	-	-



شکل ۱- میانگین (± انحراف معیار) مقادیر نسبی بیان متغیرها در سه گروه

\* معناداری گروه تمرینی نسبت به گروه کنترل

\*\* نشان دهنده معناداری گروه تمرین نسبت به هر دو گروه دیگر

## بحث و نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که بیان miR-144 و miR-33a در دو گروه تداومی و تناوبی نسبت به گروه کنترل کاهش داشت؛ اما این کاهش تنها در مورد miR-33a معنادار بود؛ بنابراین، نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که تمرین استقامتی اعم از تداومی و تناوبی، اثر بیشتری بر بیان miR-33a نسبت به miR-144 دارد.

مطالعات زیادی نشان داده‌اند که miR-144 و miR-33a نقش مهمی در مهار ABCA1، آپولیپوپروتئین های A-I و جریان کلسترول به HDLهای نوپای تولیدشده در کبد و روده دارند و از طرفی، مهار این MicroRNAها با افزایش خروج کلسترول از سلول و در نهایت، افزایش میزان و ترکیب HDL پلاسما همراه بوده است (۱۱، ۷، ۳).

مطالعه اخیر توسط روتلان<sup>۱</sup> و همکاران (۲۸) نشان داد که در درازمدت (۱۲ هفته)، استفاده از anti-miR-33 باعث افزایش غلظت HDL و افزایش انتقال معکوس کلسترول در حیوانات با رژیم غذایی چرب می‌شود. علاوه بر این، اندازه پلاک آترواسکلروتیک به طور قابل توجهی کاهش یافته بود. همچنین، رسوب ماکروفاژها کم شده بود. رامیراز<sup>۲</sup> و همکاران (۲۹) نشان دادند که miR-144 باعث تنظیم جریان کلسترول ماکروفاژها و همچنین، پیدایش HDL می‌شود؛ بنابراین، از کاهش miR-33a

1. Rotllan
2. Ramirez

و miR-144 می‌توان به‌عنوان یک عامل درمانی بالقوه برای درمان چربی خون و آترواسکلروز استفاده کرد.

افزون‌براین، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بیان mRNA ژن ABCA1 در هر دو گروه تداومی و تناوبی نسبت به گروه کنترل، پس از هشت هفته تمرین افزایش داشت؛ اما این افزایش تنها در گروه تناوبی معنادار بود. بین تأثیر تمرین تناوبی و تناوبی بر بیان miR-144 و miR-33a تفاوت معناداری وجود نداشت؛ با این حال، در مورد بیان mRNA ژن ABCA1 تفاوت معناداری در دو گروه تداومی و تناوبی مشاهده شد که به‌نظر می‌رسد وقتی که حجم تمرین یکسان باشد، شدت تمرین می‌تواند عامل مؤثری در بیان ABCA1 باشد؛ بنابراین، این پژوهش نشان داد که با یک حجم ثابت، تمرین تناوبی نسبت به تمرین تداومی در بیان ژن ABCA1 مؤثرتر است.

سطوح mRNA پروتئین ABCA1 توسط مکانیسم‌های رونویسی و پس‌ترجمه‌ای بسیاری تنظیم می‌شوند. از مکانیسم‌هایی که اثر ورزش را بر miR-33a و miR-144 را بر متابولیسم کلسترول توجیه می‌کنند، می‌توان به نقش تنظیمی فعالیت بدنی بر گیرنده‌های X کبدی (LXR) و گیرنده‌های گیرنده هسته‌ای فarnزوید<sup>۱</sup> (FXR) و پروتئین پیوندی عنصر تنظیمی استرول (SERBP2) اشاره کرد. miR144 توسط گیرنده‌های LXR و گیرنده‌های FXR کنترل می‌شود (۲۲، ۲۳). miR-144 با مهار ABCA1 کبدی و تسریع تغییر مسیر کلسترول کبدی، به اثرهای FXR کمک می‌کند. همچنین، FXR می‌تواند باعث کاهش بیان بسیاری از ژن‌ها شود. نشان داده شده است که فعال سازی گیرنده هسته‌ای فarnزوید باعث افزایش سطح کبدی miR-144 می‌شود که به‌نوبه خود باعث کاهش سطح ABCA1 کبدی و HDL پلاسما می‌شود. برعکس، فعال شدن گیرنده کبد LXR باعث افزایش رونویسی ژن ABCA1 و افزایش سطح پروتئین عملکردی می‌شود (۷). نشان داده شده است که تمرینات ورزشی موجب افزایش قابل‌توجهی در بیان ژن LXR و غلظت HDL-C پلاسما می‌شوند که باعث کاهش کلسترول سلولی می‌شوند (۲۴). همچنین، ABCA1 به‌وسیله miR-33a که در اینترون ژن SREBP-2 کدگذاری شده است، به‌صورت پس‌ترجمه‌ای تنظیم می‌شود. MiR-33 به‌نوبه خود SREBP-2 را سرکوب می‌کند تا تنظیم هوموستاز کلسترول را با یک حلقه خودکار بازخورد تنظیم کند. (۷). در ارتباط با متابولیسم کلسترول، miR-33 مولکول‌های ABCA1 را هدف قرار می‌دهد که مولکول مهم برای بارگذاری کلسترول به ذرات HDL و حمل و نقل کلسترول است. رینر<sup>۲</sup> و همکاران (۲۲) نشان دادند که miR-33 در موش‌ها و

- 
1. Farnesoid X Receptor
  2. Rayner

انسان بیان ABCA1 و انتقال کلسترول به Apo-A را مهار می‌کند. همچنین، miR-33 در موش‌ها انتقال کلسترول به HDL نوپا را مهار می‌کند. برعکس، مهار miR-33 بیان ABCA1 و HDL پلاسما را افزایش داد. مارکوآرت<sup>۱</sup> و همکاران (۳۳) نشان دادند که جریان کلسترول به ApoA-1، بیان ABCA1 mRNA و HDL پلاسما، همراه با بیان بیش از حد کبدی miR-33 کاهش می‌یابد؛ درحالی‌که بعد از خاموشی کبدی miR-33 افزایش پیدا می‌کند. دی آگوار و همکاران (۷) نشان دادند که افزایش miR-144 باعث کاهش سطوح کبدی ABCA1 و HDL می‌شود. همچنین، آن‌ها نشان دادند که miR-144 باعث کاهش جریان کلسترول و کاهش سنتز HDL‌های نوپا می‌شود. درمقابل، خاموش کردن miR-144 باعث افزایش ABCA1 و HDL شد.

کاروناکاران<sup>۲</sup> و همکاران (۳۴) نشان دادند که مهار سنتز ATP میتوکندریایی توسط miR-33 ظرفیت جریان کلسترول ماکروفاژها را کاهش می‌دهد و آنتی miR-33 برای عملکرد میتوکندریایی و بالابردن ABCA1 که واسطه جریان کلسترول است، لازم است. آن‌ها نتیجه گرفتند که درمان آنتی miR-33 باعث افزایش تنفس میتوکندریایی و تولید ATP و همچنین، افزایش بیان ABCA1 برای ترویج جریان کلسترول ماکروفاژها و کاهش تصلب شرایین می‌شود. تاکاهیرو<sup>۳</sup> و همکاران (۳۵) به بررسی کاهش ژنتیکی miR-33 در موش‌های دارای آترواسکلروز پرداختند. آن‌ها نشان دادند که مهار miR-33 و مهار Apo-E باعث افزایش HDL در گردش و همچنین، جریان کلسترول به HDL از ماکروفاژهای پیرامونی شد. همچنین، اندازه پلاک‌های حاوی چربی نیز کاهش یافت. رینر و همکاران (۳۶) به بررسی آنتی miR-33 بر انتقال معکوس کلسترول و آترواسکلروز پرداختند. آن‌ها به مدت چهار هفته موش‌ها را تحت درمان آنتی miR-33 قرار دادند. نتایج نشان داد که درمان آنتی miR-33 باعث بهبود انتقال معکوس کلسترول پلاسما و کبد و دفع کلسترول توسط مدفوع می‌شود. همچنین، اندازه و محتوای پلاک‌های حاوی کلسترول ماکروفاژها کاهش یافت. علاوه بر این، بیان ژن ABCA1 افزایش یافت. آن‌ها نتیجه گرفتند که می‌توان از درمان miR-33 به عنوان راهبرد درمانی تصلب شرایین استفاده کرد.

این پژوهش نشان داد تمرین ورزشی می‌تواند بر MicroRNA‌های مرتبط با متابولیسم کلسترول تأثیر بگذارد. با توجه به این یافته و نیز همسویی نتایج این پژوهش با مطالعاتی که به درمان آنتی miR-33 و miR-144 پرداختند، به نظر می‌رسد که می‌توان از اثرهای مثبت تمرینات ورزشی به جای درمان دارویی در مهار این MicroRNA‌ها استفاده کرد که باعث افزایش بیان ABCA1 برای ترویج جریان کلسترول ماکروفاژها و کاهش تصلب شرایین می‌شود.

- 
1. Marquart
  2. Karunakaran
  3. Takahiro

**پیام مقاله:** با توجه به نتایج این پژوهش مبنی بر تأثیر فعالیت ورزشی بر miR-144 و miR-33 و نقش مهم این MicroRNAها در متابولیسم لیپیدها، به نظر می‌رسد می‌توان از اثرهای مفید فعالیت ورزشی بر مهار MicroRNAهای مرتبط با متابولیسم چربی و انتقال معکوس کلسترول بهره گرفت. با توجه به اینکه این پژوهش اولین پژوهش انجام شده در این زمینه است، انجام پژوهش‌ها بیشتری برای تأیید این نتایج روی دیگر MicroRNAهای اثرگذار بر متابولیسم، ضروری به نظر می‌رسد.

### منابع

1. Wang JC, Bennett M. Aging and atherosclerosis: mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence. *Circ Res.* 2012;111(2):245-59.
2. North BJ, Sinclair DA. The intersection between aging and cardiovascular disease. *Circ Res.* 2012;110(8):1097-108.
3. Rotllan N, Price N, Pati P, Goedeke L, Fernandez-Hernando C. microRNAs in lipoprotein metabolism and cardiometabolic disorders. *Atherosclerosis.* 2016;246:352-60.
4. Ono K, Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Kimura T. MicroRNAs and high-density lipoprotein cholesterol metabolism. *Int Heart J.* 2015;56(4):365-71.
5. Ono K, Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Yokode M, et al. MicroRNA-33a/b in lipid metabolism - novel "thrifty" models. *Circ J.* 2015;79(2):278-84.
6. Abente EJ, Subramanian M, Ramachandran V, Najafi-Shoushtari SH. MicroRNAs in obesity-associated disorders. *Arch Biochem Biophys.* 2016;589:108-19.
7. de Aguiar Vallim T, Tarling E, Kim T, Civelek M, Baldan A, Esau C, et al. MicroRNA-144 regulates hepatic ABCA1 and plasma HDL following activation of the nuclear receptor FXR. *Circulation Research.* 2013;112:300648.
8. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet.* 2008;9(2):102-14.
9. Rottiers V, Näär AM. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(4):239-50.
10. Horie T, Baba O, Kuwabara Y, Chujo Y, Watanabe S, Kinoshita M, et al. MicroRNA-33 deficiency reduces the progression of atherosclerotic plaque in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *J Am Heart Assoc.* 2012;1(6):e003376.
11. Rayner KJ, Sheedy FJ, Esau CC, Hussain FN, Temel RE, Parathath S, et al. Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2011;121(7):2921-31.
12. de Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Kim T, Civelek M, Baldán Á, Esau C, et al. MicroRNA-144 regulates hepatic ATP binding cassette transporter A1 and plasma

- high-density lipoprotein after activation of the nuclear receptor farnesoid X receptor novelty and significance. *Circ Res.* 2013;112(12):1602-12.
13. Ramírez CM, Rotllan N, Vlassov AV, Dávalos A, Li M, Goedeke L, et al. Control of cholesterol metabolism and plasma high-density lipoprotein levels by microRNA-144 novelty and significance. *Circ Res.* 2013;112(12):1592-601.
  14. Mann S, Beedie C, Jimenez A. Differential effects of aerobic exercise, resistance training and combined exercise modalities on cholesterol and the lipid profile: Review, synthesis and recommendations. *Sports Medicine.* 2014;44(2):211-21.
  15. B. K. Pedersen<sup>1</sup>, B. Saltin<sup>2</sup>. Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease. *Scand J Med Sci Sports.* 2006;1:3-63.
  16. Aadahl M, von Huth Smith L, Pisinger C, Toft U, Glümer C, Borch-Johnsen K, et al. Five-year change in physical activity is associated with changes in cardiovascular disease risk factors: the Inter99 study. *Prev Med.* 2009;48(4):326-31.
  17. LeMura LM, von Duvillard SP, Andreacci J, Klebez JM, Chelland SA, Russo J. Lipid and lipoprotein profiles, cardiovascular fitness, body composition, and diet during and after resistance, aerobic and combination training in young women. *Eur J Appl Physiol.* 2000;82(5-6):451-8.
  18. O'Donovan G, Owen A, Bird SR, Kearney EM, Nevill AM, Jones DW, et al. Changes in cardiorespiratory fitness and coronary heart disease risk factors following 24 wk of moderate-or high-intensity exercise of equal energy cost. *J Appl Physiol.* 2005;98(5):1619-25.
  19. Ghanbari-Niaki A. Treadmill exercise training enhances ATP-binding cassette protein-A1 (ABCA1) expression in male rats' heart and gastrocnemius muscles. *Int J Endocrinol Metab.* 2010;8(4):206-10.
  20. Tofighi A, Rahmani F, Qarakhanelou BJ, Babaei S. The effect of regular aerobic exercise on reverse cholesterol transport A1 and Apo lipoprotein A-I gene expression in inactive women. *Iran Red Crescent Med J.* 2015;17(4):e26321.
  21. Vanhees L, Geladas N, Hansen D, Kouidi E, Niebauer J, Reiner Ž, et al. Importance of characteristics and modalities of physical activity and exercise in the management of cardiovascular health in individuals with cardiovascular risk factors: Recommendations from the EACPR (Part II). *European Journal of Preventive Cardiology.* 2012;19(5):1005-33.
  22. Rayner KJ, Suarez Y, Dávalos A, Parathath S, Fitzgerald ML, Tamehiro N, et al. MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science.* 2010;328(5985):1570-3.
  23. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature.* 2004;431(7006):350-5.
  24. van der Meer SF, Jaspers RT, Jones DA, Degens H. The time course of myonuclear accretion during hypertrophy in young adult and older rat plantaris muscle. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger.* 2011;193(1):56-63.
  25. Leandro CG, Levada AC, Hirabara SM, MANHAS-DE-CASTRO R, De-Castro CB, Curi R, et al. A program of moderate physical training for wistar rats based on maximal oxygen consumption. *J Strength Cond Res.* 2007;21(3):751-6.
  26. Rasoul Rezaei M.N, Mohammadreza Bigdeli, Fariba Khodagholi, Abbas Haghparast,. Effect of eight weeks continues and HIIT exercises on VEGF-A and VEGFR-2 levels in stratum, hippocampus and cortex of wistar rat brain. *Physiology of Exercise and Physical Activity.* 2016(16):1213-21. (In Persian).



27. Kim SH, Kim GJ, Umemura T, Lee SG, Cho KJ. Aberrant expression of plasma microRNA-33a in an atherosclerosis-risk group. *Mol Biol Rep.* 2017;44(1):79-88.
28. Rotllan N, Ramirez CM, Aryal B, Esau CC, Fernandez-Hernando C. Therapeutic silencing of microRNA-33 inhibits the progression of atherosclerosis in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(8):1973-7.
29. Ramirez CM, Rotllan N, Vlassov AV, Davalos A, Li M, Goedeke L, et al. Control of cholesterol metabolism and plasma high-density lipoprotein levels by microRNA-144. *Circ Res.* 2013;112(12):1592-601.
30. Canfran-Duque A, Ramirez CM, Goedeke L, Lin CS, Fernandez-Hernando C. microRNAs and HDL life cycle. *Cardiovasc Res.* 2014;103(3):414-22.
31. de Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Kim T, Civelek M, Baldan A, Esau C, et al. MicroRNA-144 regulates hepatic ATP binding cassette transporter A1 and plasma high-density lipoprotein after activation of the nuclear receptor farnesoid X receptor. *Circ Res.* 2013;112(12):1602-12.
32. Kazeminasab F, Marandi M, Ghaedi K, Esfarjani F, Moshtaghian J. Effects of a 4-week aerobic exercise on lipid profile and expression of *LXRα* in rat liver. *Cell Journal (Yakhteh).* 2017;19(1):45.
33. Marquart TJ, Allen RM, Ory DS, Baldán Á. miR-33 links SREBP-2 induction to repression of sterol transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2010;107(27):12228-32.
34. Karunakaran D, Thrush AB, Nguyen MA, Richards L, Geoffrion M, Singaravelu R, et al. Macrophage mitochondrial energy status regulates cholesterol efflux and is enhanced by anti-miR33 in atherosclerosis. *Circ Res.* 2015;117(3):266-78.
35. Horie T, Baba O, Kuwabara Y, Chujo Y, Watanabe S, Kinoshita M, et al. MicroRNA-33 deficiency reduces the progression of atherosclerotic plaque in *ApoE*<sup>-/-</sup> mice. *J Am Heart Assoc.* 2012;1(6):e003376.
36. Rayner KJ, Sheedy FJ, Esau CC, Hussain FN, Temel RE, Parathath S, et al. Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2011;121(7):2921-31.

## ارجاع دهی

طاهری گندمانی مهدی، فرامرزی محمد، بنی طالبی ابراهیم، همتی روح‌الله. بررسی هشت هفته تمرین استقامتی تناوبی و تداومی بر MicroRNAs های مرتبط با انتقال معکوس کلسترول در موش‌های سالمند نژاد ویستار. فیزیولوژی ورزشی. پاییز ۱۳۹۷؛ ۱۰(۳۹): ۲۰۲-۱۸۵. شناسه دیجیتال: 10.22089/spj.2018.5727.1757

Taheri Gandomany M, Faramarzi M, Banitalebi E, Hemmati R. The Effect of Eight Weeks of Continuous and Interval Endurance Training on Micro-RNAs Associated with Reverse Cholesterol Transport in Elderly Wistar Rats. *Sport Physiology.* Fall 2018; 10(39): 185-202. (In Persian). Doi: 10.22089/spj.2018.5727.1757

## The Effect of Eight Weeks of Continuous and Interval Endurance Training on Micro-RNAs Associated with Reverse Cholesterol Transport in Elderly Wistar Rats

M. Taheri Gandomany<sup>1</sup>, M. Faramarzi<sup>2</sup>, E. Banitalebi<sup>3</sup>,  
R. Hemmati<sup>4</sup>

1. PhD Student in Exercise Physiology, Shahrekord University
2. Associate Professor in Exercise Physiology, Shahrekord University\*
3. Assistant Professor in Exercise Physiology, Shahrekord University
4. Assistant Professor of Biology, Shahrekord University

Received: 2018/04/19

Accepted: 2018/08/04

---

### Abstract

Aging is associated with changes in blood cholesterol and subsequent cardiovascular disease. The purpose of this study was to investigate the effect of continuous and interval endurance training on micro-RNAs associated with reverse cholesterol transport in Wistar elderly rats. 30 male Wistar rats (23-month-old) With an average weight of 441.75 gram, were randomly divided into two experiment and one control group including continuous training (n = 10), Interval training (n = 10) and the control group (n = 10). Continuous and interval exercise included 8 weeks of training on treadmill and 5 days a week which the continuous group started training with 60% maximum speed for 16 minutes in the first week and continued with 70% maximum speed for 45 minutes from the fourth week to the end of the eighth week. The interval group started exercise at 40-80% of the maximum speed from the first week and continued at 30 to 110% of the maximum speed from the fourth week to the end of the eighth week. After completing training, expression of miR-33 and miR-144 and mRNA expression of ABCA1 were measured RT-PCR. The statistical analysis was performed using ANOVA test with significance level (P <0.05). The expression of miR-33a and miR-144 decreased in both continuous and interval groups compared to control group, but this decrease was only significance for miR-33a (P <0.001). After 8 weeks of training, mRNA expression of ABCA1 gene in the continuous and interval group increased compared to control group. However, this increase was statistically significance only for the interval group (P=0.002). There was no statistically significance difference between the effect of interval and continuous exercises on miR-33a and miR-144 expression. However, there was a significance difference in the mRNA expression of ABCA1 in both continuous and interval groups (P=0.028). Considering the results, it appears that both continuous and interval endurance trainings can decrease miR-33a expression and subsequently increase mRNA expression of the ABCA1, which this increase is higher in interval training compare continuous training.

**Keywords:** miR-33a, miR-144, ABCA1, Continuous and Interval Trainings

---

\* Corresponding Author

E-mail: md.faramarzi@gmail.com