

تأثیر یک دوره تمرین اینتروال با شدت بالا به همراه تحریک الکتریکی با فوت شوک بر فرایند آنژیوژنز بافت کبد موش‌های صحرایی چاق با محدودیت کالری

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۱/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۲۸

خلاصه

مقدمه: چاقی از عوامل اصلی بیماری‌های کبدی است. این مطالعه بررسی تأثیر ترکیب تمرینات اینتروال شدید (HIIT) و تحریک الکتریکی بر آنژیوژنز کبدی در موش‌های چاق تحت محدودیت کالری می‌باشد.

روش کار: در این مطالعه تجربی، ۳۵ سر موش صحرایی نر صحرایی نژاد ویستار (۸ هفته‌ای با وزن 19 ± 200 گرم) پس از القای چاقی به‌طور تصادفی به پنج گروه هفت تایی تایی تقسیم شدند: چاق بدون محدودیت کالری (کنترل)، چاق تحت محدودیت کالری، محدودیت کالری - تمرین تناوبی شدید، محدودیت کالری - تحریک الکتریکی، و محدودیت کالری - تمرین تناوبی شدید - تحریک الکتریکی. گروه‌ها، تحت برنامه محدودیت کالری (۱۶ ساعت مصرف غذا، هشت ساعت عدم مصرف)، تمرین تناوبی چهار هفته (سرعت ۱۰ تا ۲۰ متر بر دقیقه به مدت ۲۰ تا ۴۰ دقیقه)، و بعد از تمرین تحت تحریک الکتریکی (۰/۵ میلی آمپر برای ۲۰ دقیقه) قرار گرفتند. پس از گذشت دو روز از مداخله‌ها، نمونه‌برداری بافت قلب انجام و بیان ژن‌ها با روش Real Time-PCR، اندازه‌گیری شد. برای تحلیل داده‌ها، آزمون تحلیل واریانس یک طرفه در سطح معنی‌داری $p < 0/05$ و نرم‌افزار گراف پد استفاده شد.

نتایج: نتایج نشان داد تمرین تناوبی شدید در گروه چاق، تحت محدودیت کالری باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن VEGF نسبت به گروه چاق گردید ($F=4/3$ و $p=0/044$). HIIT باعث افزایش معنی‌دار FGF23 در این گروه نسبت به گروه چاق نشد ($F=3/0$ و $P > 0/001$). تلفیق HIIT با تحریک الکتریکی در گروه چاق تحت محدودیت کالری باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن VEGF ($F=21$ و $p < 0/001$) و کاهش معنی‌دار بیان ژن FGF23 نسبت به گروه چاق شد ($p < 0/001$) و $F=52$.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد، HIIT و تحریک الکتریکی حین محدودیت کالری می‌تواند باعث افزایش معنی‌دار ژن VEGF و کاهش معنی‌دار ژن FGF23 گروه چاق با محدودیت کالری شود و در سلامت کبد و افزایش آنژیوژنز موثر باشد. اما ابعاد آن نیازمند مطالعات بیشتری است.

کلمات کلیدی: چاقی، محدودیت کالری، تمرینات تناوبی با شدت بالا، تحریک الکتریکی، آنژیوژنز

فرخنده یار احمدی^۱

محمد ملکی پویا^{۲*}

سارا حامدی^۱

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی ورزشی، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران.

^۲ دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران.

نویسنده مسئول مکاتبات: دکتر محمد ملکی پویا،

دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد

اسلامی واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک،

ایران.

Email: Mo.malekipooya@iau.ac.ir

مقدمه

بر اساس تعریف سازمان بهداشت جهانی^۱ (WHO) چاقی^۲ (OB) یک بیماری مزمن پیچیده است، که با رسوبات بیش از حد چربی تعریف می‌شود و می‌تواند سلامت را مختل کند و خطر ابتلا به بیماری‌های متابولیک، و ابتلا به برخی سرطان‌ها را افزایش دهد (۱). بنا به گزارش WHO، ۳۹ درصد از جمعیت جهان با اضافه وزن دست و پنجه نرم می‌کنند، در حالی که ۱۳ درصد در محدوده‌ی چاقی قرار دارند، آماري که هشداري جدی برای سلامت جهانی محسوب می‌شود (۲). در ایران نیز آمارها نشان می‌دهند، چاقی و اضافه وزن تا سال ۲۰۱۵ به ترتیب نزدیک به ۱۱ و ۱۸ میلیون نفر را تحت تأثیر قرار داده است و این رقم تا سال ۲۰۲۱ تقریباً ۲۱ درصد افزایش یافته است (۳). از آنجایی که چاقی به شدت با بروز بیماری کبد چرب غیر الکلی^۳ (NAFLD)، که خود شامل تجمع چربی در کبد می‌باشد و می‌تواند منجر به التهاب و فیروز کبدی شود، مرتبط است، افراد مبتلا به NAFLD معمولاً دچار مقاومت به انسولین و اختلالات متابولیک هستند (۴). یک مرور سیستماتیک در سال ۲۰۲۳ نشان داد که شیوع NAFLD در بزرگسالان ایرانی ۳۶/۹ درصد و در کودکان ۶/۷ درصد است. این رقم در کودکان چاق به ۴۲ درصد می‌رسد، و این مطالعه به نگرانی‌های بهداشتی عمومی ناشی از شیوع بالای NAFLD در ایران تأکید کرده است (۵). از آنجایی که بافت چربی برای تأمین نیازهای متابولیکی خود به رشد رگ‌های خونی نیاز دارد، آنژیوژنز مناسب در بافت چربی برای حفظ عملکرد متابولیک و جلوگیری از هایپوکسی (کمبود اکسیژن) و التهاب ضروری است (۶). آنژیوژنز فرآیند تشکیل عروق خونی جدید از رگ‌های موجود است، که برای تأمین اکسیژن و مواد مغذی در بافت‌های مختلف بدن ضروری است که در مسیر آنژیوژنز بافت

چربی، بیومارکرهای VEGF^۵ و FGF23^۶ نقش بسیار مهمی را ایفا می‌کنند و چاقی بر سطوح VEGF و FGF23 نیز اثر می‌گذارد (۷). VEGF یک گلیکوپروتئین با وزن مولکولی تقریباً ۴۵ کیلو دالتون می‌باشد و به صورت دو زیر واحد مشابه^۷ (دایمری) وجود دارد و برای تمایز سلول‌های آندوتلیال و آنژیوژنز ضروری است (۸). افزایش بافت چربی در افراد مبتلا به چاقی، فاصله میان سلول‌های چربی^۸ (آدیپوسیت‌ها) و عروق خونی را بیشتر کرده و این امر موجب کاهش اکسیژن‌رسانی و ایجاد وضعیت هایپوکسی می‌شود (۹)، و این کمبود اکسیژن می‌تواند به تحریک تولید VEGF و عروق خونی جدید منجر شود (۶). فاکتور رشد فیروبلستی ۲۳ (FGF23) یک هورمون فسفاتوریک است که توسط سلول‌های استخوانی^۹ (استئوسیت‌ها و استئوبلاست‌ها) تولید می‌شود و نقش مهمی در تنظیم متابولیسم فسفات و ویتامین D دارد و این هورمون با اتصال به گیرنده‌های FGF در حضور پروتئین تراغشایی αKlotho، اثرات خود را اعمال می‌کند (۱۰). مطالعات نشان داده‌اند، سطح FGF23 در افراد چاق با شاخص‌های چاقی مانند^{۱۰} MI، نسبت دور کمر به باسن، و میزان چربی احشایی ارتباط مثبت دارد. این افزایش سطح FGF23 در افراد چاق ممکن است نشان‌دهنده افزایش ریسک ابتلا به بیماری‌های متابولیک و کبد چرب باشد و حذف هدمند FGF23 در مدل‌های حیوانی منجر به کاهش وزن بدن، کاهش توده چربی، و بهبود اختلالات متابولیک مرتبط با رژیم غذایی پرچرب شده است (۱۱). مطالعات نشان داده، سطح FGF23 به طور مستقل با^{۱۱} MAFLD (بیماری کبد چرب مرتبط با اختلال متابولیک) و میزان چربی کبد مرتبط است، و افراد مبتلا به MAFLD سطح بالاتری از FGF23 را دارا هستند (۱۲).

⁵ Vascular Endothelial Growth CRctor

⁶ Fibroblast Growth CRctor 21

⁷ Dimer

⁸ Adipocyte

⁹ Osteocytes & Osteoblasts

¹⁰ Body Mass Index

¹¹ Metabolic Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease

¹ World Health Organization

² Obesity

³ Non-Alcoholic CRtty Liver Disease

⁴ Hypoxia

کالری شامل کاهش انرژی دریافتی روزانه ۲۰ تا ۴۰ درصد از نیازهای پایه است (۲۰)، و مطالعات نشان داده اند، تنظیم تغذیه‌ای به‌ویژه، محدودیت کالری و روزه‌داری متناوب باعث افزایش بیان VEGF در بافت چربی سفید^۲ (WAT) می‌شوند و می‌توانند با تنظیم سطح VEGF در WAT موجب کاهش وزن، بهبود آنژیوژنز و کاهش التهاب، و بهبود NAFLD گردند (۲۱) و (۲۲). در همین راستا کیم و همکارانش (۲۰۱۷) در بررسی‌های خود به اثر روزه‌داری و محدودیت کالری در بهبود هموستاز متابولیک و ترموژنز بافت چربی از طریق افزایش بیان ژن VEGF و بهبود سلامت عروق و کاهش چاقی نیز اشاره کرده اند (۲۳). برخلاف مطالعات پیشین، برخی پژوهش‌ها به تأثیر کاهش محدودیت کالری بر سطح VEGF اشاره دارند (۲۱). همچنین تحقیقات نشان داده‌اند، محدودیت کالری می‌تواند سطح بیومارکر FGF23 را کاهش دهد، که این اثر عمدتاً ناشی از کاهش استرس متابولیکی و بهبود عملکرد کلی بدن است (۲۴). نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که برای درک کامل‌تر اثرات محدودیت کالری بر بیومارکرهای VEGF و FGF23، نیاز به مطالعات بیشتری است تا مسیرهای مولکولی و سازوکارهای تأثیر این روش روشن شود. بنابراین، در این پژوهش، محدودیت کالری به‌عنوان مداخله‌ای در افراد چاق، که احتمال ابتلا به بیماری‌های کبدی در آن‌ها بیشتر است، مورد بررسی قرار گرفته است. علاوه بر محدودیت کالری و تمرینات ورزشی اخیراً ES^۳ به‌عنوان روشی غیرتهاجمی و مؤثر برای بهبود ترکیب بدنی، کاهش چربی‌های اضافی، و افزایش تولید آزادسازی VEGF مورد توجه قرار گرفته است. مطالعات لیانو و همکارانش (۲۰۱۴) نشان می‌دهند که ES با تحریک سلول‌های اندوتلیال، تولید VEGF را افزایش داده و پاسخ‌های پیش‌آنژیوژنیک را تقویت کرده و فرآیند آنژیوژنز را در بدن بهبود می‌بخشد (۲۵). اما مطالعات کمی‌به‌بررسی اثر ES به تنهایی یا همراه با HIIT بر بیومارکر FGF23 پرداخته‌اند. با توجه به شیوع چاقی و نیاز به روش‌های غیرتهاجمی برای ارتقای

از این رو، انجام یک ارزیابی جامع برای تعیین مؤثرترین راهبردها در درمان چاقی ضروری است، چرا که این امر می‌تواند زمینه‌ساز بهبود سلامت و افزایش کیفیت زندگی افراد شود. به تازگی، تمرین تناوبی با شدت بالا^۱ (HIIT) به عنوان یک روش مؤثر، جهت درمان چاقی مورد توجه قرار گرفته است. HIIT مصرف اکسیژن را به حداکثر می‌رساند، عملکرد ورزشی را تقویت می‌کند، و با کاهش کربوهیدرات، چربی‌سوزی را افزایش می‌دهد (۱۳). در همین راستا، پژوهش خلفی و همکارانش (۲۰۲۱) نشان داده است که HIIT با کاهش چربی کبد، به پیشگیری و درمان NAFLD در بزرگسالان چاق یا دارای اضافه وزن کمک می‌کند. (۱۴)، و از آن جایی که یکی از مسیرهای بازسازی و ترمیم کبدی، آنژیوژنز است، HIIT می‌تواند از طریق فعال‌سازی مسیرهای سیگنالینگ سلولی مرتبط با هایپوکسی باعث افزایش حداکثر مصرف اکسیژن و بهبود آنژیوژنز در بافت‌های مختلف نیز شود (۱۵). اما بر خلاف مشاهدات ذکر شده رضایی و همکاران (۲۰۱۹) در مطالعه خود به اثر کاهش تمرینات ورزشی با شدت بالا بر بیان ژن VEGF دست یافتند (۱۶) علاوه بر بیومارکر VEGF، FGF23 نیز تحت تأثیر فعالیت بدنی قرار می‌گیرد. بررسی‌های سیستماتیک نشان داده‌اند که تمرینات استقامتی و هوازی می‌توانند غلظت FGF23 را کاهش دهند و به بهبودی‌های متابولیکی منجر شوند، که این تغییرات با بهبود جریان خون مرکزی و کاهش التهاب مرتبط هستند و با تنظیم بیومارکرهای التهابی، تأثیرات مثبتی بر کیفیت زندگی بیماران دارند (۱۷) با این حال، برخلاف پژوهش‌های پیشین، مطالعه‌ای به تأثیر افزایشی ورزش بر سطح FGF23 اشاره کرده است (۱۸). در مجموع، اثر HIIT بر FGF23 می‌تواند بسته به شرایط فردی و پارامترهای تمرینی متفاوت باشد. در این راستا، کنترل و مدیریت کالری مصرفی، به‌عنوان یکی از روش‌های توصیه‌شده در دین اسلام برای حفظ سلامتی و پیشگیری از اختلالات متابولیک، به‌ویژه برای افراد چاق یا دارای اضافه‌وزن، به‌عنوان راهی برای دستیابی به تعادل جسمانی و زندگی سالم‌تر تأکید شده است (۱۹). رژیم‌های محدودیت

² White Adipose Tissue

³ Electrical Stimulation

¹ High-Intensity Interval Training

تشکیل شده بود استفاده شد. این رژیم حاوی ۲۰ گرم (۲۰ درصد) پروتئین، ۳۵ گرم (۶۰ درصد) چربی، ۲۰ گرم (۲۰ درصد) کربوهیدرات، در هر ۱۰۰ گرم رژیم غذایی بوده است (۲۶). این رژیم غذایی به محض دریافت در کیسه‌های زیپ‌لاک تقسیم‌بندی و در بسته‌بندی‌های مهر و موم شده و مات که توسط تولیدکننده ارائه شده بود، ذخیره شد. سپس در دمای -20 درجه سانتی‌گراد منجمد شد. برای جلوگیری از چرخه‌های متعدد انجماد و ذوب، بخش‌های کوچکی از رژیم غذایی به اندازه نیاز از فریزر خارج شده و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق ذوب شدند تا به دمای اتاق برسند. این روش‌ها به منظور حفظ کیفیت رژیم غذایی و جلوگیری از اکسیداسیون و کاهش آب آن انجام شده‌اند (۲۷).

برنامه غذایی با محدودیت کالری: پس از القای چاقی کلیه گروه‌های پژوهشی (به‌جز کنترل) تحت برنامه ۱۶/۸ محدودیت غذایی (هشت ساعت محدودیت ۱۶ ساعت بدون محدودیت کالری) 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 به‌صورت آزاد و در بطری‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری ویژه حیوانات آزمایشگاهی در ساعات غیرروزه داری و محدودیت کالری با رعایت دیگر پرتکل‌ها در اختیار حیوانات قرار گرفت. با توجه به زمان‌بندی ایام رمضان محدودیت کالری هم برای یک ماه در برنامه غذای حیوانات در نظر گرفته شد (۲۸).

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 دیدن 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.

سلامت، این تحقیق تلاش می‌کند با ارائه راهکارهای درمانی نوین، کیفیت زندگی افراد چاق را بهبود بخشد. انتظار می‌رود که ترکیب ES و فعالیت بدنی به‌عنوان یک روش توانبخشی مؤثر برای بیماران کبدی و چاق به کار رود. هدف این مطالعه بررسی تأثیر تمرینات اینتروال با شدت بالا همراه با ES و فوت شوک بر فرآیند آئیزوزن بافت کبد در موش‌های صحرایی چاق تحت محدودیت کالری است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌ها و محیط پژوهش: در این پژوهش پس از آزمون با گروه کنترل، از ۳۵ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار هشت هفته‌ای با میانگین وزنی 200 ± 19 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 نگهداری شدند. پس از انتقال حیوانات به محیط پژوهش به مدت یک هفته جهت سازگاری با محیط آزمایشگاه بدون مداخله‌ای در شرایط جدید نگهداری شدند. در ادامه، پروتکل القای چاقی آغاز شد و سپس موش‌های صحرایی چاق شده به‌طور تصادفی، با استفاده از روش دستی و بر اساس وزن، به پنج گروه هفت‌تایی تقسیم شدند.

۱- محدودیت کالری چاق (CR)، ۲- محدودیت کالری چاق-تمرین تناوبی با شدت بالا (HIIT.CR)، ۳- محدودیت کالری چاق-تحریک الکتریکی (CR.ES)، ۴- محدودیت کالری چاق-تمرین تناوبی با شدت بالا-تحریک الکتریکی (ES.HIIT.CR) و ۵- چاق بدون محدودیت کالری، کنترل^۱ (CO) 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 به‌نسبت ۳:۱:۱

¹ caloric restriction

² Control

برنامه تمرینی: پس از سازگاری، القا چاقی و آشناسازی با تردمیل، ابتدای به مدت پنج دقیقه، با سرعت ۱۰ متر/دقیقه و با شیب صفر درجه عمل گرم کردن انجام شد. تمرین تناوبی با شدت بالا روی نوارگردان برای چهار هفته، هر هفته چهار جلسه، هر جلسه به مدت ۲۰ تا ۴۰ دقیقه، با سرعت ۲۵ تا ۳۰ متر/دقیقه و شدت بین ۷۰ تا ۹۵ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی انجام شد (جدول شماره ۱). سرد کردن هم همانند گرم کردن بعد از پایان تمرین انجام شد (۲۹).

جدول ۱. برنامه تمرین تناوبی با شدت بالا

هفته	سرعت (متر/دقیقه)	درصد VO2Max شدت	مدت (دقیقه)	روز	شیب
هفته اول (آشناسازی)	۱۰ متر/دقیقه	VO2Max (۲۰٪-۳۰٪)	۱۰ دقیقه	۵ روز	۰
هفته دوم	۲۵ تا ۳۰ متر/دقیقه و ۲۱ تا ۲۳ متر/دقیقه	VO2Max (۷۰٪-۹۵٪) و VO2Max (۵۰٪-۶۰٪)	۴ ست ۵×دقیقه + ۳ ست ۴×دقیقه	۴ روز	۰
هفته سوم	۲۵ تا ۳۰ متر/دقیقه و ۲۱ تا ۲۳ متر/دقیقه	VO2Max (۷۰٪-۹۵٪) و VO2Max (۵۰٪-۶۰٪)	۴ ست ۵×دقیقه + ۳ ست ۴×دقیقه	۴ روز	۰
هفته چهارم	۲۵ تا ۳۰ متر/دقیقه و ۲۱ تا ۲۳ متر/دقیقه	VO2Max (۷۰٪-۹۵٪) و VO2Max (۵۰٪-۶۰٪)	۴ ست ۵×دقیقه + ۳ ست ۴×دقیقه	۴ روز	۰
هفته پنجم	۲۵ تا ۳۰ متر/دقیقه و ۲۱ تا ۲۳ متر/دقیقه	VO2Max (۷۰٪-۹۵٪) و VO2Max (۵۰٪-۶۰٪)	۴ ست ۵×دقیقه + ۳ ست ۴×دقیقه	۴ روز	۰
گرم کردن و سرد کردن	۱۰ تا ۱۲+۶ متر/دقیقه	VO2Max (۳۰٪-۵۰٪)	۵ دقیقه	۴ روز	۰

(هفته دوم تا پنجم)

زایلازین (۱۰ میلی‌گرم/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. نمونه بافت تحقیقی از کبد موش‌های صحرایی برداشته و با استفاده از محلول بافر فسفات سالین^۲ (PBS) شستشو شد. سپس بلافاصله در ازت مایع منجمد گردید و تا زمان استخراج RNA به فریزر با دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد.

برنامه تحریک الکتریکی: برای ایجاد تحریک الکتریکی در این پژوهش از دستگاه استیمولیتور^۱ R12 ساخت شرکت پرتو دانش استفاده شد. میزان شدت جریان الکتریسیته در این برنامه ۰/۵ میلی‌آمپر، به مدت ۲۰ دقیقه و ۳ روز در هفته در نظر گرفته شد که از طریق خروجی‌های استیمولیتور با به دستگاه فوت شوک ارسال شد (۳۰) و (۳۱) و (۳۲)

استخراج بافت: گروه‌ها دو روز پس از پایان پروتکل تمرین و تحریک با ترکیبی از کتامین (۷۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) و

² Phosphate Buffered Saline

¹ Electromodule

استفاده از دستگاه نانودراپ^{۱۰} (سونی 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 پلی‌مرز PCR با استفاده از دستگاه لایو تکنولوژی آمریکا و مواد اولیه^{۱۱} شرکت کیاژن (به شماره FPKT029.0025) در آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی اراک انجام گردید. در همین راستا مقدار ۶/۵ میکرولیتر آب دیس، ۱۰ میکرولیتر^{۱۲} مسترمیکس، ۰/۵ میکرولیتر^{۱۳} روکس، 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

VEGF	پیش‌رو	CCACTAATTCTGTCCCCA
	معکوس	TCTCTTTTCTCTGCCTCC
FGF23	پیش‌رو	CCCTCTTTGCCTGGA
	معکوس	AACAGTTCCTACGCACC
HKG ¹⁵	باز ۱۶	CCCAAGCCGCATTTTT
	باز ۱۶	CCCAAGCCGCATTTTT T

استخراج RNA: برای شروع ارزیابی ملکولی ابتدا بافت‌ها از فریزر خارج و کوبیده شد. به پودر ناشی از بافت هموژن ۷۰۰ میکرولیتر بافر محلول^۱ (LR) و ۳/۵ میکرولیتر محلول بتامرکاپتوتانول^۲ (β-ME مرک آلمان) اضافه و نمونه‌ها برای یک دقیقه^۳ ورتکس 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^۵ انکوبه و در سانتریفوژ (سیگما آمریکا) برای ۱۰ دقیقه با ۱۱ هزار دور/ دقیقه قرار داده 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^۷ واشینگ 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 الدریج آلمان) ترکیب گردید. محلول حاصل سانتریفوژ شده و سپس RNA استخراج و در یخچال برای مراحل دیگر نگه‌داری شد.

استخراج cDNA: مطابق پروتکل شرکت سازنده (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 سانتی‌گراد، ۶۰ دقیقه در ۴۷ درجه سانتی‌گراد و در نهایت پنج دقیقه در ۸۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در انتها نمونه‌ها با

¹ Buffer Solution Laboratory Reagent

² Beta Mercaptoethanol

³ Vortex

⁴ Chloroform or Trichloromethane

⁵ Incubation

⁶ Ethanol Absolute

⁷ Washing

⁸ Buffer Solution

⁹ DEPC Water

¹⁰ Nanodrop

¹¹ Kiagene

¹² Mastermix

¹³ Rox

¹⁴ National Center for Biotechnology Information

¹⁵ Housekeeping Gene

شکل ۱ مقدار بیان ژن VEGF در گروه‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد. نتایج تحلیل واریانس تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها نشان داد. نتایج ناشی از آزمون تعقیبی توکی افزایش معنی‌داری در گروه HIIT.CR نسبت به HIIT.ES.CR و CO نشان داد (۰/۵۸۶) $\eta^2=۳/۱۶۷$ و $F=۳$ و $P<۰/۰۰۰۱$ (همچنین، تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های HIIT. CR و ES.CR مشاهده شد ($\eta^2=۰/۳۹$ و $F=۱/۴۴۶$ و $P=۰/۰۰۰۲$) این تفاوت بین گروه‌های HIIT.ES.CR و ES.CR و CO نیز معنی‌دار بود ($\eta^2=۰/۴۳۷$ و $F=۲/۴۹۸$ و $P<۰/۰۰۰۱$) همچنین گروه ES.CR نیز تفاوت معنی‌داری با گروه‌های CR ($\eta^2=۰/۲۵$ و $F=۴/۱$ و $P=۰/۰۵۵$) و CO ($\eta^2=۰/۵$ و $F=۱۲$ و $P<۰/۰۰۰۱$) نشان داد. اما بین HIIT.CR با CR تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($\eta^2=۰/۳۴۴$ و $F=۳/۶$ و $P=۰/۱۲۳۳$).

تجزیه و تحلیل آماری: بیان کمی نتایج ژن‌های بیومارکرهای VEGF و FGF23 با روش $\Delta\Delta Ct$ 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 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.1403.260 توسط کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک به تصویب رسیده است.

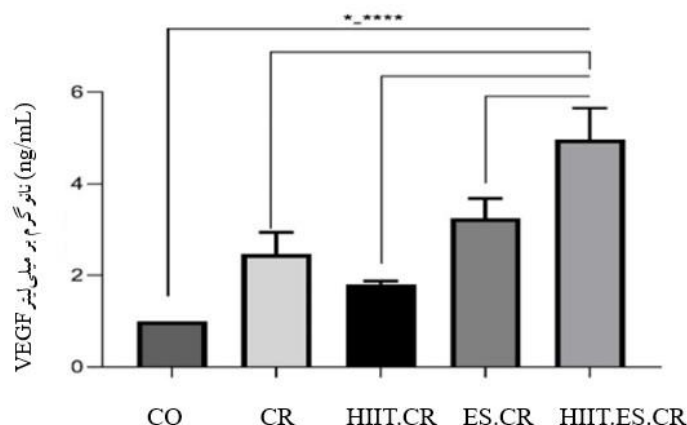
نتایج

آمار توصیفی و تحلیلی سطوح VEGF با توجه به مداخله تمرین تناوبی و تحریک الکتریکی در جدول ۳ ارائه شده است. همچنین

جدول ۳- توصیف و مقایسه متغیر VEGF در گروه‌های چاق شرکت کننده در تحقیق

مقدار P	مقدار η^2	مقدار F	مقدار DF	مقدار SE	میانگین	گروه‌ها
۰/۰۰۰۱****	۰/۵۸۶	۱۷	۱۳	۰/۲۶	۳/۳۸۹۴	HIIT.ES.CR با HIIT.CR
۰/۰۰۰۲****	۰/۳۹	۷/۷	۱۳	۰/۲۶	۲/۵۲۸۸	ES.CR با HIIT
۰/۱۲۳۳	۰/۳۴۴	۳/۶	۱۳	۰/۲۶	۲/۱۴۰۱	CR با HIIT.CR
۰/۰۴۴*	۰/۲۶۳	۴/۳	۱۳	۰/۲۶	۱/۴۰۲۹	CO با HIIT.CR
۰/۰۰۰۱****	۰/۴۳۷	۹/۲	۱۳	۰/۲۶	۴/۱۱۲۲	ES.CR با HIIT.ES.CR
۰/۰۰۰۱****	۰/۵۲	۱۳	۱۳	۰/۲۶	۳/۷۲۳۶	CR با HIIT.ES.CR
۰/۰۰۰۱****	۰/۶۳۶	۲۱	۱۳	۰/۲۶	۲/۹۶۸۴	CO با HIIT.ES.CR
۰/۰۵۵	۰/۲۵	۴/۱	۱۳	۰/۲۶	۲/۸۶۳۰	CR با ES.CR
۰/۰۰۰۱****	۰/۵	۱۲	۱۳	۰/۲۶	۲/۱۲۵۹	CO با ES.CR

*نشانه تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های مورد بررسی: CR چاق - محدودیت کالری و سایر گروه‌ها: HIIT.CR فعالیت تناوبی با شدت بالا - محدودیت کالری: HIIT.ES.CR فعالیت تناوبی با شدت بالا - تحریک الکتریکی - محدودیت کالری ES.CR تحریک الکتریکی - محدودیت کالری و CO کنترل بدون محدودیت کالری: سطح معنی‌داری $p<۰/۰۰۰۱$



شکل ۱. مقایسه بین گروه‌های شرکت کننده در تحقیق؛ ****نشانه تفاوت معنی دار بین گروه : CR چاق - محدودیت کالری و سایر گروه‌ها؛ HIIT-CR: فعالیت تناوبی با شدت بالا - محدودیت کالری؛ HIIT-ES-CR: فعالیت تناوبی با شدت بالا - تحریک الکتریکی - محدودیت کالری؛ ES-CR: تحریک الکتریکی - محدودیت کالری؛ CO: کنترل بدون محدودیت کالری؛ سطح معنی داری ($P < 0.0001$).

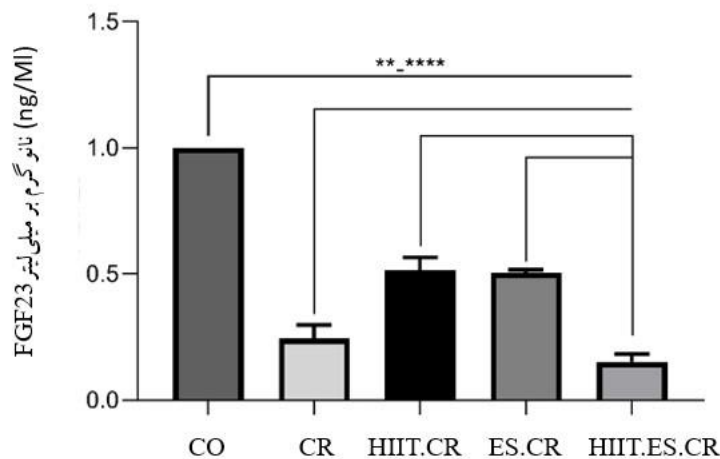
نسبت به گروه CO از کاهش معنی داری برخوردار بود ($F = 30$ و $\eta^2 = 0.937$ و $P < 0.0001$). همچنین افزایش معنی داری نسبت به گروه CR نشان داد ($F = 19$ و $\eta^2 = 0.890$) و اما نسبت به گروه CO کاهش معنی داری نشان داد ($P = 0.0001$ و $F = 31$ و $\eta^2 = 0.938$).

نتایج توصیفی و تحلیلی سطوح FGF23 با توجه به مداخله تمرین تناوبی و تحریک الکتریکی در جدول ۴ نشان داده شده است. نتایج تحلیل واریانس تفاوت معنی داری بین گروه‌ها نشان داد. نتایج ناشی از آزمون تعقیبی توکی افزایش معنی داری در گروه HIIT.CR نسبت به HIIT.ES.CR نشان داد ($F = 0.916$ و $P = 0.0001$). اما این تفاوت نسبت به گروه ES.CR معنی دار نبوده ($F = 0.63$ و $\eta^2 = 0.968$ و $P = 0.9379$) و

جدول ۴- توصیف و مقایسه متغیر FGF23 در گروه‌های چاق شرکت کننده در تحقیق

مقدار P	η^2	مقدار F	مقدار DF	مقدار SE	میانگین	گروه‌ها
0.0001****	0.916	22	13	0.02	0.3336	HIIT.ES.CR یا HIIT.CR
0.9379	0.968	0.63	13	0.02	0.2980	ES.CR یا HIIT.CR
0.0001****	0.895	17	13	0.02	0.38029	CR یا HIIT.CR
0.0001****	0.937	30	13	0.02	0.7576	CO یا HIIT.CR
0.0001****	0.916	22	13	0.02	0.1162	ES.CR یا HIIT.ES.CR
0.005**	0.788	5.7	13	0.02	0.1985	CR یا HIIT.ES.CR
0.0001****	0.964	52	13	0.02	0.5759	CO یا HIIT.ES.CR
0.0001****	0.890	16	13	0.02	0.1629	CR یا ES.CR
0.0001****	0.938	31	13	0.02	0.5403	CO یا ES.CR

مقایسه بین گروه‌های شرکت کننده در تحقیق؛ ****نشانه تفاوت معنی دار بین گروه : CR چاق - محدودیت کالری و سایر گروه‌ها؛ HIIT-CR: فعالیت تناوبی با شدت بالا - محدودیت کالری؛ HIIT-ES-CR: فعالیت تناوبی با شدت بالا - تحریک الکتریکی - محدودیت کالری؛ ES-CR: تحریک الکتریکی - محدودیت کالری؛ CO: کنترل بدون محدودیت کالری؛ سطح معنی داری ($P < 0.0001$).



شکل ۲. مقایسه بین گروه‌های شرکت کننده در تحقیق؛ ****نشانه تفاوت معنی دار بین گروه: CR چاق - محدودیت کالری و سایر گروه‌ها؛ HIIT-CR: فعالیت تناوبی با شدت بالا - محدودیت کالری؛ HIIT-ES-CR: فعالیت تناوبی با شدت بالا - تحریک الکتریکی - محدودیت کالری؛ ES-CR: تحریک الکتریکی - محدودیت کالری؛ CO: کنترل بدون محدودیت کالری؛ سطح معنی داری ($P < 0.0001$).

بحث

هدف از پژوهش حاضر، بررسی تأثیر یک دوره تمرینات اینتروال با شدت بالا به همراه تحریک الکتریکی با فوت شوک بر فرآیند آنژیوژنز بافت کبد موش‌های صحرائی چاق با محدودیت کالری بود. از یافته‌های مهم این پژوهش می‌توان به افزایش معنی دار بیان ژن VEGF و کاهش معنادار بیان ژن FGF23 در گروه‌های HIIT و ES نسبت به گروه چاق تحت محدودیت کالری اشاره نمود. چاقی به شدت با بروز بیماری‌های کبد از جمله NAFLD مرتبط است، که خود شامل تجمع چربی در کبد می‌باشد و می‌تواند به التهاب و فیروز کبدی منجر شود. افراد مبتلا به NAFLD معمولاً دچار مقاومت به انسولین و اختلالات متابولیک هستند، که خطر ابتلا به دیابت نوع ۲ و بیماری‌های قلبی عروقی را در این افراد افزایش می‌دهد (۴). بافت چربی نیز برای تأمین نیازهای متابولیک خود به طور متناسب نیاز به فرآیند رشد رگ‌های خونی دارد و این فرآیند به دو شکل افزایش در تعداد و افزایش در اندازه رگ‌های خونی (آنژیوژنز/آرتریوژنز) انجام می‌شود، و آنژیوژنز مناسب در بافت چربی برای حفظ عملکرد متابولیک و جلوگیری از هیپوکسی ضروری است (۶). در واقع، رگ‌های خونی داخل بافت‌های چربی نقش تعیین کننده افزایش یا کاهش چربی‌های سفید

(WAT) و قهوه‌ای (BAT)^۱ را دارند (۳۳). یکی از بیومارکرهای کلیدی در تنظیم آنژیوژنز بافت‌های مختلف بدن از جمله بافت چربی VEGF است، که با تحریک سلول‌های اندوتلیال، تشکیل رگ‌های خونی جدید را تسهیل می‌کند و به دنبال آن با افزایش خون‌رسانی، سلول‌های چربی قادرند سوخت‌وساز طبیعی خود را بازیابی کنند که این امر ممکن است منجر به کاهش توده چربی شود (۳۴). در همین راستا لینن (۲۰۰۷) در پژوهش خود نشان داد، اختلال در آنژیوژنز در شرایط چاقی باعث تجمع لیپیدهای غیرطبیعی در اندام‌هایی مانند کبد، عضلات و قلب می‌شود که منجر به مقاومت به انسولین و بیماری‌های قلبی-عروقی و کبدی نیز می‌گردد (۳۵). بنابراین، ارتقای آنژیوژنز می‌تواند این مشکلات را کاهش دهد. همچنین مطالعه‌ی کورورا و همکارانش (۲۰۲۲) نشان می‌دهد، افزایش آنژیوژنز در بافت چربی منجر به کاهش اندازه آدیپوسیت‌ها می‌شود و این امر ممکن است اختلالات متابولیک مرتبط با بزرگ شدن آدیپوسیت‌ها را بهبود بخشد. در واقع بهبود خون‌رسانی ناشی از افزایش VEGF می‌تواند به برداشت بهتر چربی از آدیپوسیت‌ها و انتقال آن به سایر بافت‌ها برای مصرف

¹ Brown Adipose Tissue

(۳۸). در همین راستا نتیجه پژوهش هنک و همکارش (۲۰۱۵)، نشان می‌دهد، سطوح بالای FGF-23 با افزایش BMI، مقاومت به انسولین، و نشانگرهای التهابی مانند پروتئین واکنش گر C مرتبط است و کاهش وزن می‌تواند منجر به کاهش سطح FGF-23 شود و این ارتباطات ممکن است نقش مهمی در متابولیسم استخوان و تنظیم انرژی در شرایط چاقی داشته باشند (۳۹). از آنجایی که افزایش وزن زمینه‌ساز بسیاری از بیماری‌های کبدی است، مداخلات کوتاه‌مدت شامل فعالیت بدنی و تغذیه می‌تواند، منجر به کاهش وزن در افراد چاق یا دارای اضافه وزن شود و در نتیجه، سلامت آن‌ها را بهبود بخشد. امروزه به تمرینات HIIT به عنوان یکی از مؤثرترین روش‌های فعالیت بدنی در جهت کاهش وزن و تنظیم فرآیند آنژیوژنز توجه ویژه‌ای می‌شود (۱۳) در همین راستا پژوهش خلفی و همکارانش (۲۰۲۱) نشان می‌دهد، HIIT می‌تواند باعث تنظیم مثبت تولید IL-10 (یک سایتوکاین ضدالتهابی) شود که به نوبه خود تولید سایتوکاین‌های پیش‌التهابی مانند $TNF-\alpha^3$ را مهار می‌کند. این تنظیم می‌تواند به کاهش التهاب و بهبود حساسیت به انسولین کمک کند، که در نهایت به کاهش چربی بدن منجر می‌شود (۱۴). همچنین پژوهش ملکی و همکارانش (۲۰۲۴) نشان داد، HIIT می‌تواند به عنوان یک روش مؤثر برای کاهش سطح پروتئین‌های انتقال‌دهنده چربی (LCRB and CD36) در کبد عمل کند و باعث بهبود در وضعیت متابولیسمی موش‌های مبتلا به کبد چرب شود (۴۰). همچنین HIIT با افزایش استرس مکانیکی و هیپوکسی در بافت‌های عضلانی، منجر به فعال‌سازی مسیرهای سیگنالی پایین‌دستی مانند PI3K/Akt و MAPK/ERK و افزایش بیان ژن‌های $HIF-1\alpha^4$ و $eNOS^5$ می‌شود و نقش مهمی در بیان بیومارکر VEGF و تنظیم آنژیوژنز دارد (۱۵) در همین راستا پژوهش بلوری و همکارانش (۲۰۲۲) نشان می‌دهد HIIT می‌تواند باعث ایسکمی و هیپوکسی موضعی و همچنین افزایش متابولیسمی‌هایی مانند آدنوزین و لاکتات، و مواد گشادکننده عروق مانند NO شود و به تحریک ترشح

انرژی کمک کند (۶). اما برخلاف تحقیقات ذکر شده اجاز و همکارانش (۲۰۰۹) پی بردند، دریافت‌کنندگان رژیم پرچرب همراه با کورکومین کاهش قابل توجهی در وزن بدن، توده چربی و آنژیوژنز بافت چربی نشان دادند. به نظر می‌رسد این کاهش توده چربی به دلیل توانایی کورکومین در مهار تمایز سلول‌های پیش‌آدیپوسیتی به آدیپوسیت‌های بالغ باشد. و این مکانیسم با کاهش بیان بیومارکرهای رونویسی $PPAR\gamma$ و $C/EBP\alpha$ که نقش مهمی در آدیپوژنز دارند، همراه است و باعث می‌شود، سلول‌های پیش‌آدیپوسیت نتوانند به طور کامل به آدیپوسیت‌های بالغ تبدیل شوند و در نتیجه ذخیره چربی در بدن کاهش می‌یابد (۳۶). علاوه بر این بیومارکر FGF23 نیز به عنوان یک هورمون شناخته می‌شود، و در تنظیم متابولیسم فسفات و ویتامین D نقش دارد و توسط استئوسیت‌ها در استخوان تولید می‌شود (۱۰). میزان FGF23، در آسیب‌های حاد و مزمن کبدی ناشی از رژیم غذایی پرچرب و افزایش اسیدهای صفراوی، در کبد افزایش می‌یابد. همچنین، تحریک التهاب ناشی از لیپوپلی‌ساکارید^۱ (LPS) تولید FGF23 را در کبد و سایر اندام‌ها افزایش می‌دهد. سلول‌های^۲ کوپفر (ماکروفاژهای ساکن کبد) به عنوان منبع اصلی FGF23 در کبد شناسایی شدند و باعث فعال‌سازی پیش‌التهابی هیپاتوسیت‌ها می‌شود (۳۷). کاهش سطح FGF23 در برخی شرایط می‌تواند به عنوان یک بیومارکر جهت بهبود شرایط متابولیک در نظر گرفته شود، در همین راستا نتیجه پژوهش پارک و همکارانش (۲۰۲۴) نشان می‌دهد FGF23 علاوه بر نقش آن در متابولیسم استخوان و مواد معدنی، در بافت‌های دیگر نیز تأثیرات مهمی دارد. کاهش FGF23 در موش‌های چاق منجر به کاهش وزن بدن و جرم چربی بدون تغییر در جرم عضلانی شد و این کاهش باعث جلوگیری از دیس‌لیپیدمی، افزایش قند خون و استئاتوز کبدی شد، همچنین بیان Ucp1 در چربی قهوه‌ای را افزایش داد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که غیرفعال‌سازی و کاهش هدفمند FGF23 ممکن است یک راهبرد درمانی امیدوارکننده برای درمان چاقی باشد

³ Tumor Necrosis CRector-1-alpha

⁴ Hypoxia-Inducible CRector 1-alpha

⁵ Endothelial Nitric Oxide Synthase

¹ Lipopolysaccharide

² Kupffer cells

تفاوت در جمعیت مورد مطالعه، مانند سن، جنسیت، و سطح تناسب اندام و همچنین، مدت و شدت تمرین، بستگی داشته باشد و HIIT می‌تواند بسته به اینکه چگونه به بهبود حساسیت به انسولین و کاهش چربی کبدی کمک کند منجر به افزایش یا کاهش FGF23 شود. علاوه بر مداخله فعالیت بدنی، محدودیت کالری نیز به عنوان یک روش مؤثر تغذیه‌ای جهت کاهش وزن و بهبود وضعیت متابولیسمی تعریف می‌شود. در طول محدودیت کالری و روزه داری، سطح گلوکز خون کاهش می‌یابد و بدن به جای استفاده از گلوکز، شروع به سوزاندن چربی‌ها برای تولید انرژی می‌کند. در واقع در محدودیت کالری با افزایش سطح AMP منجر به فعال‌سازی AMP² کیناز (AMPK) شده و سنتز مالونیل³ CoA- را کاهش می‌دهد، و دسترسی به چربی برای تولید انرژی افزایش می‌یابد (۴۵). در همین راستا پترسون و همکارانش (۲۰۱۵) در تحقیقات خود نشان دادند روزه داری و محدودیت کالری به موجب کاهش استرس اکسایشی و التهاب، باعث بهبود حساسیت به انسولین و افزایش تولید پروتئین‌های محافظتی مانند⁴ SIRT1 و AMPK نیز می‌شوند که نقش مهمی در تنظیم متابولیسم و کاهش وزن دارند (۴۶) علاوه بر این، نتیجه بررسی‌های کیم و همکارانش (۲۰۱۷) نشان می‌دهد محدودیت کالری با افزایش VEGF در WAT، به بهبود تعادل متابولیک و گرمایی کمک می‌کند و VEGF تولید شده در WAT باعث فعال‌سازی ماکروفاژهای نوع M2 می‌شود که این فرآیند برای قهوه‌ای شدن بافت چربی و افزایش مصرف انرژی و کاهش وزن ضروری است (۲۳) علاوه بر این، تحقیقات علمی نشان می‌دهد، محدودیت کالری نه تنها یک راهکار مناسب برای کاهش وزن و به دنبال آن کاهش ریسک ابتلا به بیماری‌های کبدی است، بلکه می‌تواند بر سطح بیومارکرهای مهمی مانند FGF23 نیز تأثیر بگذارد. در همین راستا پژوهش دوگان و همکارانش (۲۰۱۱)، نشان می‌دهد، FGF23 در شرایط استرس متابولیکی افزایش می‌یابد و محدودیت کالری با کاهش استرس متابولیکی و بهبود عملکرد

VEGF کمک کنند (۴۱). در ادامه تحقیقات نشان می‌دهد، تمرینات ورزشی، علاوه بر تأثیرات مثبت بر فرآیند آنژیوژنز، می‌تواند تغییرات مهمی بر سطح بیومارکر FGF23 ایجاد کند و نقش مهمی در بهبود فرآیندهای فیزیولوژیکی و متابولیسمی ایفا نمایند، در همین راستا مطالعه قدمیاری و همکارانش (۲۰۲۴) نشان می‌دهد، تمرینات استقامتی و مقاومتی، با فعال‌سازی مسیرهای سیگنالینگ سلولی مانند PI3K/AKT و AMPK، می‌تواند حساسیت به انسولین را افزایش دهند و متابولیسم انرژی را بهبود بخشند، و بر سطوح سرمی FGF23 اثر کاهشی داشته باشد (۴۲) علاوه بر این، نتیجه پژوهش بلیلی و همکارانش (۲۰۲۱) نشان داد، تمرینات استقامتی با کاهش گونه‌های فعال اکسیژن¹ (ROS) و تنظیم تعادل انرژی در سلول‌ها، به بهبود عملکرد قلبی و کاهش التهاب کمک می‌کند. این یافته‌ها نشان‌دهنده نقش تمرینات استقامتی در تنظیم محور-Klotho و FGF23 و کاهش آسیب‌های مرتبط با چاقی و دیابت می‌باشد (۴۳) اما بر خلاف مطالعات ذکر شده لی و همکارانش (۲۰۱۶) نشان دادند HIIT می‌تواند سطح FGF23 را در عضله اسکلتی افزایش دهد و به بهبود تحمل ورزش و عملکرد میتوکندریایی کمک کند (۴۴). در واقع HIIT در کوتاه‌مدت می‌تواند باعث افزایش سطح FGF23 در بدن شود و علت اصلی این افزایش، استرس فیزیولوژیک بر اثر تمرینات شدید می‌باشد. تمرینات HIIT به دلیل ماهیت شدید و متناوب خود، باعث ایجاد فشار مکانیکی و آسیب‌های میکروسکوپی به بافت‌های عضلانی و اندام‌ها می‌شود. این آسیب منجر به فعال‌سازی مسیرهای افزایش سیتوکین‌ها و به ویژه افزایش سطح بیومارکرهایی مانند FGF23 می‌شود که نقش مهمی در تنظیم متابولیسم فسفر و هموستاز کلسیم دارند (۱۰). از طرفی، افزایش FGF23 در مراحل اولیه پس از HIIT به عنوان یک مکانیسم دفاعی بدن برای مقابله با استرس، و تنظیم سریع فسفر و کلسیم تفسیر می‌شود. البته این پاسخ موقتی بوده و در صورت تمرین و سازگاری بدن، ممکن است در بلندمدت کاهش یابد یا تثبیت شود (۱۸) و این تفاوت در زمینه اثر HIIT بر FGF23 می‌تواند به عوامل مختلفی از جمله

² AMP-activated protein kinase

³ Coenzyme A

⁴ Sirtuin 1

¹ Reactive Oxygen Species

موارد برای فرآیند آنژیوژنز از طریق فعال‌سازی گیرنده‌های VEGF و مسیرهای سیگنال‌دهی مانند PI3K-Akt و Rho-ROCK ضروری هستند (۵۰). همچنین صحرانشین و همکارانش (۲۰۲۳) در مطالعات خود مشاهده کردند ES، مشابه تمرین استقامتی، می‌تواند یک روش مؤثر برای افزایش بیان VEGF و تسهیل فرآیند آنژیوژنز باشد و مسیر PI3K/Akt یکی از کلیدی‌ترین مسیرها در این فرآیند است (۵۱). علاوه بر مطالعات ذکر شده بررسی اثر ES بر بیومارکر VEGF توسط ملکی پویا (۲۰۲۴) نشان می‌دهد، ترکیب فعالیت هوازی و ES می‌تواند یک روش مؤثر برای تقویت آنژیوژنز و بهبود وضعیت قلبی-عروقی در موش‌های صحرایی باشد (۳۰). اما بر خلاف مطالعات ذکر شده پژوهش‌های فرمانی و همکارانش (۲۰۲۰) نشان دادند، ES می‌تواند تولید ROS و پروتئین‌های شوک حرارتی^۱ (HSPs) را افزایش دهد، که این عوامل منجر به مهار آنژیوژنز نیز می‌شود (۵۲). اما مطالعات انجام‌شده در زمینه اثر ES به‌تنهایی و همچنین به همراه HIIT بر بیومارکر FGF23 بسیار محدود است، لذا این پژوهش، با تمرکز بر این موضوع، گامی مهم در جهت پر کردن شکاف‌های علمی موجود در حوزه روش‌های غیرتهاجمی برداشته و پایه‌ای ارزشمند برای توسعه رویکردهای نوین درمانی فراهم خواهد کرد و با توجه به نوآوری و محدودیت‌های موجود در تحقیقات این حوزه، نیاز به بررسی‌های بیشتر و تحقیقات جامع‌تر در خصوص اثرات متقابل این روش‌ها با شدت‌های مختلف و بیان ژن‌های مرتبط احساس می‌شود.

نتیجه‌گیری

به‌نظر می‌رسد تمرین تناوبی با شدت بالا و تحریک الکتریکی در حین محدودیت کالری با افزایش بیان ژن‌های VEGF و کاهش بیان ژن FGF23 در نمونه‌های چاق با محدودیت کالری در کاهش وزن و درمان بیماری‌های مرتبط با چاقی از جمله بیماری کبد چرب غیر الکلی و سرطان‌ها مؤثر باشد. همچنین تلفیقی از تحریک الکتریکی و تمرین ورزشی نیز می‌تواند اثرات مثبتی بر این روند داشته باشد اما نیازمند مطالعات بیش‌تری می‌باشد.

کلی بدن، می‌تواند سطح FGF23 را در خون کاهش دهد. این اثر به‌طور غیرمستقیم از طریق بهبود متابولیسم فسفات و ویتامین دی حاصل می‌شود. بنابراین، کاهش FGF23 می‌تواند بر سلامت کلی بدن و سلامت متابولیسمی و عروقی نیز تأثیر بگذارد (۲۴). علاوه بر مطالعات ذکر شده، پژوهش‌های فصیحی و همکارش (۲۰۲۰) نشان داد، روزه‌داری و محدودیت کالری با فعال‌سازی مسیر PPAR α در کبد، منجر به لیپولیز و کتوژنز می‌شود و نیاز به افزایش FGF23 را جهت تنظیم متابولیسم چربی کاهش می‌دهد (۴۷). از سوی دیگر، نتیجه مطالعات آسه‌ودو و همکارانش (۲۰۲۳) نشان می‌دهد میزان کالری مصرفی تولید FGF23 را تنظیم می‌کند. به‌طور خاص، افزایش کالری (چاقی) باعث افزایش تولید FGF23 می‌شود، در حالی که محدودیت کالری باعث کاهش تولید FGF23 می‌شود (۴۸). این نتایج متفاوت پیرامون اثر محدودیت بر FGF23 می‌تواند به عوامل مختلفی مانند تنوع در پروتکل‌های محدودیت کالری، تفاوت در جمعیت‌های مورد مطالعه، و تعاملات هورمونی بستگی داشته باشد. علاوه بر فعالیت بدنی و محدودیت کالری، ES نیز به عنوان یک روش غیرتهاجمی و مؤثر برای بهبود ترکیب بدن و کاهش چربی‌های اضافی مورد توجه قرار گرفته است. همچنین تلفیق ES و تمرینات ورزشی تغییرات معنی‌داری در مقادیر ژن‌های مرتبط با آنژیوژنز نشان داده است. در این روش، با استفاده از جریان‌های الکتریکی، عضلات را تحریک کرده و به‌طور مؤثر باعث فعال‌سازی مسیرهای سیگنالینگ مختلفی می‌شوند که به افزایش متابولیسم و کاهش چربی کمک می‌کنند. یکی از این مسیرهای سیگنالینگ، مسیر AMPK است، و با فعال‌سازی آن، فرآیندهای متابولیسمی مانند اکسیداسیون چربی و گلوکز افزایش می‌یابد (۴۹). مطالعات در این زمینه نشان می‌دهد ES به‌طور مستقیم پاسخ‌های پیش‌آنژیوژنیک را در سلول‌های اندوتلیالی عروقی از طریق سیگنال‌دهی گیرنده‌های VEGF القا می‌کند. از جمله این مطالعات می‌توان به پژوهش ژائو و همکارانش (۲۰۰۴) اشاره کرد، این بررسی نشان می‌دهد ES باعث تغییرات در رفتارهای سلولی مانند تغییر شکل، کشیدگی و مهاجرت سلول‌های اندوتلیالی می‌شود، که این

¹ Heat Shock Proteins

حامی مالی

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

مشارکت نویسندگان

تمامی نویسندگان به یک اندازه در نگارش مقاله سهیم بوده‌اند.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ گونه تضاد منافی در پژوهش وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه نویسنده اول بوده و از همه افرادی که در این تحقیق مشارکت داشتند تشکر و قدردانی می‌نمایم.

Reference

1. WH O. Key facts about obesity. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. 2024.
2. WH O. World Obesity Day 2022—Accelerating action to stop obesity. World Health Organization Geneva, Switzerland; 2022. 2022.
3. Abiri B, Ahmadi AR, Amini S, Akbari M, Hosseinpanah F, Madinehzad SA, et al. Prevalence of overweight and obesity among Iranian population: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Health, Population and Nutrition*. 2023;42(1):70.
4. Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology*. 2010;51(2):679-89.
5. Hassanipour S, Amini-Salehi E, Joukar F, Khosousi M-J, Pourtaghi F, Ansar MM, et al. The prevalence of non-alcoholic fatty liver disease in Iranian children and adult population: a systematic review and meta-analysis. *Iranian Journal of Public Health*. 2023;52(8):1600.
6. Corvera S, Solivan-Rivera J, Yang Loureiro Z. Angiogenesis in adipose tissue and obesity. *Angiogenesis*. 2022;25(4):439-53.
7. Hua L, Li J, Feng B, Jiang D, Jiang X, Luo T, et al. Dietary intake regulates white adipose tissues angiogenesis via liver fibroblast growth factor 21 in male mice. *Endocrinology*. 2021;162(3):bqaa244.
8. Lin Y, Dong MQ, Liu ZM, Xu M, Huang ZH, Liu HJ, et al. A strategy of vascular-targeted therapy for liver fibrosis. *Hepatology*. 2022;76(3):660-75.
9. Mirabelli M, Misiti R, Sicilia L, Brunetti FS, Chiefari E, Brunetti A, et al. Hypoxia in Human Obesity: New Insights from Inflammation towards Insulin Resistance—A Narrative Review. *International journal of molecular sciences*. 2024;25(18):9802.
10. Courbebaisse M, Lanske B. Biology of fibroblast growth factor 23: from physiology to pathology. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2018;8(5):a031260.
11. Vachliotis ID, Anastasilakis AD, Rafailidis V, Polyzos SA. Osteokines in nonalcoholic fatty liver disease. *Current Obesity Reports*. 2024;13(4):703-23.
12. Cao W, Xu Y, Shen Y, Wang Y, Ma X, Bao Y. Serum fibroblast growth factor 23 level and liver fat content in MAFLD: a community-based cohort. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*. 2021;4:135-43.
13. Gaeini AA, Kordi MR, Nuri R, Ghorbani P, Karbalaeifar S. The effect of 6-week high intensity interval training on the VEGF/COL-18 ratio and some echocardiographic indices in rats with myocardial infarction. *Journal of Kermanshah University of Medical Sciences*. 2016;20(3).
14. Khalafi M, Symonds ME. The impact of high intensity interval training on liver fat content in overweight or obese adults: A meta-analysis. *Physiology & Behavior*. 2021;236:113416.
15. Zokaei A, Mohammadi Javid N. The Effect of eight weeks of high intensity interval training on genes expression of eNOS, HIF-1 and VEGF in myocardial infarction rats. *Report of Health Care*. 2017;3(4):31-7.
16. Rezaei Z, Shakerian S, Nikbakht M. The effect of ten weeks of high intensity interval training and continuous endurance training on the expression of MIR-205 and VEGF gene in mice with breast cancer has been compared. *Journal of Applied Health Studies in Sport Physiology*. 2019;6(1):37-44.
17. Fernández Castillo R, García Pérez R, Liñán González A. Beneficial effects of physical exercise on the osteo-renal Klotho-FGF-23 axis in Chronic Kidney Disease: A systematic review with meta-analysis. 2024.
18. Letto NS, Lubis VMT, Goenawan H, Pratiwi YS, Nurhayati T. LITERATURE REVIEW: EFFECT OF EXERCISE ON SERUM FGF23. *JURNAL ILMU FAAL OLAHRAGA INDONESIA*. 2021;4(1):27-37.

19. Fanti M, Mishra A, Longo VD, Brandhorst S. Time-restricted eating, intermittent fasting, and fasting-mimicking diets in weight loss. *Current obesity reports*. 2021;10:70-80.
20. Suchacki KJ, Thomas BJ, Ikushima YM, Chen K-C, Fyfe C, Tavares AA, et al. The effects of caloric restriction on adipose tissue and metabolic health are sex-and age-dependent. *Elife*. 2023;12:e88080.
21. Wang X, McCormick K, Mick G. Nutritional regulation of white adipocyte vascular endothelial growth factor (VEGF). *Hormone and metabolic research*. 2003;35(04):211-6.
22. Ghaemi A, Taleban F, Hekmatdoost A, Rafiei A, Hosseini V, Amiri Z, et al. Effect of weight reduction diet on non-alcoholic fatty liver disease. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology*. 2013;8(2):123-34.
23. Kim K-H, Kim YH, Son JE, Lee JH, Kim S, Choe MS, et al. Intermittent fasting promotes adipose thermogenesis and metabolic homeostasis via VEGF-mediated alternative activation of macrophage. *Cell research*. 2017;27(11):1309-26.
24. Vidal A, Rios R, Pineda C, Lopez I, Rodriguez M, Aguilera-Tejero E, et al. Effect of caloric restriction on phosphate metabolism and uremic vascular calcification. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2020;318(5):F1188-F98.
25. Liebano RE, Machado AFP. Vascular endothelial growth factor release following electrical stimulation in human subjects. *Advances in wound care*. 2014;3(2):98-103.
26. Anuradha R, Srinivas M, Satyavani M, Suresh K, Muralidhar M, Rajender Rao K. Preconceptional paternal caloric restriction of high-fat diet-induced obesity in Wistar rats dysregulates the metabolism of their offspring via AMPK/SIRT1 pathway. *Lipids in Health and Disease*. 2024;23(1):174.
27. Bao Y, Ertbjerg P, Estévez M, Yuan L, Gao R. Freezing of meat and aquatic food: Underlying mechanisms and implications on protein oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2021;20(6):5548-69.
28. Estadella D, Oyama LM, Dâmaso AR, Ribeiro EB, Do Nascimento CMO. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition*. 2004;20(2):218-24.
29. Fallahi A, Gaeini A, Shekarfroush S, Khoshbaten A. Cardioprotective effect of high intensity interval training and nitric oxide metabolites (NO₂⁻, NO₃⁻). *Iranian journal of public health*. 2015;44(9):1270.
30. 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.
31. MalekiPooya M, Khansooz M. The response of exercise rehabilitation combined with electrical stimulation on the serum levels of ICAM and VCAM in rats with experimental myocardial infarction. *Razi Journal of Medical Sciences*. 2023;30(6):127-38.
32. Sayyah M, Malekipooya M, Khansooz M, Pourabbasi M, Irandoust K, Taheri M, et al. Responses of some matrix metalloproteinases activities to an acute session of endurance exercise and electrical stimulation in induced myocardial infarction in Wistar rats. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2022;26(13):4755-61.
33. Ghesmati Z, Rashid M, Fayezi S, Gieseler F, Alizadeh E, Darabi M. An update on the secretory functions of brown, white, and beige adipose tissue: Towards therapeutic applications. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2024;25(2):279-308.
34. MOLLA HF, BIZHEH N, MOAZAMI M, NOURSHAHI M. The effects of eight weeks aerobic training on angiogenes factor and body composition in overweight women. 2016.
35. Lijnen HR. Angiogenesis and obesity. *Cardiovascular Research*. 2007;78(2):286-93.
36. Ejaz A, Wu D, Kwan P, Meydani M. Curcumin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and angiogenesis and obesity in C57/BL mice. *The Journal of nutrition*. 2009;139(5):919-25.
37. Kumar P, Liu Y, Shen Y, Maher JJ, Cingolani F, Czaja MJ. Mouse liver injury induces hepatic macrophage FGF23 production. *PLoS One*. 2022;17(3):e0264743.
38. Park MY, Tu C-L, Perie L, Verma N, Serdan TDA, Shamsi F, et al. Targeted Deletion of Fibroblast Growth Factor 23 Rescues Metabolic Dysregulation of Diet-induced Obesity in Female Mice. *Endocrinology*. 2024;165(12):bqae141.
39. Hanks LJ, Casazza K, Judd SE, Jenny NS, Gutiérrez OM. Associations of fibroblast growth factor-23 with markers of inflammation, insulin resistance and obesity in adults. *PloS one*. 2015;10(3):e0122885.
40. Maleki H, Omidi M, Yousefi M. Effect of High-Intensity Interval Training on the Levels of Liver Fat Transporter Proteins (LFAB and CD36) in Rats with Fatty Liver. *Jundishapur Journal of Health Sciences*. 2024;16(1).
41. Blori G, Abednatanzi H, Nikbakht H. The effect of eight weeks of HIIT on some angiogenesis indices of apelin-13 in elderly male rats. *Journal of Basic Research in Medical Sciences*. 2022;9(2):35-42.
42. Ghadamyari N, Zolfaghari MR, Tolouei Azar J, Fattahi A. The effect of 8 weeks of endurance and resistance exercises on the serum levels of FGF23 and s-Klotho in type 2 diabetic women. *International Journal of Diabetes in Developing Countries*. 2024:1-8.

43. Bolboli L, Khajehlandi M. The Effect of Six Weeks of Moderate-Intensity Endurance Training on Serum Levels of Klotho and Expression of the Fibroblast-23 Growth Factor Gene (FGF23) in the Hearts of Diabetic Rats: An Experimental Study. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*. 2021;20(4):371-86.
44. Li D-J, Fu H, Zhao T, Ni M, Shen F-M. Exercise-stimulated FGF23 promotes exercise performance via controlling the excess reactive oxygen species production and enhancing mitochondrial function in skeletal muscle. *Metabolism*. 2016;65(5):747-56.
45. Rebello CJ, Zhang D, Anderson JC, Bowman RF, Peeke PM, Greenway FL. From starvation to time-restricted eating: a review of fasting physiology. *International Journal of Obesity*. 2025;49(1):43-8.
46. Patterson RE, Laughlin GA, Sears DD, LaCroix AZ, Marinac C, Gallo LC, et al. Intermittent fasting and human metabolic health. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 2015;115(8):1203.
47. Fasihi Ramandi E, Khaledi N. High intensity interval training induced changes in the hepatic FGF-21 gene expression and serum TNF- α in diabetic male rats. *Research in Sport Medicine and Technology*. 2020;18(19):57-68.
48. Acevedo LM, Vidal Á, Aguilera-Tejero E, Rivero J-LL. Muscle plasticity is influenced by renal function and caloric intake through the FGF23-vitamin D axis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2023;324(1):C14-C28.
49. Vepkhvadze TF, Vorotnikov AV, Popov DV. Electrical stimulation of cultured myotubes in vitro as a model of skeletal muscle activity: current state and future prospects. *Biochemistry (Moscow)*. 2021;86(5):597-610.
50. Zhao M, Bai H, Wang E, Forrester JV, McCaig CD. Electrical stimulation directly induces pre-angiogenic responses in vascular endothelial cells by signaling through VEGF receptors. *Journal of cell science*. 2004;117(3):397-405.
51. Sahraneshin K, Saremi A, Malekipooya M. The effect of 8 weeks of endurance training on vascular endothelial growth factor (VEGF) and endostatin (ES) protein levels in cardiac tissue of diabetic rats with morphine withdrawal syndrome. *Cell and Tissue Journal*. 2023;14(2):128-39.
52. Farmani A, Mohammad Salehi M, Mahdavinezhad F, Kouhestani M, Mohammadi S, Ai J. A Review of the Impact of Electrical Stimulation on the Stem Cells Fate and Its Application in Regenerative Medicine and Cancer Treatment. *Cell and Tissue Journal*. 2020;11(2):139-53.

*Original Article***The effect of high-intensity interval training along with electrical stimulation using foot shock on the process of angiogenesis in the liver tissue of obese rats to calorie restriction**

Received: 19/04/2025- Accepted: 17/02/2026

Farkhunde Yarahmadi¹
Mohammad Malekipooya^{2*}
Sara Hamedi³

¹ Department of Exercise Physiology,
Ar.C., Islamic Azad University, Arak,
Iran

² Associate Professor, Department of
Exercise Physiology, Ar.C., Islamic
Azad University, Arak, Iran.

Corresponding author:

Dr. Mohammad Malekipooya,
Department of Exercise
Physiology, Ar.C., Islamic Azad
University, Arak, Iran.

Email: Mo.malekipooya@iau.ac.ir

Abstract

Introduction: Obesity is a major factor in liver diseases. This study investigates the effects of combining high-intensity interval training (HIIT) and electrical stimulation on hepatic angiogenesis in obese rats under caloric restriction.

Materials and Methods: In this experimental study, 35 male Wistar rats (8 weeks old, weighing 200 ± 19 grams) were randomly divided into five groups of seven following obesity induction: obese without caloric restriction (control), obese under caloric restriction, caloric restriction with high-intensity interval training, caloric restriction with electrical stimulation, and caloric restriction with both HIIT and electrical stimulation. The groups underwent a caloric restriction program (16 hours of food intake, 8 hours of fasting), a four-week HIIT regimen (speed of 10 to 20 meters per minute for 20 to 40 minutes), and post-exercise electrical stimulation (0.5 milliamps for 20 minutes). Two days after the interventions, heart tissue sampling was performed, and gene expression was measured using Real-Time PCR. Data were analyzed using one-way analysis of variance at a significance level of $p < 0.05$ and GraphPad software.

Results: The results showed that high-intensity interval training in the obese group under caloric restriction significantly increased the expression of the VEGF gene compared to the obese group ($P = 0.044$, $F = 4.3$). HIIT did not result in a significant increase in FGF23 in this group compared to the obese group ($P > 0.0001$, $F = 30$). The combination of HIIT with electrical stimulation in the obese group under caloric restriction led to a significant increase in VEGF gene expression ($P < 0.0001$, $F = 21$) and a significant decrease in FGF23 gene expression compared to the obese group ($P < 0.0001$, $F = 52$).

Conclusion: It appears that HIIT and electrical stimulation during caloric restriction can significantly increase VEGF gene expression and decrease FGF23 gene expression in the obese group with caloric restriction, potentially contributing to liver health and enhancing angiogenesis. However, further studies are needed to explore the dimensions of these effects.

Keywords: Obesity, Caloric restriction, High-Intensity Interval Training, Electrical Stimulation, Angiogenesis