Journal of Animal Biology, Spring 2024; 16(3):57-68

Research Article

The Effectiveness of 8 Weeks of Aerobic Training on CT and TT Genotypes of rs2070744 Polymorphism of NOS3 Gene and Changes in Aerobic Performance of Untrained Women

Hadis Rahimi[1], Mania Roozbayani[1*], Abbas Saremi[2]

1-Department of Physical Education, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran
2- Department of Physical Education, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran
*Corresponding author: m.roozbayani@iaub.ac.ir

Recieved: 26 January 2023 Accepted: 26 September 2023

DOI: 10.22034/ascij.2023.1978656.1462

Abstract

The present study was conducted with the aim of investigating the effect of 8 weeks of aerobic training on the CT and TT genotypes of the rs2070744 polymorphism of the NOS3 gene and the changes in aerobic performance of untrained women. For this purpose, 29 inactive women aged 30 to 45 were randomly selected from volunteer women in Shahriar city. The subjects did 8 weeks of aerobic training with a frequency of 5 sessions per week and each session lasting 30 minutes with an intensity of 55 to 75% of the reserve heart rate, so that in the first two weeks with 55 to 65% of the maximum heart rate, in two weeks Second, they trained with 60 to 65% of the maximum heart rate and the last 4 weeks with 65 to 75% of the maximum heart rate. 10 minutes for warming up and 10 minutes for cooling down were considered in each training session. Bruce's 7-step test was used to determine VO2max before and after training.Then, among the subjects who were able to perform the desired test based on the researcher's expectation, saliva sampling was done for DNA sequencing to determine the genotypes. The RFLP method was used to determine the genotype. The results of the data analysis were analyzed using the dependent t-test and the results showed that the VO2max level in women with CT genotype was not significant before and after the exercise intervention (p = 0.015), the amount of VO2max in women who had the TT genotype was not significant before and after the exercise intervention (p = 0.110). In this research, it was shown that the significant improvement of Vo2max did not depend on their genotypic differences, and no significant relationship was observed between the CT and TT genotypes of the rs2070744 polymorphism of the NOS3 gene and the changes in aerobic performance of obese untrained women after 8 weeks of aerobic training.

Keywords: CT and TT genotypes, NOS3, Aerobic exercise, Obesity, VO2max.

مقاله پژوهشی

اثربخشی هشت هفته تمرین هوازی بر ژنوتیپ‌های CT و TT پلی‌مورفیسم rs2070744 ژن NOS3 و تغییرات عملکرد هوازی زنان تمرین نکرده

حدیث رحیمی[۱]، مانیا روزبیانی[۱*]، عباس صارمی[۳]

۱- گروه تربیت بدنی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران

۲- گروه تربیت بدنی، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران

*مسئول مکاتبات: m.roozbayani@iaub.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۰۴

DOI: 10.22034/ascij.2023.1978656.1462

چکیده

پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر ۸ هفته تمرین هوازی بر ژنوتیپ‌های CT و TT پلی‌مورفیسم rs2070744 ژن NOS3 و تغییرات عملکرد هوازی زنان تمرین نکرده انجام شد. بدین منظور، تعداد ۲۹ زن غیر فعال ۳۰ تا ۴۵ ساله به‌صورت تصادفی از زنان داوطلب شهرستان شهریار انتخاب شدند. آزمودنی‌ها ۸ هفته تمرین هوازی با تواتر ۵ جلسه در هفته و هر جلسه ۳۰ دقیقه با شدت ۵۵ تا ۷۵ درصد ضربان قلب ذخیره انجام داده به‌طوری‌که در دو هفته اول با ۵۵ تا ۶۵ درصد ضربان قلب بیشینه، در دو هفته دوم با ۶۰ تا ۶۵ درصد ضربان قلب بیشینه و ٤ هفته پایانی با ۶۵ تا ۷۵ درصد ضربان قلب بیشینه به تمرین پرداختند. ۱۰ دقیقه برای گرم کردن و ۱۰ دقیقه برای سرد کردن در هر جلسه تمرینی در نظر گرفته شد. برای تعیین میزان VO2max از آزمون ۷ مرحله‌ای بروس، پیش و پس از تمرینات استفاده شد. سپس، از بین آزمودنی‌هایی که توانستند آزمون مورد نظر را بر اساس انتظار محقق اجرا کنند نمونه‌گیری بزاقی برای توالی‌یابی DNA برای تعیین ژنوتیپ‌ها انجام گرفت. جهت تعیین ژنوتیپ از روش RFLP استفاده شد. نتایج حاصل از بررسی داده‌ها با استفاده از آزمون t مستقل بررسی شد و نتایج نشان داد که میزان VO2max در مرحله پیش آزمون در زنانی که دارای ژنوتیپ CT بودند به‌طور میانگین قبل و بعد از مداخله ورزشی، معنی‌دار نبوده است (p = ۰/۸۸٤)، میزان VO2max در مرحله پس آزمون در زنانی که دارای ژنوتیپ TT بودند به‌طور میانگین قبل و پس از مداخله ورزشی، معنی‌دار نبوده است (p = ۰/۱۱۰). در این تحقیق نشان داده شد که بهبود معنی‌دار Vo2max به تفاوت-های ژنوتیپی آن‌ها بستگی نداشت و بین ژنوتیپ‌های CT و TT پلی‌مورفیسم rs2070744 ژن NOS3 و تغییرات عملکرد هوازی زنان تمرین نکرده چاق بعد از ۸ هفته تمرین هوازی رابطه معنی‌داری مشاهده نشد.

کلمات کلیدی: ژنوتیپ‌های CT و TT، NOS3، تمرین هوازی، چاقی، VO2max.

مقدمه

بسیاری از عوامل ژنتیکی در تولید انرژی و فراهمی اکسیژن نقش دارند. همکاری پیچیده‌ای که بین ژنتیک، بیان پروتئین‌ها، عوامل سلولی و مولکولی و سایر بخش‌های مرتبط با متابولیسم وجود دارند، در نهایت، منجر به حیات موجود زنده می‌شوند (۲). در متابولیسم هوازی نیز، همین پیچیدگی‌ها وجود دارد و عوامل قلبی-عروقی متعدد باعث می‌شوند که سطح محدودیت‌های هوازی تعیین شود. در این میان عوامل

ژنتیکی نیز نقش مبنایی دارند (۸) و عروق خونی به‌عنوان مسیرهای ارتباطی برای بسیاری از ابزار انرژی و متابولیکی، نقش منحصر به فردی دارند (۱۷). نقش تمرینات ورزشی در سازگاری‌های مربوط به عروق نیز شناخته شده است (۱۶). نیتریک اکساید سنتاز (eNOS) پروتئینی است که توسط ژن NOS3 در بدن انسان کدگذاری می‌شود، هنگام فعالیت ورزشی و در پاسخ به جریان خون زیاد یا تنش برشی فعال می‌شود و در بسیاری از بیماری‌های قلبی-عروقی از آثار این ژن نام برده شده است (۲۵) هایپوکسی باعث فعال شدن eNOS و در نهایت، تولید نیتریک اکساید (NO) از ال-آرژنین توسط گیرنده‌های گوناگون می‌شود. در مراحل اولیه آنژیوژنز، تنظیم افزایشی VEGF و VEGFR-2 به تنش برشی و آزاد سازی NO وابسته است (۵). از سوی دیگر، آثار NOS3 از طریق همکاری با NO در بدن نمایان می‌شوند. NO گازیست که نیمه‌عمری چند ثانیه‌ای دارد و آثار بیولوژیک و بیوشیمیایی متنوعی را به‌وجود می‌آورد. در بسیاری از این اعمال، نیتریک اکسید به‌عنوان یک مولکول پیام‌رسان عمل می‌کند. NO در بدن توسط آنزیم eNOS از اسید آمینه ال آرژنین، سنتز می‌شود. این آنزیم دارای سه ایزوفرم اصلی شامل عصبی، اندوتلیالی و القایی است (۲۳). NO در سیستم عصبی به‌عنوان یک نروترانسمیتر عمل می‌کند و عملکرد آن در سیستم قلبی -عروقی به‌عنوان یک عامل شل‌کننده عروقی مشتق از اندوتلیوم شناخته شده است. No در بسیاری از عملکردهای سیستم تناسلی هم نقش دارد (۲۰). نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که تولید مداوم NO باعث حفظ حجم و عملکرد عروق می‌شود (۱، ۱۵). جریان خون مناسب و فشار خون از عوامل معنی‌دار در ورزش و بهداشت فردی هستند و نشان داده شده است که NO در تنظیم جریان و فشار خون مؤثر است. تحقیقات از نقش NO در خون‌رسانی به عضلات فعال در حین ورزش حمایت کرده‌اند (۷، ۱۰). بنابراین، تولید NO و همکاری NOS3 می‌تواند در تنظیم قلبی -عروقی در حین ورزش تأثیرگذار باشد. در یکی از پلی‌مورفیسم‌های NOS3 (*T786C*) آثار مرتبط با اسپاسم کرونری، پر فشار خونی (۱۲) و نروپاتی دیابت در دیابت نوع ۱ مشاهده شده است (۲۴). تعداد مطالعاتی که رابطه بین تمرین ورزشی (ET) و پلی‌مورفیسم‌های ژن NOS3 را ارزیابی کرده‌اند، کم است. ولفارث و همکاران در مطالعه خود سهم سه پلی‌مورفیسم را در ژن NOS3 برای تمایز ورزشکاران نخبه استقامتی از افراد کم‌تحرک بررسی کردند. بر اساس شواهد پیشنهادی کردند که آلل ۱۶۴ جفت باز تکرار (CA)n در اینترون ۱۳ با وضعیت ورزشکاران نخبه استقامتی مرتبط است و ممکن است برخی از تفاوت‌های بین این ورزشکاران و افراد بی تحرک را توضیح دهد (۲۲). اسپنتن و همکاران نشان دادند که حضور پلی‌مورفیسم برای اینترون ۴ اثرات مفید تمرینات ورزشی را در بزرگسالان میانسال کاهش داد. احتمالاً، این اثر ممکن است نتیجه این باشد که اینترون ۴ به‌عنوان یک RNA تکراری اینترونیک کوتاه عمل می‌کند که فعالیت NOS اندوتلیال را از نظر اپی ژنتیکی کنترل می‌کند (۲۱). با توجه به مطالب ارائه شده ما فرض را بر این گذاشتیم که برخی پلی‌مورفیسم‌های ژن NOS3 می‌تواند در تنظیم و سازگاری با تمرینات ورزشی تأثیرگذار باشد و تعیین پروفایل ژنتیکی افراد می‌تواند در مقایسه با تمرینات ورزشی و سازگاری‌های ناشی از آن مورد مطالعه قرار بگیرد، تا روشن شود که به چه اندازه ویژگی‌های ژنتیکی می‌توانند سازگاری‌های به ورزش استقامتی را در افراد تمرین نکرده تحت تأثیر قرار دهد. بر همین اساس، پروفایل ژنتیکی داوطلبان شامل ژن‌های مورد بحث مورد ارزیابی قرار خواهد گرفت. از سوی دیگر، مقادیر VO2max پیش و پس از یک

دوره تمرین استقامتی اندازه‌گیری خواهد شد. در نهایت، به این سوال پاسخ داده خواهد شد که آیا وضعیت ژنتیکی ژن‌های مورد بحث می‌تواند در وضعیت اجرای هوازی و تمرین‌پذیری آن‌ها اثر گذار باشد یا خیر؟

مواد و روش‌ها

زنان ۳۰ تا ۴۵ ساله شهرستان شهریار در استان تهران که دارای اضافه وزن و چاقی بودند به‌عنوان جامعه آماری انتخاب شدند. و از این بین ۲۹ زن غیر فعال ۳۰ تا ۴۵ ساله که به‌صورت تصادفی در دسترس از زنان داوطلب شهرستان شهریار با شاخص توده بدنی بالای ۳۰ انتخاب شدند. هیچ کدام، محدودیت خاص جسمانی برای انجام فعالیت بدنی نداشتند و در ۳ ماه قبل انجام پژوهش تحت هیچ درمان دارویی قرار نگرفتند. آزمودنی‌ها دارای فعالیت ورزشی مستمر نبوده و از انجام فعالیت منظمی برخوردار نبودند و هیچ کدام از آن‌ها به جزء فعالیت‌های معمول خانه-داری، فعالیت جسمانی خاصی نداشتند و در عین حال همگی برای مشارکت در این طرح اعلام رضایت کرده و قبول کرده بودند که در تمامی جلسات اعم از جلسات توجیهی، آزمون‌ها و تمرینات حضور موثر داشته باشند. برای تعیین میزان VO2max از آزمون بروس (Bruce)، پیش و پس از تمرینات استفاده شد. مقرر شد که در ساعت ۵ عصر روز پیش آزمون و پس آزمون اندازه‌گیری توان هوازی صورت پذیرد تا از آثار چرخه شبانه‌روزی کمترین مداخله اتفاق بیفتد. علاوه بر این آزمون‌ها حداقل یک هفته بعد از چرخه ماهیانه آزمودنی‌ها اجرا شد. همچنین، جهت کنترل تغذیه شرکت‌کنندگان در طول تحقیق و بر اساس آموزش قبل از شروع تمرینات مقرر شد طوری تغذیه نمایند که ترکیب درصدی درشت مغذی‌های برنامه غذایی آن‌ها حدالامکان مطابق رژیم غذایی استاندارد (به ترتیب ۵۵، ۳۰ و ۱۵ درصد کربوهیدرات، چربی و پروتئین) باشد. آموزش‌های لازم در خصوص نوع پوشش مخصوصاً کفش مناسب به آن‌ها ارائه شد و این اطمینان برای آن‌ها حاصل شد که همواره کارشناسان ورزش ایمنی و کیفیت لازم را برای اجرای پروتکل آزمون تحت نظر دارند. در حین اجرای آزمون تمام موارد ایمنی رعایت شد و از دو نفر کارشناس برای نظارت بر نکات فنی و همجنین، ایمنی بهره‌بردای شد. قبل از اجرای آزمون نکات مهم و اثرگذار روی آزمون برای آزمودنی‌ها توضیح داده شد و از آن‌ها خواسته شد تا حد امکان به اجرای خود ادامه دهند و اگر علائم خطر آفرینی مانند سرگیجه را درک کردند به سرعت به کارشناسان اطلاع دهند. بر اساس پروتکل آزمون بروس از تردمیل مدل ۲۹۷۰ کمپانی *impulse* استفاده شد و در مرحله اول با سرعت ۲/۷ کیلومتر بر ساعت و شیب ۱۰ درجه آغاز و هر سه دقیقه یک بار به شیب و سرعت تردمیل اضافه گردید. در سه دقیقه دوم سرعت تردمیل به ٤ کیلومتر در دقیقه افزایش یافت و شیب هم روی ۱۲ درجه تنظیم گردید. به همین ترتیب، پس از سه دقیقه سرعت به ۵/۵ و شیب به ١٤ درجه ارتقاء یافت. این روند همین‌طور ادامه می‌یافت تا جایی که آزمودنی‌ها قادر به ادامه فعالیت نبودند. همان‌طور که ذکر شد زمانی که آزمودنی قادر به ادامه فعالیت نبود مدت زمان انجام آزمون به دقت ثبت و پس از قرار دادن آن در فرمول‌های استاندارد میزان VO2max ثبت گردید. برای به‌دست آوردن VO2max از فرمول استاندارد به شرح زیر برای زنان استفاده شده است. در این فرمول اعداد به‌عنوان عدد ثابت و T به‌عنوان مدت زمان راه رفتن/دویدن به دقیقه و ثانیه مورد استفاده قرار گرفت است (٤). برای سنجش توده بدنی، از فرمول مرسوم BMI شامل تقسیم وزن بر مجذور قد (متر) استفاده شد. همچنین، بررسی برخی از شاخص‌های مرتبط با

وضعیت پیکری مانند وزن و درک بهتر از وضعیت جسمانی داوطلبان از روش سنجش ترکیب بدنی مغناطیسی به وسیله دستگاه *in body* ساخت کشور کره جنوبی استفاده شد. قد آزمودنی‌ها از طریق قد سنج مخصوص دیواری و بدون کفش انجام پذیرفت. تمام سنجش‌های فوق در کنار یک کارشناس پیکرسنج انجام پذیرفت و برای آزمون‌های پیکرسنجی حداقل دو بار آزمون‌ها انجام گرفت. مشخصات پایه آزمودنی‌های پژوهش در جدول شماره ۱ آمده است.

پروتکل تمرینی: پس از اطمینان از آشنایی داوطلبان با شرایط تمرین که در یک جلسه توجیهی انجام شد، هشت هفته تمرین هوازی با تواتر ۵ جلسه در هفته و هر جلسه ۳۰ دقیقه با شدت ۵۵ تا ۷۵ درصد ضربان قلب ذخیره برای این طرح مورد استفاده قرار گرفت و آزمودنی‌ها در دو هفته اول با ۵۵ تا ٦۵ درصد ضربان قلب بیشینه، در دو هفته دوم با ٦۰ تا ٦۵ درصد ضربان قلب بیشینه و باقی زمان را تا پایان دوره با ٦۵ تا ۷۵ درصد ضربان قلب بیشینه به تمرین پرداختند. ۱۰ دقیقه برای گرم کردن و ۱۰ دقیقه برای سرد کردن در هر جلسه تمرینی در نظر گرفته شد. تمرینات در سالنی که به ورزش‌های توپی مانند والیبال و فوتبال اختصاص داشت، انجام پذیرفت(۳). در طول تمام دوره تمرینات دونفر مربی/کارشناس در کنار آزمودنی‌ها قرار داشت و تمرینات را با دقت زیر نظر قرار داشتند. تمام جلسات تمرینی بین ساعت ۸ تا ۱۰ صبح انجام پذیرفت و جلسات آزمون بروس نیز هم پیش و هم پس از دوره تمرینی حدود ساعت ۱۰ صبح برگزار گردید. بین ٤۸ تا ۷۲ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، داوطلبان در پس آزمون VO2max که مانند پیش آزمون توسط آزمون بروس برگزار شد، مشارکت جسته و پس از محاسبات لازم، مقادیر ثبت و برای ادامه پژوهش مورد استفاده قرار گرفت. از بین آزمودنی‌هایی که توانستند دوره تمرینی را با شرایطی که مد نظر محققان قرار داشت سپری کنند، نمونه‌گیری بزاقی برای توالی یابی DNA برای تعیین ژنوتیپ‌ها انجام گرفت. در همین خصوص و در این بخش، مراحل تجربی پژوهش حاضر تفضیل معرفی می‌شود. این مراحل به ترتیب عبارتند از: نمونه گیری، استخراج DNA ژنومی، طراحی پرایمر، ستاپ کردن پرایمر و تعیین ژنوتیپ ژن‌ها. برای مطالعه حاضر نمونه‌گیری از بزاق انجام گرفت. پس از اخذ نمونه بزاق، محلول نگهدارنده به آن‌ها اضافه شد و به آزمایشگاه منتقل شدند. استخراج DNA با استفاده از کیت شرکت ژن ورز و به‌صورت زیر انجام گرفت: ابتدا از هر آزمودنی۳ میلی لیتر بزاق، جمع‌آوری شد، سپس به هر نمونه ۳ میلی لیتر محلول نگهدارنده اضافه شد، پس از آن ۲/۵ میلی لیتر از محلول بزاق به یک فالکون اسریل جدید انتقال داده شد، سپس، با اضافه کردن ۲/۵ میلی‌لیتر بافر لیز کننده به محلول بزاق، در مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شدند. سپس، ۳۰ دقیقه در دمای اتاق گذاشته شد و پس از آن ۳۰ میکرولیتر RNase A اضافه و مجددا ورتکس شدند. در ادامه نمونه ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت نگهداری شدند و ٤۰ میکرولیتر پروتئیناز K به آن‌ها اضافه شده، سپس، به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شدند. سپس به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند، و ۲ میلی‌لیتر محلول NaCl 6M به محلول بالا اضافه شده و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شدند. در ادامه به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ قرار داده شدند. محلول حاصله به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ٤ درجه و دور 12000 RPM؛ سانتریفیوژ شد وبرای انتقال به یک فالکون جدید برداشته شده و و دوباره با شرایط بالا سانتریفیوژ شدند، انتقال محلول روی به یک فالکون جدید و اضافه کردن ۷ میلی لیتر ایزوپروپانول سرد روی نمونه‌ها انجام گرفت. سپس، فالکون چندین بار سروته شد، محلول حاصله به مدت

۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه و دور W,10000 RPM ؛ سانتریفیوژ شده و ۲ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد سرد اضافه شد، سانتریفیوژ محلول حاصله به مدت ۳ دقیقه در دمای ٤ درجه و دور 8000 RPM، انجام گرفت و محلول روی دور ریخته شد و نمونه‌های DNA در دمای اتاق گذاشته شدند تا کامل خشک شدند و سپس، ۵۰۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل به آن‌ها اضافه شد و نمونه‌ها سپس، در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا برای مراحل بعدی مورد استفاده قرار گیرند.

طراحی پرایمر: جهت طراحی پرایمرها از نرم افزار oligo7 استفاده شد. پس از طراحی پرایمرها جهت اطمینان از اختصاصی بودن پرایمرها از نرم افزار primer-blast موجود در پایگاه داده NCBI استفاده شد. پس از اطمینان از اختصاصی بودن عملکرد پرایمرها، پرایمرها جهت سنتز به شرکت سیناکلون سفارش داده شدند. پرایمرهای دریافتی به‌صورت لیوفیلیزه‌اند که با افزودن مقادیر مشخص آب با توجه به اطلاعات همراه پرایمر باید به غلظت ۱۰۰ پیکومولار رسانده شود تا به‌عنوان محلول اصلی مورد استفاده قرار گیرد. از این محلول رقت ۰/۰۵ تهیه و به‌عنوان محلول کاری استفاده می‌شود. تمامی استوک-های تهیه شده در دمای ۲۰- سانتی‌گراد نگهداری شدند. در این مرحله برای هر جفت از پرایمرهای طراحی شده، از واکنش PCR شیب دمایی جهت یافتن بهترین دمای اتصال پرایمر استفاده می‌شود. مواد و وسایل مورد نیاز نیز عبارتند از: دی ان ای، Master mix 2X، پرایمر بالا دست و پایین دست (5 pM)، آب دیونیزه، دستگاه ترمال سایکلر ABI (جدول ۲).

مراحل ستاپ کردن پرایمر: الف- در یک میکروتیوب استریل ۰/۲ میلی‌لیتری مواد جدول ۲.زیر اضافه گردد: ب - میکروتیوب در دستگاه ترمال سایکلر گذاشته شود و PCR بر اساس شرایط جدول ۳ اجرا شد. ج- پس از اتمام واکنش، ۳ میکرولیتر از محصول PCR جهت اطمینان از تکثیر بهینه روی ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت. بعد از مشخص شدن دمای مناسب برای هر سه جفت پرایمر سنتز شده PCR تمامی نمونه‌ها با شرایط ایده‌آل به-دست آمده انجام شد و برای تأیید تکثیر صحیح قطعه مورد نظر ۲ میکرو لیتر از محصول PCR روی ژل اگارز ۰/۱ درصد برده شد.

تعیین ژنوتیپ ژن: جهت تعیین ژنوتیپ ژن از روش RFLP استفاده شد. انجام هضم آنزیمی در دمای ٦۵ درجه سانتیگراد و به صورت overnight شامل یک میکرولیتر آنزیم، ۳ میکرولیتر محصول PCR، ۲ میکرولیتر بافر مخصوص و ۱۵ میکرولیتر آب دیونیزه می‌باشد. پس از هضم آنزیمی، محصول هضم آنزیمی روی ژل پلی‌اکریل‌آمید (PAGE) ۱۲ درصد جهت مشاهده قطعات برش یافته الکتروفورز شد. و سه نمونه با ژنوتیپ‌های مختلف برای توالی یابی به شرکت کدون فرستاده شدند. پس از تعیین ژنوتیپ ژن‌های مورد بحث، ژنوتیپ‌های مختلف با اجرای ورزشی آن‌ها مورد مقایسه قرار گرفت و از روش آماری مخصوص برای مقایسه ژنوتیپ‌ها و تغییرات در میزان VO2max مورد استفاده قرار گرفت. **روش تجزیه و تحلیل داده‌ها:** جهت تعیین نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیرو ویلک استفاده شد. جهت تعیین معنی‌دار بودن تفاوت بین متغیرها قبل و پس از تمرین از آزمون t مستقل استفاده شد و مقایسه NOS3 آزمودنی‌های دوگروه دارای ژنوتیپ CT و TT پس از مداخله تمرینی با استفاده از نمودار گزارش شده است.

جدول ۱- اطلاعات پایه آزمودنی‌ها (قد، وزن، BMI، سن) پیش از شروع تمرینات ورزشی

Table 1. The basic information of the subjects (height, weight, BMI, age) before starting sports training

Body mass (kg)	BMI	Height (cm)	Age (years)	Aerobic capacity before training (vo2max)	Aerobic capacity after (vo2max) exercisee
75.27 ± 25.72	30.69	175.44 ± 14.55	39.13 ± 8.13	29.12	35.61

جدول ۲- مقدار مواد مورد نیاز در مرحله اول ستاپ کردن پرایمر

Table 2. The amount of materials needed in the first step of setting up the primer

Materials	Dose (Microliter)
Master mix2X [amplicon]	7.5
Forward Primer (5 pM)	0.8
Reverse Primer (5 pM)	0.8
DNA	1
Deionized water	5

جدول ۳- شرایط انجام PCR

Table 3. PCR conditions

Stages	Temperature (°C)	Time	Cycle number
Primary denaturation	94	7 minutes	1
Denaturation	94	30 seconds	
Annealing	60	30 seconds	35
Extension	72	60 seconds	
Final Extension	72	7 minutes	1

نتایج

بر اساس نتایج جدول ٤ که اطلاعات عمومی آزمودنی‌ها به تفکیک ژنوتیپ‌ها در مطالعه ژن NOS3-2 ارائه شده است، بر اساس اطلاعات این جدول، میانگین افراد شرکت‌کننده با ژنوتیپ‌های CT و TT، در اطلاعات پایه، سن، قد، وزن و شاخص توده بدن، به صورت کلی و قبل از مداخله، نزدیک به هم بوده و تفاوت مشهودی دیده نمی‌شود. بر اساس نتایج جدول ۵ که به ارائه اطلاعات توصیفی آزمودنی-ها با دو نوع ژنوتیپ CT و TT قبل از ارائه مداخله ورزشی می‌پردازد، میزان میانگین قبل و بعد از از دریافت تمرین در ژنوتیپ‌های مورد بررسی دارای تفاوت بالایی نیست و میانگین‌ها نزدیک به هم هستند. بر اساس نتایج جدول ٦ نیز میزان t مستقل محاسبه شده جهت بررسی تفاوت میان گروه‌های آزمایشی و کنترل در پیش آزمون (t =۰/۱٤۷ و p =۰/۸۸٤) و پس آزمون (t =۰/۸۷۱ و p =۰/۱۱۰) معنی‌دار نبوده است. نمودار ۱ نشان‌دهنده عدم میانگین تغییرات VO2max آزمودنی‌های دو گروه دارای ژنوتیپ CT و TT پس از مداخله تمرین است. اطلاعات عمومی آزمودنی‌ها به تفکیک ژنوتیپ‌ها در مطالعه ژن NOS3-2، در جدول ٤ ارائه شده است. در جدول ۵ نیز به اطلاعات توصیفی ژنوتیپ‌های CT و TT در قبل و بعد از ارائه تمرین ورزشی اختصاص یافته است. نتایج حاصل از وضعیت NOS3 آزمودنی-ها قبل و بعد از مداخله ورزشی در آزمودنی‌ها با ژنوتیپ‌های CT و TT در جدول ٦ آمده است. ضمن اینکه نمودار ۱ به مقایسه NOS3 آزمودنی‌های گروه دارای ژنوتیپ CT و TT پس از مداخله تمرینی می-پردازد.

جدول ٤- اطلاعات عمومی آزمودنی‌ها به تفکیک ژنوتیپ‌های ژن NOS3-2

Table 4. General information of the subjects by NOS3-2 gene genotypes

	Genotype	Number	Mean	Standard deviation	SEM
Age	CT	12	40.50	4.56	1.31
	TT	17	38.17	4.94	1.19
Height	CT	12	154.75	6.75	1.95
	TT	17	159.35	6.20	1.50
Weight	CT	12	77.66	13.70	3.95
	TT	17	73.58	5.50	1.33
BMI	CT	12	32.66	7.03	1.03
	TT	17	29.04	2.55	0.61

جدول ۵- اطلاعات توصیفی آزمودنی‌های دوگروه دارای ژنوتیپ CT و TT پیش و پس از مداخله تمرینی

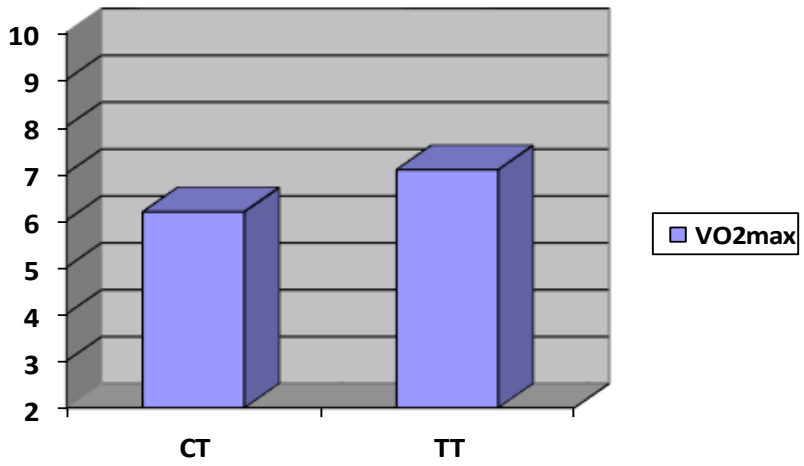
Table 5. Descriptive information of two groups of subjects with CT and TT genotypes before and after exercise intervention

	Genotype	Number	Mean	Standard deviation	SEM
NOS3-2 pre	CT	17	30.9596	1.54162	1.101501
	TT	11	26.0791	1.34078	1.61030
Nos3-2 post	CT	17	37.1483	5.03081	1.22015
	TT	11	33.1667	7.47849	2.33626

جدول ٦- نتایج تجزیه و تحلیل آزمون t مستقل گروه‌ها قبل و بعد از مداخله

Table 6. Independent t-test analysis results groups before and after the intervention

	Groups	Average score	Standard deviation	t	p-value
Pre-test	Experimental	8.80	1.42	0.147	0.884
	Control	8.73	1.53		
Post-test	Experimental	12.20	1.32	0.871	0.110
	Control	11.98	1.47		



نمودار ۱- مقایسه میانگین تغییرات VO2max آزمودنی‌های دوگروه دارای ژنوتیپ CT و TT پس از مداخله تمرین

Fig 1. Comparison of average VO2max changes of two groups of CT and TT genotype subjects after exercise intervention

بحث

در مطالعه حاضر تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های TT و CT نشان داده نشد. هر چند تفاوت در تغییرات VO2max در بین هردوگروه نسبت به قبل از تمرینات ورزشی معنی‌دار بود، اما بین دو گروه تفاوت چندانی وجود نداشت. این در حالی است که در مطالعه‌ای که در سال‌های اخیر بر روی ۱۹۷ ورزشکار رشته ورزشی شنا انجام پذیرفت، محققان آزمودنی‌ها را در دو دسته شامل ۱۴۷ آزمودنی در شنای مسافت کوتاه (۵۰ تا ۲۰۰ متر) و ۴۷ شناگر مسافت بلند (بیش از ۵۰۰ متر) تقسیم بندی کردند. از ۳۷۹ آزمودنی سالم هم برای گروه کنترل استفاده شد. در این پژوهش نشان داده شد که شناگران مسافت بلند در پلی‌مورفیسم rs2070744 به‌طور معنی‌داری از آلل T بیشتری نسبت به گروه کنترل برخوردار بودند. ورزشکارانی که از این آلل برخوردار بودند بیش از ۸ برابرگروه کنترل قادر به شنا کردن بودند. به‌عبارت دیگر، در گزارش آن‌ها ذکر شد که آلل T در ورزشکاران استقامتی یک مزیت محسوب می‌شود و ورزشکارانی که این ژنوتیپ‌ها را دارند از توانایی بیشتری برای شناکردن در مسافت‌های بلند برخوردار هستند (۲۶). از آنجایی که توانایی شنا کردن در مسافت‌های طولانی مستلزم دارا بودن VO2max مناسب و بالاست و NOS یکی از چندین عاملی است که می‌تواند روی توان هوازی اثرگذار باشد، چنین تحقیقی در راستای اهداف تحقیقی ماست. در عین حال، جهت یافته‌های این گزارش در نتایج ما دیده نشد. در مطالعه دیگر پژوهشگران روی ۶۰ بازیکن نخبه فوتبال انجام دادند پلی‌مورفیسم rs2070744 ژن NOS-3 مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج یافته‌های آن‌ها با ورزشکاران و افراد دیگر شامل ۵۳ ورزشکار نخبه رشته‌های قدرتی و همچنین، ۱۰۰ مرد سالم غیر فعال (گروه کنترل) مورد مقایسه قرار گرفت. محققان به این نتیجه رسیدند که بین تواتر ژنوتیپ ورزشکاران قدرتی، استقامتی و گروه کنترل تفاوت معنی‌داری وجود دارد. نتایج حاکی از این بود که آلل C در ورزشکاران فوتبال نسبت به سایر گروه‌ها شامل ورشکاران قدرتی، استقامتی و گروه کنترل بیشتر بود (۹). در ورزشکاران اوکراینی آلل T پلی‌مورفیسم rs2070744 در کسانی که نخبه استقامتی بودند از گروه کنترل به‌طور معنی‌داری بیشتر بود (۶). در این تحقیق پژوهشگران ۱۲۷ ورزشکار سطح بالا شامل ۳۰ شناگر زیر آب، ۴۱ قایقران و ۵۶ ورزشکار قدرتی-سرعتی را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج حاکی از این بود که شناگران که تمرینات و موفقیت‌های استقامتی بیشتری داشتند از ژنوتیپ C/C برخوردار بودند. پژوهشگران در پایان گزارش خود حدس زدند که برای مواجهه با شرایط هایپوکسی (همان چیزی که در ورزش‌های استقامتی رخ می‌دهد) این تفاوت ژنتیکی می‌تواند یک مزیت به حساب آید. وقتی‌که شناگران رشته‌های مسافت بلند و مسافت کوتاه با هم مقایسه شدند، نشان داده شد که تفاوت در ژنوتیپ و توالی آلل‌ها در پلی‌مورفیسم rs2070744 با هم متفاوت بودند. در زنانی که در شنای مسافت بلند موفق بودند آلل T و ژنوتیپ TT یک عامل موفقیت محسوب می-شد. این نشان‌دهنده این موضوع است که احتمالاً وجود تواتر آلل T در rs2070744 می‌تواند در توانایی شناگران، برای طی مسافت‌های طولانی موثر باشد. در طرف مقابل، شناگرانی که در شنای مسافت کوتاه موفق بودند ورزشکارانی بودند که دارای هاپلوتایپ T-C بودند. این موضوع احتمالاً معرف تفاوت‌های ژنتیکی در پلی‌مورفیسم rs2070744 ژن NOS-3 در افراد است. در مقابل بین ورزشکارانی که از V02max بالایی برخوردار بودند و سایرین تفاوتی در ژنوتیپ-

های پلی‌مورفیسم rs2070744 مشاهده نشد که این موضوع در راستای یافته‌های تحقیق ما نیز قرار دارد.

در مطالعه گومز و همکاران نیز نشان داده شده که در ورزشکاران قدرتی – توانی داشتن ژنوتیپ T-C برای موفقیت، یک مزیت است (۱۱). در طول تمرینات ورزشی و در پاسخ به افزایش در میزان فاکتورهای رشدی، هورمون‌ها و سایتوکاین‌ها، بیان NOS اندوتلیالی افزایش پیدا می‌کند (۱۸). به‌نظر می‌رسد انتخاب ژنوتیپ مناسب برای ورزش‌هایی که از دستگاه‌های مختلف انرژی برای کسب موفقیت بهره می‌برند کار پیچیده‌تری باشد. این موضوع به این جهت دارای اهمیت است که برای موفقیت در ورزش‌های ترکیبی ممکن است فردی در یک توانایی بتواند کاستی‌های خود را در توانایی دیگر پوشش دهد. برای مثال، فوتبالیستی که از سرعت بالایی برخوردا نیست ممکن است با استفاده از فاکتورهای دیگر آمادگی جسمانی در ورزش فوتبال موفق باشد، زیرا که داشتن توان هوازی بالا و همچنین، مقاومت در برابر خستگی‌های ناشی از گلیکولیز بی‌هوازی نیز برای فوتبال یک مزیت محسوب می‌گردد. به‌نظر می‌رسد قابلیت شناسایی ژن‌هایی که در دستگاه‌های مختف انرژی دخالت دارند از شناسایی ژن‌هایی که برای موفقیت در یک رشته ورزشی مورد نیاز هستند، کار آسان‌تری باشد. NOS3 به‌وسیله جلوگیری از انقباض عضلات صاف موجود در عروق در تنظیم تون رگی، دخالت دارد. آلل C پلی‌مورفیسم rs2070744 ژن NOS3 در فوتبالیست‌هایی که مورد مطالعه قرار گرفته بودند به‌عنوان یک عامل موفقیت معرفی شد. این مغایر یافته‌هایی بود که در مورد گروه کنترل غیر ورزشکار و همچنین ورزشکاران استقامتی نخبه مشاهده شده بود (۱۴). نتایج این تحقیق که روی ۶۰ نفر از فوتبالیست‌هایی نخبه انجام شد، نشان داد که در مقایسه با ۱۰۰ ورزشکار استقامتی نخبه، ۵۳ ورزشکار ورزش‌های توانی و ۱۰۰ فرد سالم غیر فعال، فوتبالیست‌ها از آلل C بیشتری برخوردار بودند. در تحقیق دیگر که پلی‌مورفیسم *rs2070744* در ورزشکاران مورد مطالعه قرار گرفت نشان داده شد که ورزشکاران توانی، از ورزشکاران نخبه استقامتی و گروه کنترل حامل آلل T بیشتری بودند (ژنوتیپ TT). این مطالعه بین ورزشکاران استقامتی و گروه کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (۵ از ۴۲) (۱۳) که در این مورد به نوعی با یافته‌های ما همخوانی داشت. در تحقیق دیگر نشان داده شد که در پلی‌مورفیسم rs2070744 حاملین آلل C، در حین اجرای ورزش استقامتی زیر بیشینه، فشار سیستولیک کمتری از خود نشان دادند (۱۹).

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی، بین ژنوتیپ‌های CT و TT پلی‌مورفیسم rs2070744 ژن NOS3 و تغییرات عملکرد هوازی زنان تمرین نکرده بعد از ۸ هفته تمرین هوازی رابطه معنی‌داری مشاهده نشد.

منابع

1. Ben Ali M., Messaoudi S., Ezzine H., Mahjoub T. 2015. Contribution of eNOS variants to the genetic susceptibility of coronary artery disease in a tunisian population. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 19(4):203-208.

2. Boidin M., Dawson E.A., Thijssen D.H., Erskine R.M. 2022. VEGFA rs2010963 GG genotype is associated with superior adaptations to resistance versus endurance training in the same group of healthy, young men. *Molecular Genetics and Genomics*, 298(1):119-129.

3.Boraczyński T., Urniaż J. 2008. Changes in aerobic and anaerobic power indices in elite handball players following a 4-week general fitness mesocycle. *Journal of Human Kinetics*, 19(1):131-140.

4. Brutsaert T.D., Parra E.J. 2006. What makes a champion?: Explaining variation in human athletic performance. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 151(2-3):109-123.

5. Büttner P., Mosig S., Lechtermann A., Funke H., Mooren F.C. 2007. Exercise affects the gene expression profiles of human white blood cells. *Journal of applied physiology*, 102(1):26-36.

6. Drozdovska S., Dosenko V., Ilyin V., Filippov M., Kuzmina L. 2009. Allelic polymorphism of endothelial NO-synthase (eNOS) association with exercise-induced hypoxia adaptation. *Baltic Journal of Health and Physical Activity*, 1(1):13-19.

7. Duffy S.J., New G., Tran B.T., Harper R.W., Meredith I.T. 1999. Relative contribution of vasodilator prostanoids and NO to metabolic vasodilation in the human forearm. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 276(2):63-70.

8. Dumas S.J., Meta E., Borri M., Luo Y., Li X., Rabelink T.J. 2021. Phenotypic diversity and metabolic specialization of renal endothelial cells. *Nature Reviews: Nephrology*, 17(7):441-464.

9. Eynon N., Ruiz J.R, Yvert T., Santiago C., Gómez-Gallego F., Lucia A.. 2012. The C allele in NOS3-786 T/C polymorphism is associated with elite soccer player's status. *International Journal of Sports Medicine*, 33(07):521-524.

10. Gilligan D.M., Panza J.A., Kilcoyne C.M., Waclawiw M.A., Casino P.R., Quyyumi A.A. 1994. Contribution of endothelium-derived nitric oxide to exercise-induced vasodilation. *Circulation*, 90(6):2853-2858.

11. Gómez-Pinilla F., Dao L., So V. 1997. Physical exercise induces FGF-2 and its mRNA in the hippocampus. *Brain Research*, 764(1-2):1-8.

12. Hyndman M.E., Parsons H.G., Verma S., Bridge P.J., Edworthy S., Jones C., Lonn E., Charbonneau F., Anderson T.J. 2002. The T-786→C mutation in endothelial nitric oxide synthase is associated with hypertension. *Hypertension*, 39(4):919-922.

13. Lakka H.M., Lakka T.A., Rankinen T., Rice T., Rao D., Leon A.S., Skinner J.S., Bouchard C. 2006. The TNF-α G-308A polymorphism is associated with C-reactive protein levels: the HERITAGE Family Study. *Vascular Pharmacology*, 44(5):377-383.

14. Lucia A., Martin M., Esteve-Lanao J., San Juan A., Rubio J., Olivan J., Arenas J. 2006. C34T mutation of the AMPD1 gene in an elite white runner. *British Journal of Sports Medicine*, 40(3):e7.

15.Marsden P.A., Heng H., Scherer S., Stewart R., Hall A., Shi X. 1993. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *Journal of Biological Chemistry*, 268(23):17478-17488.

16. Mosleh M., Aljeesh Y.I., Dalal K. 2016. Burden of chronic disease in the Palestinian healthcare sector using disability-adjusted life years (DALY), Palestine. *Diversity and Equality in Health and Care*, 13(3):261-268.

17. Pi X., Xie L., Patterson C. 2018. Emerging roles of vascular endothelium in metabolic homeostasis. *Circulation Research*, 123(4):477-494.

18. Ren W., Yang X., Jiang X., Li Z., Zhang Z. 2010. Chronic hypoxia and exercise training affect the NO content and NOS activity of rat skeletal muscle. *International SportMed Journal*, 11(1):244-257.

19. Scott R.A., Wilson R.H., Goodwin W.H., Moran C.N., Georgiades E., Wolde B. 2005. Mitochondrial DNA lineages of elite Ethiopian athletes. Comparative Biochemistry and Physiology. *Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 140(3):497-503.

Rinsho byori *The Japanese Journal of Clinical Pathology*, 46(12):1199-1204.

20. Shesely E.G., Maeda N., Kim H.S., Desai K.M., Krege J.H., Laubach V.E. 1996. Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(23):13176-13181.

21. Sponton C.H., Esposti R., Rodovalho C.M., Ferreira M.J., Jarrete A.P., Anaruma C.P. 2014. The presence of the NOS3 gene polymorphism for intron 4 mitigates the beneficial effects of exercise training on ambulatory blood pressure monitoring in adults. American *Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 306(12):1679-1691.

22. Wolfarth B., Rankinen T., Mühlbauer S., Ducke M., Rauramaa R., Boulay M., et al. 2008. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and elite endurance athlete status: the genathlete study. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, 18(4):485-490.

23. Yasujima M., Tsutaya S., Shoji M. 1998. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and hypertension.

24. Zanchi A., Moczulski D.K., Hanna L.S., Wantman M., Warram J.H., Krolewski A.S. 2000. Risk of advanced diabetic nephropathy in type 1 diabetes is associated with endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism. *Kidney International*, 57(2):405-413.

25. Zhu X., Kong D., Zhang L., Sun Y., Na S., Han C. 2013. Correlation analysis of angiotensin-converting enzyme, angiotensinogen, and endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and the progression of immunoglobulin A nephropathy/membranous nephropathy. *Human Pathology*, 44(12): 2806-2813.

26. Zmijewski P., Cięszczyk P., Ahmetov I.I., Gronek P., Lulińska-Kuklik E., Dornowski M. 2018. The NOS3 G894T (rs1799983) and-786T/C (rs2070744) polymorphisms are associated with elite swimmer status. *Biology of Sport*, 35(4):313-319.