

مقاله اصلی

تغییرات بیان ژن‌ها هموباکس-C8 و C9 بافت چربی موش‌های صحرایی چاق متعاقب تمرین استقامتی و تحریک الکتریکی با محدودیت کالری

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۱۳- تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۵/۱۹

خلاصه

مقدمه: چاقی یک بیماری فزاینده و عامل بیماری‌های قلبی عروقی، پرفشاری خونی، چربی خون، دیابت و سرطان است. لذا هدف از پژوهش حاضر بررسی تغییرات بیان ژن‌ها هموباکس-C8 و C9 بافت چربی موش‌های صحرایی چاق متعاقب تمرین استقامتی و تحریک الکتریکی با محدودیت کالری بود.

روش کار: در این مطالعه تجربی کنترل شده با گروه شاهد ۳۵ سر موش صحرایی نر و بیستار (۸ هفته‌ای با وزن 20.0 ± 1.9 گرم) پس القا چاقی و افزایش وزن به‌طور تصادفی به ۵ گروه ۷ تایی بدون روزه، روزه‌دار، روزه‌دار-تمرین استقامتی، روزه‌دار-تحریک الکتریکی و روزه‌دار-تمرین استقامتی-تحریک الکتریکی تقسیم شدند. گروه‌های برای چهار هفته‌ای تحت تمرین استقامتی (سرعت ۱۰ تا ۲۰ متر/دقیقه و مدت ۲۰ تا ۴۰ دقیقه)، تحریک الکتریکی (دستگاه فوت شوک ۰/۵ میلی آمپر و ۲۰ دقیقه) و روزه‌داری (۸ به ۱۶ ساعت) قرار گرفتند. پس از تمرین و بی‌هوشی، نمونه‌برداری بافت چربی صورت گرفت و پس از انجام فرایندهای ملکولی بیان ژن‌ها با استفاده از دستگاه Real time-PCR اندازه‌گیری شد. برای آنالیز داده‌ها از آزمون تحلیل واریانس دوطرفه در سطح معنی‌داری $p < 0.05$ و نرم‌افزار گراف‌پد استفاده شد.

نتایج: نشان داد تمرین استقامتی و تلفیق آن با تحریک الکتریکی منجر به افزایش معنی‌دار هموباکس-C8 و کاهش معنی‌دار بیان هموباکس-C9 موش‌های صحرایی نسبت به گروه چاق روزه‌دار شد ($P=0.001$ و $P=0.001$). همچنین تحریک الکتریکی افزایش معنی‌داری ژن هموباکس-C8 ($P=0.001$) و کاهش معنی‌داری هموباکس-C9 را نشان داد ($P=0.001$).

نتیجه‌گیری: به‌نظر می‌رسد تمرین استقامتی در نمونه‌های چاق روزه‌دار با افزایش مقادیر هموباکس-۸ و کاهش هموباکس-۹ نتوانسته است باعث تبدیل بافت چربی سفید به بافت قهوه‌ای شود.

کلمات کلیدی: چاقی، روزه‌داری، تمرین استقامتی، تحریک الکتریکی، هموباکس-C8، هموباکس-C9

ابوالفضل آبابی هزاوه^۱

مه‌دی مرادی^۲

محمد ملکی پویا^{۳*}

بهرام عابدی^۴

^۱دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، واحد محلات، دانشگاه آزاد اسلامی، محلات، ایران

^۲استادیار، فیزیولوژی ورزشی، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران

^۳استادیار، فیزیولوژی ورزشی، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران (* نویسنده مسئول)

^۴استاد، فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

Email: maleki.p@gmail.com

مقدمه

چاقی با تجمع چربی غیر طبیعی یا بیش از حد بدن، از سال ۱۹۷۵ تا به حال بیش از سه برابر افزایش پیدا کرده است. این بیماری منجر به مرگ حداقل ۲/۸ میلیون در هر سال به دلیل عوارض آن می‌شود (۱). در گزارش سازمان بهداشت جهانی^۱ (WHO) نشان داده شده است ۳۹ درصد از جمعیت جهان در اضافه وزن و ۱۳ درصد در محدوده چاقی قرار دارند که بسیار نگران کننده می‌باشد (۱). همچنین در ایران چاقی تا سال ۲۰۱۵ برابر ۱۱ و اضافه وزن ۱۸ میلیون نفر گزارش شده است. این آمار تا سال ۲۰۲۱ نزدیک به ۲۱ درصد رشد داشته است (۲). چاقی از دلایل مستقیم و غیرمستقیم بیماری‌های مزمن و مهمی مانند قلبی-عروقی، فشار خون بالا، دیابت، سرطان، سندرم متابولیک، کلیه، سکنه مغزی، استئوآرتریت، آپنه، افسردگی، اضطراب غیره بوده و منجر به کاهش نزدیک به ۱۰ سال از عمر انسان می‌گردد (۳). چاقی به عنوان رشد اضافی بافت چربی^۲ (AT) در نتیجه افزایش تعداد و اندازه سلول‌های ادیپوسیت‌ها تعریف شده است. بدن انسان از انواع متفاوتی از ادیپوسیت‌ها با نام بافت چربی سفید^۳ (WAT)، قهوه‌ای^۴ (BAT) و شبه قهوه‌ای^۵ (بژ یا برایت BLA) تشکیل شده و در فرآیندهای مهمی مانند متابولیسم، ذخیره چربی و گرمایی مشارکت دارد (۴). در بافت چربی BLA تنظیم کننده‌های متعددی وجود دارد که در نمو و تغییر فنوتیپ‌ها اثرگذار هستند. مجموعه‌ای از این تنظیم کننده‌های بسیار مهم و موثر در چاقی پروتئین‌های با نام هومئوتیک^۶ می‌باشد. پروتئین‌های هومئوتیک از طریق مجموعه‌ای از ژن‌های تنظیمی به نام ژن‌های هومئوتیک رمزگردانی می‌شوند (۵). ژن‌های هومئوتیک یا نمو به عنوان تنظیم کننده‌های جدیدی در تولید سلول چربی (ادیپوزن) شناخته شده‌اند. به نظر می‌رسد این پروتئین‌ها از طریق تنظیم سلول‌های بنیادی در تمایز سلول‌های اجدادی نقش موثری دارند

(۶) همچنین این نشان‌گرها دارای عوامل رونویسی هومئوتیکی بوده و در فعال یا مهار کردن بیان ژن‌ها به عنوان یک مکمل و عامل اصلی در رشد منظم ارگانیسم دیگر نقش اساسی دارد. ژن‌های هومئوتیک حاوی دنباله‌ای از DNA به نام هوموباکس می‌باشند (۷). هومئوتیک پروتئین هوموباکس یا هوکس پروتئین^۷ C8- (Hox-C8) و هوکس پروتئین^۸ C9- (Hox-C9) از جمله ژن‌های هستند که در نمو و تمایز بافت چربی سفید و BLA نقش موثری دارند. Hox-C8 در سلول‌های اجدادی چربی سفید یا سلول‌های بنیادی مشتق شده از بافت چربی^۹ (ADSCs) انسان وجود دارد (۶، ۸) Hox-C8 به عنوان یک نشان‌گر مهم بافت چربی سفید و تنظیم کننده منفی مهم در القا نمو ادیپوسیت‌های قهوه‌ای در سلول‌های اجدادی بافت چربی است. این پروتئین از طریق مهار بیان ژن پروتئین متصل شونده به عامل پاسخ دهنده cAMP^{۱۰} تنظیم کننده نمو ادیپوسیت قهوه‌ای بوده و موجب مهار بیان ژن پروتئین غیرجفت کننده یک^{۱۱} (UCP-1) و مهار نمو سلول‌های شبه قهوه‌ای در بافت چربی سفید می‌شود (۶، ۸) از این رو Hox-C8 به عنوان عامل تنظیمی بافت چربی سفید قلمداد می‌شود (۹). از سوی دیگر Hox-C9 به میزان زیاد در بافت چربی شبه قهوه‌ای و در مقابل به میزان بسیار اندک در بافت چربی سفید بیان می‌شود و در سازوکاری نامشخص موجب تحریک افزایش ادیپوسیت‌های قهوه‌ای در بافت چربی سفید می‌شود (۱۰، ۱۱)؛ از این رو Hox-C9 به عنوان یک نشان‌گر بافت چربی BLA و عامل تنظیمی بریت شناخته می‌شود (۱۱). نشان داده شده است. علاوه بر درمان‌های پزشکی این بیماران روش‌های متفاوت دیگری در طب مکمل در ارتباط با چاقی و بیماری‌های مرتبط با وجود دارد. تمرینات ورزشی به عنوان یک محرک مناسب برای قهوه‌ای شدن بافت چربی سفید مطرح شده است (۱۲) به طوری

7. Homeobox C8

8. Homeobox C9

9. Adipose Derived Stem Cells

10. cAMP-Response Element-Binding Protein

11. Uncoupling Protein 1

1. World Health Organization

2. Adipose Tissue

3. White Adipose Tissue

4. Brown Adipose Tissue

5. Brown-Like Adipocyte (Brite) Beige

6. Homeotic Protein

که در تحقیق آدیس و همکاران (۲۰۱۸) نشان داده شده است تمرینات ورزشی موجب قهوه‌ای شدن بافت چربی سفید احشائی و زیرپوستی می‌شود (۱۳). از سوی دیگر، مطالعات روی نشان‌گر مهم قهوه‌ای شدن بافت چربی سفید یعنی پروتئین UCP-1 همین یافته را تأیید کرده است (۱۴). نتایج پژوهش دانشیار و همکاران (۲۰۱۷) بیان کرد که تمرین استقامتی تغییری در بیان ژن‌های HOXC8 و HOXC9 بافت چربی زیرپوستی موش‌های صحرایی ایجاد نکرد (۱۵). همچنین کاتو و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند انجام تمرینات ورزشی منجر به کاهش بیان ژن‌های HOXC8 و HOXC9 موش‌های صحرایی می‌شود (۱۶). از دیگر روش‌های که در دین اسلام برای سلامتی و محدودیت در کالری، به‌ویژه افراد دارای اضافه وزن و چاق توصیه شده روزه‌داری است. ماه مبارک رمضان را می‌توان فرصتی مناسب برای جلوگیری از خطر افزایش وزن و کاهش چاقی در بین مردم مطرح کرد. در حال حاضر رژیم روزه‌داری مورد توجه قرار گرفته و در کاهش وزن از آن استفاده می‌شود (۱۷). تأثیر روزه‌داری بر ترکیب بدنی، تغییرات هورمونی و عوامل التهابی و ریسک فاکتورهای قلبی عروقی در برخی از تحقیقات تأیید شده است (۱۸). در مطالعه فارسی و همکاران (۲۰۱۲) نشان داده شده وزن، BMI و چربی بدن در هفته سوم ماه رمضان در مقایسه با یک هفته قبل یا بعد از روزه‌داری رمضان کاهش معنی‌داری داشته است (۱۹). همچنین آنالیز و تجزیه و تحلیل متابولیسم لپیدی قبل از ماه رمضان در مقایسه با مقادیر پس از ماه رمضان نشان داد، تری‌گلیسیرید در مردان، LDL در هر دو جنس کاهش و HDL در زنان افزایش یافت (۲۰). لذا در پژوهش فوق به‌عنوان یک مداخله در افراد چاق و دارای اضافه وزن به‌عنوان یک مسله مورد بررسی قرار گرفته است. همچنین استفاده از تحریک الکتریکی (ES) جدایی از فعالیت بدنی و روزه‌داری به‌عنوان یک مدل‌یته دیگر در کاهش وزن مورد تأیید است (۲۱). در کنار تمرینات استقامتی ES موجب فراخوانی حداکثری واحدهای عضلانی و کاهش بافت چربی می‌شود (۲۲). ایوانی و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند ES منجر به افزایش ترموزن

بافت‌های چربی BAT می‌گردد (۲۳). همچنین تحقیقات همیدا و همکاران (۲۰۱۱) نیز نشان داده شد ES موجب القای لیپولیز سلول‌های چربی می‌گردد (۲۴). با توجه به مطالعات انجام شده انتظار می‌رود ES در کنار فعالیت بدنی یک مداخله جدیدی برای توانبخشی بیماران چاق باشد. پژوهش‌گران، تحقیقی که در آن به بررسی ژن‌های هموباکس C8 و C9 با فعالیت‌های بدنی، روزه‌داری و تحریک الکتریکی در نمونه‌های چاق در بافت چربی احشایی باشد مشاهده نکردند. بحث فاکتورهای موثر بر فرآیند لیپولیز و میانجی‌ها و چگونگی تأثیرپذیری آن به فعالیت‌های ورزشی، روزه‌داری و تحریک الکتریکی کاملاً جدید است و مطالعه‌ای در این زمینه صورت نگرفته و نظریه واحدی نیز در این خصوص وجود ندارد. با توجه به پیشینه و نتایج متفاوت پژوهشی، این که تمرینات هوازی متعاقب متغیرهای مستقل تحقیقی می‌تواند با تأثیرگذاری بر ادیوسیت‌ها منجر به چربی‌سوزی شود به مطالعه بیش‌تری نیاز است. لذا به‌دلیل در دست نبودن مطالعه‌ای در ارتباط با مسئله فوق، محقق به‌دنبال پاسخگویی به این مسئله است که آیا تغییرات بیان ژن‌ها هموباکس- C8 و C9 بافت چربی موش‌های صحرایی چاق متعاقب تمرین استقامتی و تحریک الکتریکی با محدودیت کالری معنی‌دار است.

روش کار

نمونه‌ها و محیط پژوهش: در این پژوهش پس‌آزمون با گروه کنترل، از ۳۵ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار هشت هفته‌ای با میانگین وزنی 19 ± 20 گرم که از دانشگاه بقیه‌اله ایران خریداری شده بود استفاده گردید. این حیوانات در قفس‌های پلی‌کربنات شفاف و در شرایط کنترل شده با دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد، رطوبت 50 ± 5 درصد و چرخه روشنایی-تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت با دسترسی کنترل شده با آب و غذای ویژه موش‌های صحرایی نگاه‌داری شدند. پس از انتقال حیوانات به محیط پژوهش به مدت یک هفته جهت سازگاری با محیط آزمایشگاه بدون مداخله‌ای در شرایط جدید نگاه‌داری شدند. در ادامه پرتکل القاچاقی شروع شد و سپس موش‌های صحرایی چاق شده به‌طور تصادفی به پنج گروه

¹. Electrical Stimulation

شیب صفر درجه عمل گرم کردن انجام شد. تمرین استقامتی روی نوارگردان برای چهار هفته، هر هفته پنج جلسه، هر جلسه به مدت ۶۰ دقیقه، با سرعت ۲۰ تا ۲۹ متر/ دقیقه و شدت بین ۵۴ تا ۶۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی انجام شد (جدول ۱). سرد کردن هم همانند گرم کردن بعد از پایان تمرین انجام شد (۳۰).

جدول ۱. برنامه تمرین استقامتی

ردیف	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم	هفته پنجم
مرحله اول	آشناسازی				
سرعت (متر/دقیقه)	۱۰	۲۰	۲۵	۲۷	۲۹
مدت (دقیقه)	۱۰		۶۰		
روز	۵		۵		
شدت	-		۶۵-۵۴ درصد VO_{2max}		
شیب	۰		۰		

برنامه تحریک الکتریکی: برای ایجاد ES در این پژوهش از دستگاه استیمولیتور^۴ R12 ساخت شرکت پرتو دانش استفاده شد. میزان شدت جریان الکتریسیته در این برنامه ۰/۵ میلی آمپر، به مدت ۲۰ دقیقه و ۳ روز در هفته در نظر گرفته شد. جریان از طریق خروجی‌های استیمولیتور به دستگاه فوت شوک^۵ ارسال گردید. برنامه ES بعد از تمرین استقامتی و در داخل جعبه فوت شوک انجام شد (۳۱، ۳۲).

استخراج بافت: گروه‌ها دو روز پس از پایان پروتکل تمرین و تحریک با ترکیبی از کتامین (۷۵ میلی گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی گرم/کیلوگرم) به روش درون صفاقی بی‌هوش و کشته شدند. در کلیه مراحل مختلف پژوهش ضمن رعایت مسائل اخلاقی سعی شد از هر گونه آزار جسمی و روش‌های غیر ضروری اجتناب شود. سپس نمونه بافت چربی احشایی موش‌های صحرایی برداشته و با استفاده از محلول بافر فسفات سالین^۶ (PBS) شستشو شد و بلافاصله بعد از آن در ازت

هفت‌تایی، ۱-چاق بدون روزه (CO)، ۲-روزه‌دار چاق (OB.FA)، ۳-روزه‌دار چاق-تمرین استقامتی^۳ (MIT.FA)، ۴-روزه‌دار چاق-تحریک الکتریکی (ES.FA) و ۵-روزه‌دار چاق-تمرین استقامتی-تحریک الکتریکی (MIT.ES.FA) تقسیم شدند. **برنامه القا چاقی:** برای چاق کردن حیوانات از رژیم غذایی استاندارد با برنامه غذایی پرچرب موش‌های صحرایی که از بادام زمینی، شکلات شیری و بیسکویت‌های شیرین به نسبت ۳:۲:۱ تشکیل شده بود استفاده شد. این رژیم حاوی ۲۰ گرم پروتئین، ۲۰ گرم چربی، ۴۸ گرم کربوهیدرات، چهار گرم فیبر بوده که در هر ۱۰۰ گرم رژیم غذایی مخلوط و سپس آسیاب و در اختیار آن‌ها قرار گرفت تا بر حسب شاخص لی وزن موش‌های صحرایی در محدود ۳۱۰ گرم قرار گیرد (۲۵).

برنامه غذایی با محدودیت کالری: پس از القا چاقی کلیه گروه‌های پژوهشی (به جز کنترل) تحت برنامه محدودیت غذایی (هشت ساعت محدودیت -۱۶ ساعت بدون محدودیت کالری) (۲۶) و با غذای استاندارد (۲۳ گرم پروتئین، ۴۹ گرم کربوهیدرات، چهار گرم چربی و پنج گرم فیبر در هر ۱۰۰ گرم) قرار گرفتند. همچنین آب مورد نیاز هر حیوان به صورت آزاد و در بطری‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری ویژه حیوانات آزمایشگاهی در ساعات غیر روزه‌داری با رعایت دیگر پرتکل‌ها در اختیار حیوانات قرار گرفت (۲۷).

آشنایی با تردمیل: مرحله آشناسازی موش‌های صحرایی با تردمیل در هفته دوم، به مدت یک هفته، هفته‌ای پنج روز، هر روز به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ۱۰ متر/دقیقه انجام شد. بررسی‌ها نشان داده است که این میزان تمرین در حدی نیست که منجر به تغییرات بارزی در ظرفیت هوازی نمونه‌های تحقیقی شود. برای دوییدن موش‌های صحرایی از طریق صدا و تحریک شرطی‌سازی استفاده شد تا از نزدیک شدن، استراحت و برخورد با بخش شوک الکتریکی در بخش انتهای دستگاه خودداری کنند (۲۸، ۲۹).

برنامه تمرینی: پس از سازگاری، القا چاقی و آشناسازی با تردمیل، ابتدای به مدت پنج دقیقه، با سرعت ۱۰ متر/دقیقه و با

4. Electromodule

5. Footshock

6. Phosphate Buffered Saline

1. Control

2. Obesity

3. Moderate Intensity Training

سانتی گراد، ۶۰ دقیقه در ۴۷ درجه سانتی گراد و در نهایت پنج دقیقه در ۸۵ درجه سانتی گراد انکوبه شد. در انتها نمونه‌ها با استفاده از دستگاه نانودراپ^{۱۰} (سونی مدل ۲۰۴۸) از نظر کمی و کیفی بررسی و همچنین کیفیت DNA نمونه‌ها نیز بر روی ژل الکتروفورز لود و مورد بررسی قرار گرفت.

Real Time-PCR: واکنش زنجیره پلی‌مراز PCR با استفاده از دستگاه لایو تکنولوژی آمریکا و مواد اولیه شرکت کیاژن^{۱۱} در آزمایشگاه دانشگاه آزاد اراک انجام گردید. در همین راستا مقدار ۶/۵ میکرولیتر آب دیس، ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس^{۱۲}، ۰/۵ میکرولیتر روکس^{۱۳}، دو میکرولیتر پرایمر پیش‌رو و معکوس با یک میکرولیتر cDNA ترکیب گردید تا یک محلول ۲۰ میکرولیتری تشکیل گردد. این ترکیب در دستگاه ریل‌تایم با دما و سیکل‌های متفاوت مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. توالی پرایمرها نیز از پایگاه داده‌های مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی^{۱۴} (NCBI) تهیه و سپس طراحی پرایمرهای هر دو ژن با استفاده از برنامه پرایمر مورد بررسی قرار گرفت که، در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲. پرایمرهای به کار رفته در PCR

نام ژن	توالی پرایمرها
HOX-C8	پیش‌رو CCCACCTGAGAGAAAGC
	معکوس CTCCTGCTTCAGTCGTC
HOX-C9	پیش‌رو GGAGTTTCACTACAATCGC
	معکوس CCGATTTTGGAAACCAGATC
HKG^{۱۵}	باز ۱۶ <u>CCCAAGCCGCATTTTT</u>
	باز ۱۸ <u>TCCGCTTTTCTTGTCAT</u>

تجزیه و تحلیل آماری: بیان کمی نتایج ژن‌های HOX-C8 و HOX-C9 با روش $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ انجام شد و همچنین توزیع نرمال آن با آزمون شاپیرو-ویلک تحت بررسی قرار گرفت. برای مقایسه میانگین بین گروه‌ها، از آنالیز واریانس (آنوآ) دوطرفه و آزمون

مایع منجمد گردید. این بافت تا زمان استخراج RNA به فریزر با دمای منفی ۸۰ درجه سانتی گراد انتقال داده شد.

استخراج RNA: برای شروع ارزیابی ملکولی ابتدا بافت‌های چربی از فریزر خارج و کوبیده شد. به پودر ناشی از بافت هموزن ۷۰۰ میکرولیتر بافر محلول^۱ (LR) و ۳/۵ میکرولیتر محلول بتامرکاپتواتانول^۲ (β -ME مرک آلمان) اضافه و نمونه‌ها برای یک دقیقه ورتکس^۳ شدند. در ادامه به نمونه‌ها ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم^۴ (TCM مرک آلمان) اضافه گردید و ۳۰ ثانیه ورتکس مجدد انجام شد. سپس میکروتیوب‌های حاوی ترکیبات فوق برای ۳ دقیقه در دمای اتاق انکوبه^۵ و در سانتریفوژ (سیگما آمریکا) برای ۱۰ دقیقه با ۱۱ هزار دور/ دقیقه قرارداده شد. در ادامه ۴۰۰ میکرولیتر از فاز رویی محلول به یک میکروتیوب جدید انتقال داده و با ۴۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق^۶ (EA مرک آلمان) میکس گردید و مجدد سانتریفوژ انجام شد. پس از خروج محلول داخلی کلکتور، عمل واشینگ^۷ برای دو بار تکرار گردید و سانتریفوژ شد. ستون استخراج شده به یک میکروتیوب جدید انتقال و با محلول ۵۰ میکرولیتر ایلوشن بافر^۸ (BS سیگما الدریچ آلمان) ترکیب گردید. محلول حاصل سانتریفوژ شده و سپس RNA استخراج و در یخچال برای مراحل دیگر نگهداری شد.

استخراج cDNA: مطابق پروتکل شرکت سازند (Fermentas, K1622, USA) به‌ازای استخراج هر RNA یک میکروتیوب جدید در نظر گرفته شد. بر حسب میکروتیوب‌های حاوی RNA معادل یک نانوگرم ترکیب بافر ۱۰ میکرولیتر و دو میکرولیتر آنزیم اضافه گردید تا حجم نهایی با افزودن آب دیس^۹ (DW) به ۲۰ میکرولیتر افزایش یابد. سپس میکروتیوب‌های حاوی ترکیبات فوق به مدت زمان ۱۰ دقیقه در ۲۵ درجه

۱. Buffer Solution Laboratory Reagent

۲. Beta Mercaptoethanol

۳. Vortex

۴. Chloroform or Trichloromethane

۵. Incubation

۶. Ethanol Absolute

۷. Washing

۸. Buffer Solution

۹. DEPC Water

۱۰. Nanodrop

۱۱. Kiagene

۱۲. Mastermix

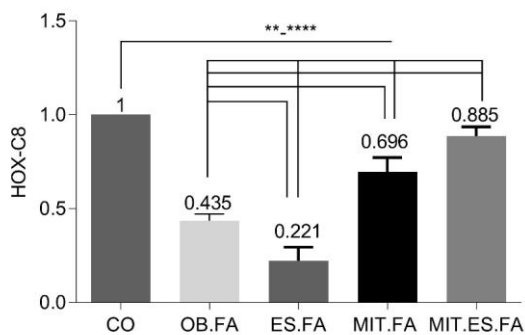
۱۳. Rox

۱۴. National Center for Biotechnology Information

۱۵. Housekeeping Gene

MIT.ES.F OB.FA با A	۰/۶۶۰	۰/۰۴	۱۳	۱۶	**** ۰/۰۰۱
MIT.ES.F CO با A	۰/۹۴۲	۰/۰۴	۱۳	۴/۲	۰/۰۶۱۲
ES.FA OB.FA با	۰/۳۲۸	۰/۰۴	۱۳	۷/۸	**** ۰/۰۰۱
ES.FA CO با	۰/۶۱۰	۰/۰۴	۱۳	۲۸	**** ۰/۰۰۱
OB.FA CO با	۰/۷۱۷	۰/۰۴	۱۳	۲۰	**** ۰/۰۰۱

* نشانه تفاوت معنی‌دار بین گروه CO: کنترل بدون روزه و سایر گروه‌ها؛ OB.FA: چاق-روزه‌دار، ES.FA: تحریک الکتریکی روزه‌دار MIT.FA: فعالیت استقامتی روزه‌دار؛ سطح معنی‌داری $p < ۰/۰۰۱$



شکل ۱. مقایسه بین گروه‌های چاق شرکت کننده در تحقیق؛ * نشانه تفاوت معنی‌دار بین گروه CO: کنترل بدون روزه و سایر گروه‌ها؛ OB.FA: چاق-روزه‌دار؛ ES.FA: تحریک الکتریکی روزه‌دار؛ MIT.FA: فعالیت استقامتی روزه‌دار؛ سطح معنی‌داری $p < ۰/۰۰۱$

آمار توصیفی و تحلیلی سطوح HOX-C9 با توجه به مداخله MIT و ES در جدول ۴ ارائه شده است. همچنین شکل ۲ مقدار بیان ژن HOX-C8 در گروه‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد. نتایج تحلیل واریانس تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها نشان داد. نتایج ناشی از آزمون تعقیبی توکی کاهش معنی‌داری در گروه‌های ES.FA، MIT.FA و MIT.ES.FA نسبت به OB.FA نشان داد ($F = ۹/۱۵$ و $P = ۰/۰۰۰۱$). نتایج نشان داد گروه OB.FA نسبت به گروه CO افزایش معنی‌داری را به همراه داشت ($F = ۱۱$ و $P = ۰/۰۰۰۱$). نتایج ناشی از آزمون تعقیبی توکی افزایش غیر معنی‌داری در گروه MIT.FA نسبت به ES.FA و CO ($F = ۲$ و $P = ۰/۶۲۵$) و کاهش معنی‌داری نسبت به OB.FA نشان داد ($F = ۱۳$ و $P = ۰/۰۰۰۱$). گروه ES.FA کاهش معنی‌داری نسبت به OB.FA و MIT.ES.FA به

تعقیبی توکی استفاده شد. تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری گراف‌پد (نسخه ۸) در سطح معنی‌داری ($p < ۰/۰۵$) و سطح اطمینان ۹۵٪ انجام شد.

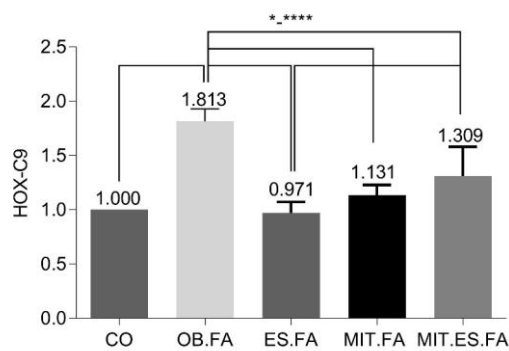
ملاحظات اخلاقی: این مطالعه با کد اخلاق IR.IAU.ARAK.REC.1403.101 توسط کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک به تصویب رسیده است.

نتایج

آمار توصیفی و تحلیلی سطوح HOX-C8 با توجه به مداخله MIT و ES در جدول ۳ ارائه شده است. همچنین شکل ۱ مقدار بیان ژن HOX-C8 در گروه‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد. آزمون تعقیبی تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها نشان داد. نتایج ناشی از واریانس تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها نشان داد. نتایج ناشی از آزمون تعقیبی توکی کاهش معنی‌داری در گروه‌ها OB.FA، ES.FA و MIT.FA، نسبت به CO گزارش کرد ($F = ۲۰$ و $P = ۰/۰۰۰۱$). از طرفی نشان داده شد گروه MIT.FA نسبت به OB.FA و ES.FA افزایش معنی‌داری را نشان داد ($F = ۱۳$ و $P = ۰/۰۰۰۱$). همچنین این افزایش بین گروه MIT.ES.FA و کلیه گروه‌ها جز CO نیز معنی‌دار بود ($F = ۱۵$ و $P = ۰/۰۰۰۴$). اما آزمون توکی تفاوت معنی‌داری بین گروه MIT.ES.FA با CO نشان نداد ($F = ۴/۲$ و $P = ۰/۰۶۱$).

جدول ۳. توصیف و مقایسه متغیر HOX-C8 در گروه‌های تحقیق

گروه‌ها	میانگین	مقدار SE	مقدار DF	مقدار F	مقدار P
MIT.FA با MIT.ES.FA	۰/۷۹۱	۰/۰۴	۱۳	۶/۷	۰/۰۰۱**
MIT.FA با ES.FA	۰/۶۹۶	۰/۰۴	۱۳	۱۸	**** ۰/۰۰۱
MIT.FA با OB.FA	۰/۵۶۵	۰/۰۴	۱۳	۹/۶	**** ۰/۰۰۱
MIT.FA با CO	۰/۸۴۲	۰/۰۴	۱۳	۱۱	**** ۰/۰۰۱
MIT.ES.FA با ES.FA	۰/۵۵۳	۰/۰۴	۱۳	۲۴	**** ۰/۰۰۱



شکل ۲. مقایسه بین گروه‌های شرکت کننده در تحقیق؛ *نشانه تفاوت معنی‌دار بین گروه OB.FA و سایر گروه‌ها؛ ES.FA: تحریک الکتریکی روزه‌دار؛ MIT.FA: فعالیت استقامتی روزه‌دار؛ MIT.ES.FA: فعالیت استقامتی-تحریک الکتریکی روزه‌دار؛ سطح معنی‌داری $p < 0.0001$

بحث

هدف از پژوهش حاضر بررسی تاثیر یک دوره تمرین استقامتی به همراه تحریک الکتریکی بر بیان ژن‌های هموباکس-8 و C9 بافت چربی موش‌های صحرایی چاق روزه‌دار بود. از یافته‌های مهم این پژوهش می‌توان به کاهش معنی‌دار بیان HOX-C8 نسبت به گروه کنترل و افزایش معنی‌دار آن نسبت به گروه چاق روزه‌دار اشاره نمود. همچنین کاهش معنی‌داری در بیان سطوح ژن HOX-C9 در کلیه گروه‌ها نسبت به گروه چاق روزه‌دار مشاهده شد. شواهد علمی نشان می‌دهد بافت چربی یک اندام فعال ایمونولوژیک است که تأثیرات متعددی بر تنظیم متابولیسم و انرژی سیستمیک دارد. ایمنی بافت چربی توسط فعل و انفعالات بین سلول‌های چربی و سلول‌های ایمنی مختلف تنظیم و تعدیل می‌شود. با این وجود، مکانیسم‌های اساسی که تعاملات بین سلولی و سلول‌های چربی و سلول‌های ایمنی در بافت چربی به طور کامل مشخص نشده‌اند. اخیراً نشان داده شده است که سلول‌های چربی از متابولیت‌های لیپیدی به عنوان یک واسطه کلیدی برای شروع و واسطه‌گری پاسخ‌های ایمنی در بافت‌های چربی مختلف استفاده می‌کند. آنتی ژن‌های لیپیدی ادیوسیت‌ها و ترشح متابولیت‌های لیپیدی از عوامل تعیین کننده شدت سیستم ایمنی می‌باشد. علاوه بر این، فعل و انفعالات بین

همراه داشت ($F=7/8$ و $P=0/017$) و گروه MIT.ES.FA افزایش معنی‌داری نسبت به ES.FA و کاهش معنی‌دار نسبت به OB.FA نشان داد ($F=4/6$ و $P=0/034$)

جدول ۴. توصیف و مقایسه متغیر HOX-C9 در گروه‌های تحقیق

گروه‌ها	میانگین	مقدار SE	مقدار F	مقدار P
MIT.FA با MIT.ES.FA	1/220	0/10	13	2/4
MIT.FA با ES.FA	1/051	0/10	13	2/2
MIT.FA با OB.FA	1/472	0/10	13	9/4
MIT.FA با CO	1/065	0/10	13	1/8
MIT.ES.FA با A	1/140	0/10	13	4/6
MIT.ES.FA با A	1/561	0/10	13	6/9
MIT.ES.FA با A	1/154	0/10	13	4/2
ES.FA با OB.FA	1/392	0/10	13	11
ES.FA با CO	0/985	0/10	13	0/4
OB.FA با CO	1/496	0/10	13	11

*نشانه تفاوت معنی‌دار بین گروه OB.FA و سایر گروه‌ها؛ ES.FA: تحریک الکتریکی روزه‌دار؛ MIT.FA: فعالیت استقامتی روزه‌دار؛ MIT.ES.FA: فعالیت استقامتی-تحریک الکتریکی روزه‌دار؛ سطح معنی‌داری $p < 0.0001$

سلول‌های چربی و سلول‌های ایمنی چربی در کنترل سرنوشت چربی و عملکرد بر روی محرک‌های متابولیک درگیر است (۳۳). تجمع چربی منجر به در ادیپوسیت‌ها با ترشح CD1d منجر به فعال‌سازی آنتی‌ژن‌های لیپیدی خواهد شد و این آنتی‌ژن‌ها با اثرگذاری بر گیرنده‌های سلول T^1 (TCR) سلول‌های کشنده^۲ iNKT را فعال خواهد کرد. ترشح iNKT منجر به فعالیت فاکتورهای التهابی در اینترلوکین ۲، ۴، ۱۰ و ۱۳ می‌شود که این امر که این امر منجر منجر به فعال‌سازی فرایندهای پیش التهابی دیگری در ماکروفاژها، نوتروفیل‌ها و CD8 بافت چربی افراد چاقی می‌شود. پس چاقی با روند فوق و ترشح عوامل التهابی مانند پروستاگلاندین‌ها منجر به التهاب و بیماری خواهد شد (۳۴). ژن‌های HOX هم در بافت WAT شکمی و زیرجلدی و هم در بافت BAT بیان می‌شوند (۳۵) و همچنین این ژن‌ها می‌توانند تفاوت‌های ناحیه‌ای در ویژگی‌های عملکردی انواع مختلف WAT را نمایان کنند (۳۶). HOX-C8 از این خانواده به میزان زیادی در بافت چربی احشائی، در حد متوسطی در بافت چربی زیرپوستی و در خیلی کم در BAT بیان می‌شود (۱۱). برهمین اساس، HOX-C8 به عنوان یک نشان‌گر مهم بافت چربی WAT شناخته شده است (۸) در واقع افزایش بیان ژن HOX-C8 منجر به سفیدی بیش‌تر WAT می‌شود. همچنین HOX-C8 به عنوان یک تنظیم‌کننده منفی در القا رشد و نمو ادیپوسیت‌های قهوه‌ای در سلول‌های بنیادی بافت چربی عمل کرده و با سرکوب بیان پروتئین CREBP منجر به مهار بیان پروتئین UCP-1 و مهار نمو سلول‌های BLA در بافت چربی سفید می‌شود (۶، ۸). براساس نتایج پژوهش فوق انجام فعالیت بدنی در حین روزه‌داری منجر به افزایش معنی‌داری ژن HOX-C8 نسبت به گروه چاق روزه‌دار شد. با افزایش این ژن سفیدتر شدن بافت

WAT بیش‌تر شده و از طرفی از قهوه‌ای شدن بافت چربی سفید جلوگیری شد. مطالعات خیلی محدودی به بررسی این ژن با تمرینات ورزشی پرداخته است. در همین راستا دانشیار و همکاران (۲۰۱۷) نشان داده شد تمرینات استقامتی منجر به افزایش بیان ژن HOX-C8 بافت چربی موش‌های صحرایی شده است. اما این افزایش باعث معنی‌داری در این پروتئین نشده است (۱۵). در تضاد با نتایج تحقیق فوق کاتو و همکاران (۲۰۱۸) در پژوهش خود به بررسی اثر نه هفته تمرین ورزشی بر بیان این ژن در بافت WAT اینگوینال، اپیدیدیم و مزنتریک موش‌های صحرایی جوان چاق پرداختند و نشان دادند تمرینات ورزشی باعث کاهش معنی‌دار بیان ژن HOX-C8 نسبت به گروه کنترل در بافت اینگوینال و کاهش غیر معنی‌دار آن در ادیپوسیت‌های دو بافت اپیدیدیم و مزنتریک شد (۱۶). دلیل این تضاد را شاید در نمونه‌های غیره روزه‌دار بدون تجمع چربی و با مدت فعالیت ورزشی بیش‌تر در این پژوهش بیان کرد. استفورد و همکاران (۲۰۱۵) همچنین نشان دادند تمرینات ورزشی بر مورفولوژی و عملکرد WAT برخی از ژن‌های Hox با رویکرد تعدیلی آن‌ها همراه می‌باشد. از این رو تنظیم پایینی از mRNA HOX-C8 در بافت چربی WAT کشاله ران ممکن است در ارتباط با به کارگیری ادیپوزست‌های بزرگ باشد (۳۷). ژن HOX-C9 به مقدار زیادی در بافت BLA و بسیار اندک در WAT بیان می‌شود. اما این پروتئین در بافت BAT بیان نشده و به عنوان یک نشان‌گر افزایش دهنده ادیپوسیت BLA شناخته شده است (۱۱). در واقع افزایش بیان HOX-C9 بر قهوه‌ای شدن بافت چربی WAT دلالت دارد. یافته این مطالعه نشان داد که تمرین استقامتی منجر به کاهش معنی‌داری در بیان ژن HOX-C9 شد. این کاهش بر این مطلب دلالت دارد که تمرین استقامتی در شرایط روزه‌داری میزان این نشان‌گر را در سلول‌های BLA افزایش نمی‌دهد و موجب قهوه‌ای شدن بافت چربی سفید

1. T Cell Receptor

2. Invariant NKT Cells

نمی‌گردد. در تحقیق حاضر کاهش معنی‌داری در بیان سطوح HOX-C9 نسبت به گروه چاق روزه‌دار مشاهده شد. مطالعات خیلی محدودی در ارتباط با بررسی ژن فوق با فعالیت بدنی بود. در راستای نتایج تحقیق فوق کاتو و همکاران (۲۰۱۸) در پژوهش خود به بررسی اثر نه هفته تمرین ورزشی بر بیان ژن HOX-C9 در بافت اینگوینال، اپیدیدیم و منتریک موش‌های صحرایی جوان چاق پرداختند و نشان دادند تمرینات ورزشی منجر به کاهش معنی‌دار بیان ژن HOX-C9 نسبت به گروه کنترل در بافت اینگوینال و اپیدیدیم نمونه‌های پژوهشی شد (۱۶). در تضاد با نتایج تحقیق فوق دانشیار و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند تمرینات استقامتی موجب افزایش غیرمعنی‌دار بیان ژن HOX-C9 بافت چربی موش‌های صحرایی شد (۱۵). از دلایل این تضاد می‌توان به پرتکل تمرینی، چاق نبودن نمونه‌ها و نداشتن محدودیت کالری غذایی اشاره نمود. در نهایت، مطالعات بیان شده هنوز مکانیسم‌های مولکولی اثر گذار بر تغییرات ژن‌های فوق را به‌روشنی بیان نکرده است و همچنین شواهد مستقیمی که ژن‌های Hox باعث فعال‌سازی یا سرکوب رونویسی ژن‌های مرتبط با BAT می‌شوند، وجود ندارد (۳۸). از دیگر نتایج تحقیق فوق کاهش معنی‌دار بیان ژن HOX-C8 و HOX-C9 در موش‌های صحرایی بعد ES نسبت به گروه چاق روزه‌دار بود. همچنین تلفیقی از ES و تمرین ورزشی منجر به افزایش معنی‌دار HOX-C8 و کاهش معنی‌دار HOX-C9 نسبت به گروه چاق روزه‌دار شد. در تحقیقی از ابل و همکاران (۲۰۰۶) نشان داده شد تحریک الکتریکی سیستم گوارشی^۱ (GES) تاثیر معنی‌داری در بافت چربی دارد (۲۱). همچنین چن و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند ES با افزایش قهوه‌ای شدن WAT می‌تواند همراه با یک رژیم غذایی کم‌چرب برای افزایش کاهش وزن در کنار سرکوب اشتها مورد استفاده قرار گیرد (۳۹). لی و همکاران (۲۰۲۰) نیز در

پژوهش خود تنظیم بالایی از ترموژنری بافت BAT را نشان دادند و بیان کردند تحریک عصبی الکتریکی منجر به افزایش موضعی گرما توسط BAT شده بدون آنکه تأثیری بر دمای هسته سلولی داشته باشد (۴۰). این روش درمانی منجر به افزایش تولید محتوای تیروزین هیدروکسیلاز^۲ (TH) در پایانه‌های عصبی شده و به دنبال آن افزایش فعالیت سمپاتیکی را به همراه خواهد داشت. همچنین در این مکانیزم افزایش فسفوریلاسیون لیپاز حساس به هورمون^۳ (HSL) هم‌زمان با کاهش لیپدهای داخل سلولی در بافت BAT بدون اینکه بر جذب حاد مواد مغذی از پلاسما تأثیر بگذارد مشاهده شد (۴۰). به نظر می‌رسد نتایج مطالعات فوق همسو با کاهش مقادیر ژن HOX-C8 بوده و قابل ذکر هست به دلیل جدید بودن موضوع و تحقیقات مربوط به بازتوانی ورزشی به همراه تحریک الکتریکی در شرایط روزه‌داری و بررسی اثرات متقابل آن با تحریک‌ها و شدت‌های متفاوت و به‌ویژه در غالب بیان ژن نیاز به تحقیقات بیش‌تری خواهد داشت و پیشنهادی در این خصوص مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد تمرین استقامتی نمونه‌های روزه‌دار چاق با افزایش مقادیر هموباکس-۸ و کاهش هموباکس-۹ نتوانسته است باعث تبدیل بافت چربی سفید به قهوه‌ای شود و تأثیری در کاهش وزن نداشته است. همچنین در خصوص تحریک الکتریکی و تلفیق آن با تمرین استقامتی در افراد چاق روزه‌دار نیازمند به مطالعه بیش‌تری می‌باشد.

حامی مالی

این تحقیق هیچ‌گونه کمک مالی از سازمان‌های تأمین مالی در بخش‌های عمومی، تجاری یا غیرانتفاعی دریافت نکرد.

تضاد منافع

². Tyrosine Hydroxylase

³. Hormone Sensitive Lipase

¹. Gastrointestinal Electrical Stimulation.

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافی در این مقاله حاصل رساله دکتری نویسنده اول بوده و از همه پژوهش وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

References

1. Organization. WH. Facts in Pictures: Obesity. **Available from:** <https://www.who/news-in-pictures/detail/6-facts-on-obesity-2022>
2. Abiri B, Ahmadi AR, Amini S, Akbari M, Hosseinpanah F, Madinehzad SA, Hejazi M, Rishehri AP, Naserghandi A, Valizadeh M. Prevalence of overweight and obesity among Iranian population: a systematic review and meta-analysis. *J Health Popul Nutr.* 2023 Jul 24;42(1):70. **doi:** 10.1186/s41043-023-00419-w.
3. Fruh SM. Obesity: Risk factors, complications, and strategies for sustainable long-term weight management. *J Am Assoc Nurse Pract.* 2017 Oct;29(S1):S3-S14. **doi:** 10.1002/2327-6924.12510.
4. Frühbeck G, Becerril S, Sáinz N, Garrastachu P, García-Velloso MJ. BAT: a new target for human obesity? *Trends Pharmacol Sci.* 2009 Aug;30(8):387-96. **doi:** 10.1016/j.tips.2009.05.003.
5. Krumlauf R. Hox genes in vertebrate development. *Cell.* 1994 Jul 29;78(2):191-201. **doi:** 10.1016/0092-8674(94)90290-9.
6. Nakagami H. The mechanism of white and brown adipocyte differentiation. *Diabetes Metab J.* 2013 Apr;37(2):85-90. **doi:** 10.4093/dmj.2013.37.2.85.
7. Gehring WJ, Hiromi Y. Homeotic genes and the homeobox. *Annu Rev Genet.* 1986;20:147-73. **doi:** 10.1146/annurev.ge.20.120186.001051.
8. Mori M, Nakagami H, Rodriguez-Araujo G, Nimura K, Kaneda Y. Essential role for miR-196a in brown adipogenesis of white fat progenitor cells. *PLoS Biol.* 2012;10(4):e1001314. **doi:** 10.1371/journal.pbio.1001314.
9. Hansen JB, Kristiansen K. Regulatory circuits controlling white versus brown adipocyte differentiation. *Biochem J.* 2006 Sep 1;398(2):153-68. **doi:** 10.1042/BJ20060402.
10. Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem.* 2010 Mar 5;285(10):7153-64. **doi:** 10.1074/jbc.M109.053942.
11. Waldén TB, Hansen IR, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, "brite," and white adipose tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012 Jan 1;302(1):E19-31. **doi:** 10.1152/ajpendo.00249.2011.
12. De Matteis R, Lucertini F, Guescini M, Polidori E, Zeppa S, Stocchi V, Cinti S, Cuppini R. Exercise as a new physiological stimulus for brown adipose tissue activity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2013 Jun;23(6):582-90. **doi:** 10.1016/j.numecd.2012.01.013.
13. Aldiss P, Betts J, Sale C, Pope M, Budge H, Symonds ME. Exercise-induced 'browning' of adipose tissues. *Metabolism.* 2018 Apr;81:63-70. **doi:** 10.1016/j.metabol.2017.11.009.
14. Afshari S, Mohammad-Amoli M, Daneshyar S. Comparison of Moderate and High Volume Aerobic Training on Gene Expression of Uncoupling Protein 1 (UCP-1) in Subcutaneous White Adipose Tissue of Wistar Rats. *Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism* 2017; 19 (1) :34-40 . [Link](#)
15. Daneshyar S, Kordi M. R, Afshari S, Kadivar M. The Effect of Endurance Training on Gene Expression of Homeobox C8 (HOXC8) and Homeobox C9 (HOXC9) in Adipose Tissue of Male Wistar Rats. *Sport Physiology*, 2021; 13(49): 17-38. **doi:** 10.22089/spj.2017.3986.1541.
16. Kato H, Shibahara T, Rahman N, Takakura H, Ohira Y, Izawa T. Effect of a 9-week exercise training regimen on expression of developmental genes related to growth-dependent fat expansion in juvenile rats. *Physiol Rep.* 2018 Sep;6(19):e13880. **doi:** 10.14814/phy2.13880.
17. Welton S, Minty R, O'Driscoll T, Willms H, Poirier D, Madden S, Kelly L. Intermittent fasting and weight loss: Systematic review. *Can Fam Physician.* 2020 Feb;66(2):117-125. **PMID:** 32060194

18. Mattson MP, Longo VD, Harvie M. Impact of intermittent fasting on health and disease processes. *Ageing Res Rev.* 2017 Oct;39:46-58. **doi:** 10.1016/j.arr.2016.10.005.
19. Faris MA, Kacimi S, Al-Kurd RA, Fararjeh MA, Bustanji YK, Mohammad MK, Salem ML. Intermittent fasting during Ramadan attenuates proinflammatory cytokines and immune cells in healthy subjects. *Nutr Res.* 2012 Dec;32(12):947-55. **doi:** 10.1016/j.nutres.2012.06.021.
20. Kul S, Savaş E, Öztürk ZA, Karadağ G. Does Ramadan fasting alter body weight and blood lipids and fasting blood glucose in a healthy population? A meta-analysis. *J Relig Health.* 2014 Jun;53(3):929-42. **doi:** 10.1007/s10943-013-9687-0.
21. Abell TL, Minocha A, Abidi N. Looking to the future: electrical stimulation for obesity. *Am J Med Sci.* 2006 Apr;331(4):226-32. **doi:** 10.1097/00000441-200604000-00010.
22. Greenway F, Zheng J. Electrical stimulation as treatment for obesity and diabetes. *J Diabetes Sci Technol.* 2007 Mar;1(2):251-9. **doi:** 10.1177/193229680700100216.
23. Iwami M, Alkayed F, Shiina T, Taira K, Shimizu Y. Activation of brown adipose tissue thermogenesis by electrical stimulation to the dorsal surface of the tissue in rats. *Biomed Res.* 2013 Aug;34(4):173-8. **doi:** 10.2220/biomedres.34.173.
24. Hamida ZH, Comtois AS, Portmann M, Boucher JP, Savard R. Effect of electrical stimulation on lipolysis of human white adipocytes. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2011 Apr;36(2):271-5. **doi:** 10.1139/h11-011.
25. Duarte FO, Sene-Fiorese M, Manzoni MS, de Freitas LF, Cheik NC, Garcia de Oliveira Duarte AC, Nonaka KO, Dâmaso A. Caloric restriction and refeeding promoted different metabolic effects in fat depots and impaired dyslipidemic profile in rats. *Nutrition.* 2008 Feb;24(2):177-86. **doi:** 10.1016/j.nut.2007.10.012.
26. Robert Paxton. Intermittent Fasting For Weight Loss a Beginners: the Secrets of Weight Loss with Total Health and Food Freedom. Edition K, editor. 2019. Available from: <https://a.co/d/g7HwTCj>
27. Guerra-Cantera S, Frago LM, Díaz F, Ros P, Jiménez-Hernández M, Freire-Regatillo A, Barrios V, Argente J, Chowen JA. Short-Term Diet Induced Changes in the Central and Circulating IGF Systems Are Sex Specific. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020 Aug 11;11:513. **doi:** 10.3389/fendo.2020.00513.
28. Khansooz M, Malekipooya M. The Response of Some Apoptotic Markers to Exercise Rehabilitation and Electrical Stimulation in Infarcted Rats. *Hormozgan Medical Journal.* 2024; 28(3):167-176. **doi:**10.34172/hmj.8274
29. Sayyah M, MalekiPooya M, Khansooz M, Pourabbasi MS, Irandoust K, Taheri M, H'mida C, Halouani J, Trabelsi K, Chtourou H, Bragazzi NL, Clark CCT. Responses of some matrix metalloproteinases activities to an acute session of endurance exercise and electrical stimulation in induced myocardial infarction in Wistar rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2022 Jul;26(13):4755-4761. **doi:** 10.26355/eurrev_202207_29200.
30. 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 J.* 2017 Apr-Jun;19(1):45-49. **doi:** 10.22074/cellj.2016.4871. Epub 2016 Dec 21.
31. Malekipooya M. Response of acute incremental aerobic activity along with electrical stimulation on some markers of angiogenesis in Isoproterenol induced rats. *EBNESINA* 2024; 26 (1) :28-37. [Link](#)
32. Malekipooya, M. The response of fibroblast-derived factor and endostatin to acute rehabilitation of physical activity along with electrical stimulation in infarcted rats. *Medical Journal of Mashhad university of Medical Sciences*, 2024; 67(4): 1249-1261. **doi:** 10.22038/mjms.2024.75760.4448
33. Park J, Sohn JH, Han SM, Park YJ, Huh JY, Choe SS, Kim JB. Adipocytes Are the Control Tower That Manages Adipose Tissue Immunity by Regulating Lipid Metabolism. *Front Immunol.* 2021 Jan 28;11:598566. **doi:** 10.3389/fimmu.2020.598566.
34. Vijayakumar A, Aryal P, Wen J, Syed I, Vazirani RP, Moraes-Vieira PM, Camporez JP, Gallop MR, Perry RJ, Peroni OD, Shulman GI, Saghatelian A, McGraw TE, Kahn BB. Absence of Carbohydrate Response Element Binding Protein in Adipocytes Causes Systemic Insulin Resistance and Impairs Glucose Transport. *Cell Rep.* 2017 Oct 24;21(4):1021-1035. **doi:** 10.1016/j.celrep.2017.09.091.
35. Cheung L, Gertow J, Werngren O, Folkersen L, Petrovic N, Nedergaard J, Franco-Cereceda A, Eriksson P, Fisher RM. Human mediastinal adipose tissue displays certain characteristics of brown fat. *Nutr Diabetes.* 2013 May 13;3(5):e66. **doi:** 10.1038/nutd.2013.6.
36. Brune JE, Kern M, Kunath A, Flehmig G, Schön MR, Lohmann T, Dressler M, Dietrich A, Fasshauer M, Kovacs P, Stumvoll M, Blüher M, Klötting N. Fat depot-specific expression of HOXC9 and HOXC10 may contribute to adverse fat distribution and related metabolic traits. *Obesity (Silver Spring).* 2016 Jan;24(1):51-9. **doi:** 10.1002/oby.21317.

37. Stanford KI, Middelbeek RJ, Goodyear LJ. Exercise Effects on White Adipose Tissue: Beiging and Metabolic Adaptations. *Diabetes*. 2015 Jul;64(7):2361-8. doi: 10.2337/db15-0227. Epub 2015 Jun 7. Erratum in: *Diabetes*. 2015 Sep;64(9):3334. **doi:** 10.2337/db15-er09.
38. Kato H, Ario T, Kishida T, Tadano M, Osawa S, Maeda Y, Takakura H, Izawa T. Homeobox A5 and C10 genes modulate adaptation of brown adipose tissue during exercise training in juvenile rats. *Exp Physiol*. 2021 Feb;106(2):463-474. **doi:** 10.1113/EP089114.
39. Chen SH, Chen HC, Hsieh CL, Chao PM. Electric stimulation of ears accelerates body weight loss mediated by high-fat to low-fat diet switch accompanied by increased white adipose tissue browning in C57BL/6 J mice. *BMC Complement Altern Med*. 2018 Dec 5;18(1):323. **doi:** 10.1186/s12906-018-2388-1.
40. Li Z, de Jonge WJ, Wang Y, Rensen PCN, Kooijman S. Electrical Neurostimulation Promotes Brown Adipose Tissue Thermogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 Sep 30;11:567545. **doi:** 10.3389/fendo.2020.567545

*Original Article***Expression changes of hemobox-C8 and C9 genes in adipose tissue of obese rats following endurance training and electrical stimulation with calorie restriction**

Received: 03/11/2024 - Accepted: 10/11/2025

Abolfazl Abaei Hazaveh¹
 Mehdi Morady²
 Mohammad Malekipooya*³
 Bahram Abedi⁴

¹ PhD Student in Physical Education, Mahallat Branch, Islamic Azad University, Mahallat, Iran.

² Assistant Professor, Department of Exercise Physiology, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran.

³ Assistant Professor, Department of Exercise Physiology, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran. (Corresponding Author)

⁴ Professor, Department of Exercise Physiology, Tehran north Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Email: maleki.p@gmail.com

Abstract

Introduction: Obesity is an increasing disease and the cause of cardiovascular diseases, high blood pressure, blood fat, diabetes and cancer. Therefore, the aim of the present study was to investigate the changes in the expression of hemobox-C8 and C9 genes in the adipose tissue of obese rats following endurance training and electrical stimulation with calorie restriction.

Methods: In this controlled experimental study with a control group of 35 male Wistar rats (8 weeks old weighing 200±19 g) after induction of obesity and weight gain were randomly divided into 5 groups of 7 without fasting, fasting, fasting-endurance exercise, fasting-electrical stimulation and Fasting-endurance exercise-electrical stimulation were divided. The groups were subjected to endurance training (speed 10 to 20 m/min and duration 20 to 40 minutes), electrical stimulation (foot shock device 0.5 mA and 20 minutes) and fasting (8 to 16 hours) for four weeks. After exercise and anesthesia, adipose tissue was sampled and after performing molecular processes, gene expression was measured using Real time-PCR machine. For data analysis, two-way analysis of variance test was used at the significance level of $p < 0.05$ and GraphPad software.

Results: The results showed that endurance training and its combination with electrical mobility led to a significant increase in hemobox-C8 and a significant decrease in the expression of hemobox-C9 in rats compared to the fasting obese group ($P=0.0001$ and $P=0.001$). Also, electrical stimulation showed a significant increase in hemobox-C8 gene ($P=0.0001$) and a significant decrease in hemobox-C9 gene ($P=0.0001$).

Conclusion: It seems that endurance training in fasting obese samples with increasing hemobox-8 and decreasing hemobox-9 levels could not cause the conversion of white adipose tissue to brown tissue.

Keywords: Obesity, Fasting, Endurance Training, Electrical Stimulation, Hemobox-C8, Hemobox-C9