

بررسی مقدار تغییرات حداکثر اکسیژن مصرفی در پاسخ به تمرین هوازی در بین حاملین ژنوتیپ‌های متفاوت HIF-1 α

پرویز شجاعی^۱، مهران قهرمانی^۲، سیروس فارسی^۳

^۱گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران، ^۲گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد گیلان غرب، دانشگاه آزاد اسلامی، گیلان غرب، ایران، ^۳گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران

تاریخ وصول: ۱۴۰۱/۰۷/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: نقش برجسته ژن HIF1 α در سازگاری به تمرینات هوازی مورد تأیید قرار گرفته است. تا کنون اطلاعات دقیقی در مورد ژنوتیپ‌های این ژن وجود ندارد، لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی مقدار تغییرات حداکثر اکسیژن مصرفی در پاسخ به تمرین هوازی در بین حاملین ژنوتیپ‌های متفاوت HIF-1 α بود.

روش بررسی: این یک مطالعه نیمه تجربی از نوع توسعه‌ای و کاربردی می‌باشد که در سال ۱۴۰۰ انجام شد. در این مطالعه ۲۳ زن غیر فعال دارای اضافه وزن (قد $157 \pm 2/8$ سانتی‌متر، وزن $74 \pm 1/8$ کیلوگرم، سن $38 \pm 5/4$ سال، شاخص توده بدنی $32 \pm 2/4$ کیلوگرم بر متر مربع، انتخاب و در ۸ هفته تمرین هوازی شامل هر هفته ۵ جلسه و هر جلسه ۳۰ دقیقه با شدت فزاینده (۵۵ تا ۷۵ درصد ضربان قلب بیشینه) شرکت کردند. قبل و بعد از دوره تمرین، توان هوازی (VO_{2max}) از طریق تست بروس اندازه‌گیری شد. نمونه بزاقی در طی ۲۴ ساعت از همه آزمودنی‌ها اخذ و جهت تعیین ژنوتیپ به آزمایشگاه منتقل شد. آزمودنی‌ها در دو گروه ژنوتیپی شامل CC و CT قرار گرفتند. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون‌های آماری لوین و تی مستقل در سطح اطمینان ۹۵ درصد تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: یافته‌ها نشان داد که توان هوازی ژنوتیپ‌های CC و CT ژن HIF1- α افزایش پیدا کرد. تفاوت معنی‌داری بین دو گروه ژنوتیپی ملاحظه نشد ($p=0/079$ و $p=0/544$). هر چند تا حدی مقدار میانگین تغییرات توان هوازی ژنوتیپ CT بعد از ۸ هفته تمرین هوازی نسبت به دو ژنوتیپ دیگر بیشتر بود، اما این تفاوت معنی‌دار نبود.

نتیجه‌گیری: هشت هفته تمرین هوازی منجر به افزایش توان هوازی در زنان غیر فعال چاق شد و در این راستا، افزایش HIF1- α و به دنبال آن القای هایپوکسی ایفای نقش می‌کند، اما به نظر نمی‌رسد که تفاوتی بین ژنوتیپ‌های مختلف ژن HIF1- α در این تغییرات وجود داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: تمرین هوازی، ژنوتیپ، HIF1 α

*نویسنده مسئول: مهران قهرمانی، گیلان غرب، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گیلان غرب، گروه فیزیولوژی ورزشی

Email: mehran.physiology@gmail.com

مقدمه

اضافه وزن و چاقی بیماری مزمنی است که به وسیله تجمع بیش از حد بافت چربی در بدن مشخص می‌شود (۱). همچنین چاقی از عوامل مهم در ابتلای به بسیاری از بیماری‌های خطرناک است که موجب افزایش مرگ و میر در جهان می‌شود (۲).

تغییر شیوه زندگی، عادات غذایی مردم به سمت مصرف غذاهای پرچرب و انرژی‌زا و کاهش فعالیت جسمانی موجب چاقی و اضافه وزن در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه شده است (۳). کشور ایران نیز همانند سایر کشورهای در حال توسعه با شیوع چاقی و عوارض آن مواجه است (۳).

براساس آمار منتشر شده از سوی سازمان جهانی بهداشت، چاقی یکی از ده عامل مهم مرگ و میر است (۴). آثار متابولیک ناشی از چاقی یک عارضه بسیار شایع است که به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل خطرناک بروز بیماری‌هایی مانند؛ دیابت، فشارخون، بیماری‌های شریان کرونر قلبی و آترواسکلروز مطرح است.

ظرفیت استقامتی به دلیل تقویت سیستم قلبی، عروقی و تنفسی برای بسیاری از ورزش‌ها اهمیت دارد و در عین حال موجب سلامتی، زندگی بهتر و کاهش مرگ و میر می‌گردد. بسیاری از ویژگی‌های مربوط به استقامت ممکن است تا حدود ۵۰ درصد از طریق وراثت منتقل شود. با این حال چگونگی نقش انواع DNA به تغییرات استقامت و به ویژه تمرین‌پذیری

و توان هوازی (VO_{2max})، هنوز به طور کامل درک نشده است و برخی جنبه‌ها مورد بحث است (۵). در حین تمرینات استقامتی، بافت‌های درگیر دچار هایپوکسی می‌شوند. هایپوکسی به موقعیت‌های کلینیکی یا محیطی اطلاق می‌شود که هموستاز اکسیژن بافتی را به مخاطره می‌اندازد. سلول‌های هسته‌دار قادرند به کمبود اکسیژن پاسخ دهند. در این شرایط افزایش بیان mRNA، $HIF1\alpha$ (۱) موجب بیان فاکتور عامل القای هایپوکسی ($HIF-1\alpha$) می‌شود که در انواع بافت‌های پستانداران و به طور خاص در عضلات اسکلتی بیان می‌شود. (۱)

پروتئین HIF از دو زیر واحد $HIF1-\alpha$ و $HIF1-\beta$ تشکیل شده است. $HIF1-\alpha$ که در سیتوپلاسم قرار دارد، نیمه عمر کوتاهی (تقریباً ۵ دقیقه) دارد و به اکسیژن فوق العاده حساس است. در حالی که $HIF1-\beta$ در هسته سلول قرار دارد و همواره بیان می‌شود. بیان $HIF1-\alpha$ موجب بیان چندین ژن از جمله؛ اریتروپویتین، بیان ژن (VEGF) (۲)، بیان ژنی آنزیم‌های گلیکولیتیک می‌شود و اثرات منفی در معرض قرارگیری با هایپوکسی را کاهش می‌دهد. در شرایط نورموکسی $HIF1-\alpha$ از طریق هیدروکسیلیشن (از دست دادن عامل OH) به وسیله آنزیم پرولیل - هیدروکسیلاز تخریب می‌شود، تحت شرایط هایپوکسی $HIF1-\alpha$ تثبیت می‌شود، زیرا آنزیم

1-Hypoxia Inducible Factor (HIF-1 α)
2-Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

پرولیل - هیدروکسیلاز غیر فعال می‌شود. بنابراین پروتئین HIF-1 α در شرایط هایپوکسی تثبیت گردیده و به هسته رفته و با اتصال به HIF-1 β هتروداپمر شده سپس کمپلکس HIF به عامل پاسخ به هایپوکسی (HRE)^(۱) را که در DNA قرار دارد، متصل می‌شود. واکنش بین HIF و HRE سرانجام رونویسی ژن هدف فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) را آغاز می‌کند. از این رو همبستگی بالایی بین افزایش بیان mRNA VEGF با تغییرات mRNA HIF-1 α و mRNA HIF-1 β و بین پروتئین VEGF با پروتئین HIF وجود دارد(۶).

بنابر این، فاکتور القایی هیپوکسی(HIF-1 α) می‌تواند رونویسی چندین ژن از جمله عامل رشدی VEGF را فعال نماید. پس VEGF یک ژن هدف برای HIF-1 α است که نشان داده شده در پاسخ به فقدان اکسیژن در آزمایشگاه و در داخل بدن به صورت مثبت تنظیم می‌شود(۷).

نشان داده شده است، هنگامی که شرایط پایدار اکسیژن سلول، دچار اختلال می‌شود، آنزیم پرولیل- هیدروکسیلاز غیر فعال شده، در این شرایط عامل القای هایپوکسی تثبیت می‌شود و HIF-1 α به هسته می‌رود و با HIF-1 β هترو داپمر می‌شود و موجب رخداد هایی در جهت سازگاری با هایپوکسی می‌گردد که شامل بیان ژنی اریتروپوئین، آنژیوژنز، گلیکولیز، خون‌سازی و تحریک کاتکولامین‌ها می‌باشد(۸). بنابراین HIF-1 α و VEGF عوامل ضروری

برای حفظ و نگهداری چگالی عروقی و تأمین اکسیژن در پاسخ به هایپوکسی بافتی هستند(۹).

نقش فعالیت بدنی منظم در سلامتی به خوبی اثبات شده و محرکی قوی برای سازگاری‌های قلبی عروقی و عضلانی است و باعث افزایش توان هوازی، افزایش سوخت و ساز، افزایش عملکرد ورزشی، کاهش استفاده از کربوهیدرات و اتکا به چربی شده و موجب بهتر شدن عملکرد انسولین، کاهش فشارخون در بیماران قلبی و پرفشاری خون می‌شود و به دنبال آن باعث ارتقای آمادگی قلبی - عروقی و تنفسی می‌گردد. در ارتباط با تأثیر فعالیت استقامتی بر فرآیند آنژیوژنز، قبلاً پژوهش‌های گسترده‌ای انجام شده است که اغلب به تأثیر مثبت فعالیت‌های استقامتی بر آنژیوژنز اشاره دارد(۱۱ و ۱۰).

هنگام تمرینات ورزشی استقامتی، به علت نیاز بیشتر سلول به اکسیژن هایپوکسی ایجاد می‌شود. در این شرایط سلول برای بقا اکسیداسیون سلول را مهار کرده و برای تأمین انرژی مورد نیاز سلول به گلیکولیز روی می‌آورد و برای تأمین اکسیژن مورد نیاز بافت و سلول عامل القای هایپوکسی تثبیت می‌شود و در کلیه و کبد اریتروپوئین ترشح می‌شود، اریتروپوئین به مغز استخوان رفته و موجب تولید گلبول قرمز و انتشار آن در گردش خون می‌شود و در هسته موجب بیان رونویسی ژن VEGF برای آنژیوژنز می‌شود(۱۳ و ۱۲).

1-Hypoxia Response Element(HRE)

DNA و مکمل بودن دو رشته، هرگونه جا به جایی در یک رشته تغییری در رشته دیگر و بازهای مکمل ایجاد خواهد کرد.

انسان‌ها هم‌چون سایر یوکاریوت‌ها دارای دو مجموعه مطابق کروموزومی یا به عبارتی دیپلوئید هستند، موجودات دیپلوئید روی هر مجموعه کروموزومی ژن‌های یکسانی دارند، اما توالی این ژن‌ها ممکن است روی دو کروموزوم جفت متفاوت باشد، اگر هر دو آلل یک ارگانسیم دیپلوئیدی یکی باشد، برای آن آلل خاص هموزیگوت گفته می‌شود و اگر دو آلل متفاوت باشند، هتروزیگوت گفته می‌شود. غالباً فراوانی یکی از آلل‌ها در جمعیت بیش از دیگری است و آلل با فراوانی کمتر باید حداقل در ۱ درصد از افراد جمعیت دیده شود. در صورتی که فراوانی یک آلل کمتر از ۱ درصد باشد، به آن جهش گفته می‌شود. بررسی و شناسایی ژن‌های مرتبط با عملکرد استقامت جسمانی با توجه به نقش و تأثیر این ژن‌ها در برخی از شاخص‌های سلامتی (مانند قلبی - عروقی) قابل توجه است و ارزش بررسی آنها را بیشتر نمایان کرده است (۴). لذا هدف از این مطالعه، تعیین و بررسی مقدار تغییرات حداکثر اکسیژن مصرفی در پاسخ به تمرین هوازی در بین حاملین ژنوتیپ‌های متفاوت HIF-1 α بود.

روش بررسی

این یک مطالعه نیمه‌تجربی از نوع توسعه‌ای و کاربردی و به صورت میدانی می‌باشد که در سال

بررسی‌ها نشان داده‌اند که توان هوازی افراد می‌تواند تحت تأثیر عوامل ژنتیکی قرار گیرد. استقامت نه تنها یک عامل کلیدی برای موفقیت در بسیاری از ورزش‌ها است، بلکه با بهبود سلامت و کاهش مرگ و میر مرتبط است. پژوهش‌هایی در مورد دوقلوها و نقش وراثت نشان می‌دهد که چندین ویژگی مرتبط با استقامت وجود دارد که با وراثت نیز ارتباط دارد. با این حال ما هنوز درک ضعیفی از نقش وراثت داریم. این که چه نوع توالی DNA به وراثت و تمرین‌پذیری به تمرین استقامتی کمک می‌کند و یا با ظرفیت استقامتی و یا تمرین‌پذیری و توان هوازی (VO₂max) همراه است، هنوز مورد بحث است. چندین ژن وجود دارد که باعث افزایش توان هوازی می‌شود و در نتیجه به تغییر و افزایش ظرفیت استقامتی در انسان کمک می‌کند (۱۴).

یکی از پولی مورفیسیم‌های HIF-1 α که مورد توجه پژوهشگران قرار دارد، با کد rs11549465 SNP شناخته می‌شود. ژنوتیپ‌های مختلف HIF-1 α (rs11549465) شامل CC و CT هستند که منجر به پاسخ‌های متفاوتی به تغییرات توان هوازی به دنبال تمرینات استقامتی می‌شود، فعالیت بدنی مکانیزم پیچیده‌ای است که دارای اجزای بسیار قوی وابسته به ویژگی‌های ژنتیکی است (۱۵).

توسعه روش‌های تعیین توالی DNA و ژنوتیپ این امکان را فراهم کرده است تا برخی تنوع‌های ژنتیکی فردی که بیانگر عملکرد ورزشی است، شناسایی شود (۱۶). با توجه به دو رشته‌ای بودن

۱۴۰۰ انجام شد. از میان گروهی از مراجعه کنندگان مرکز حرکت و تندرستی تهران، تعداد ۳۳ نفر آمادگی خود را برای مشارکت در طرح اعلام کردند. از این تعداد، گروهی به دلایل مختلف مانند؛ بارداری، آسیب و یا نداشتن شرایط لازم، از پژوهش خارج شدند. در نهایت ۲۳ زن غیر فعال (قد $157 \pm 2/8$ سانتی متر، وزن $74 \pm 1/8$ کیلوگرم، سن $38 \pm 5/4$ سال، BMI $22 \pm 2/4$ کیلوگرم بر متر مربع) تمامی مراحل تمرینی و آزمایشگاهی را انجام دادند و تا پایان پژوهشگران را همراهی کردند. یک هفته قبل از آغاز پروتکل تمرینی، برای اطمینان از وضعیت سلامتی آزمودنی‌ها و عدم سابقه بیماری قلبی، عروقی، دیابت، بیماری‌های عفونی، آلرژی مصرف سیگار یا هر نوع دارو و مکمل، پرسشنامه پزشکی سلامت مورد استفاده قرار گرفت. همچنین، رضایت‌نامه کتبی از تمامی آزمودنی‌ها جهت شرکت در پژوهش اخذ شد. آزمودنی‌ها، تمرینات ورزشی را به مدت ۸ هفته، هر هفته ۵ جلسه و هر جلسه ۳۰ دقیقه با شدت فزاینده، ۵۵ تا ۷۵ درصد ضربان قلب بیشینه انجام دادند. بدین ترتیب که آزمودنی‌ها در دو هفته اول با ۵۵ تا ۶۰ درصد ضربان قلب بیشینه و در دو هفته دوم با ۶۰ تا ۶۵ درصد ضربان قلب بیشینه و ۴ هفته باقی مانده تا پایان دوره تمرین با ۶۵ تا ۷۵ درصد ضربان قلب بیشینه تمرین کردند (۳۴). برای هر جلسه تمرینی ده دقیقه برای گرم کردن قبل از تمرین و ده دقیقه سرد کردن پس از تمرین در نظر گرفته شد. ضربان قلب شرکت کنندگان به وسیله ضربان سنج پولار مدل (پوکس ۱۰۰۰)

ساخت کشور ژاپن کنترل می‌شد. کنترل دقیق تغذیه امکان پذیر نبود و از آزمودنی‌ها خواسته شد تا از رژیم غذایی روزانه خود پیروی کنند و از دارو و یا مکمل‌های غذایی استفاده نکنند. ۴۸ ساعت قبل و ۴۸ ساعت بعد از دوره تمرین، توان هوازی تمام آزمودنی‌ها به وسیله آزمون بروس اندازه‌گیری شد. از آزمون بروس طبق دستورالعمل اجرایی جهت اندازه‌گیری حداکثر اکسیژن مصرفی، استفاده شد. برای تعیین توان هوازی (VO_{2max}) از تست تردمیل بروس استفاده شد. برای هر دو آزمون بروس (قبل و بعد از مداخلات تمرینی) ساعات ۱۷ تا ۲۰ در نظر گرفته شد. زمان فعالیت آزمودنی‌ها بر روی تردمیل ثبت شده و در فرمول VO_{2max} بروس مخصوص زنان قرار گرفت، برای این آزمون از فرمول زیر استفاده شد (۳۲).

$3/9 - (4/8 \times \text{زمان دویدن}) = \text{حداکثر اکسیژن مصرفی}$
 ۴۸ ساعت قبل از دوره تمرین در وضعیت استراحتی (قبل از انجام تست بروس)، نمونه بزاق به وسیله ظروف مخصوص از تمامی آزمودنی‌ها جمع‌آوری و به آزمایشگاه مرکز رشد وابسته به دانشگاه تربیت مدرس تهران برای بررسی و تعیین ژنوتیپ ارسال و نمونه‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

نمونه‌گیری بزاقی در حالی انجام شد که از آزمودنی‌ها خواسته شده بود حداقل به مدت دو ساعت از خوردن امتناع ورزند. استخراج DNA با استفاده از کیت شرکت ژن ورز و جمع‌آوری ۳

درجه و دور 8000 RPM انجام شد. 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.^۱ 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 داده‌ی NCBI^(۱) استفاده شد. پس از اطمینان از اختصاصیت عملکرد پرایمرها، پرایمرها جهت سنتز به شرکت سیناکلون سفارش داده شدند.

F:GGACACAGATTTAGACTTGGAGATG

R:GTGGTGGCATTAGCAGTAGGTTTC

پرایمرهای دریافتی به صورت لیوفیلیزه‌اند که با افزودن مقادیر مشخص آب با توجه به اطلاعات همراه پرایمر باید به غلظت ۱۰۰ پیکومولار رسانده شود تا به عنوان محلول اصلی مورد استفاده قرار گیرد. از این محلول رقت ۰/۰۵ تهیه و به عنوان محلول کاری^(۲) استفاده شد. تمامی استوک‌های تهیه شده در دمای ۲۰- سانتی‌گراد نگهداری شدند.

در مرحله ست آپ کردن پرایمر برای هر جفت از پرایمرهای طراحی شده، از واکنش PCR شیب دمایی جهت یافتن بهترین دمای اتصال پرایمر استفاده شد. جهت تعیین ژنوتیپ ژن از روش RFLP^(۳) استفاده

1-National Center for Biotechnology Information
2-Working solution
3-Restriction Fragment Length Polymorphism(RFLP)

میلی‌لیتر بزاق انجام گرفت. پس از اضافه کردن ۳ میلی‌لیتر محلول نگهدارنده، ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول بزاق به یک فالتون اسریل جدید منتقل شد. پس از آن، ۲/۵ میلی‌لیتر بافر لیز کننده به محلول بزاق اضافه و ورتکس کردن به مدت ۲۰ ثانیه انجام شد و سپس ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگه داشته شد.

در ادامه مراحل آزمایشگاهی، پس از اضافه کردن ۳۰ میکرولیتر آران ایزه A و سپس ورتکس کردن آن، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت نگه داشته شد. اضافه کردن ۴۰ میکرولیتر پروتیناز K و سپس ورتکس کردن به مدت ۲۰ ثانیه نگهداری در دمای اتاق به مدت ۱ ساعت در مرحله بعدی اتفاق افتاد.

پس از آن ۲ میلی‌لیتر محلول 6M NaCl به محلول بالا اضافه شد و ورتکس کردن آن به مدت ۲۰ ثانیه به طول انجامید و به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ نگه داشته شد. سانتریفیوژ محلول حاصله به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه و دور 12000 RPM انجام و سپس برداشتن محلول روی و انتقال آن به یک فالتون جدید و سانتریفیوژ دوباره با شرایط بالا صورت پذیرفت. محلول روی به یک فالتون جدید منتقل و ۷ میلی‌لیتر ایزوپروپانول سرد به آن اضافه و سپس فالتون چندین بار سر و ته شد. محلول حاصله به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه و دور 10000 RPM تحت سانتریفیوژ قرار گرفت.

مرحله بعد شامل دور ریختن محلول روی و اضافه کردن ۲ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد سرد بود. سانتریفیوژ محلول حاصله به مدت ۳ دقیقه در دمای ۴

HIF1- α در جدول ۱ تا ۳ ارایه شده است. همان طور که مشاهده می‌شود، توان هوازی آزمودنی‌ها در ارتباط با ژنوتیپ‌های CT و CC در پیش‌آزمون و پس‌آزمون افزایش داشته، اما معنی‌دار نبود (به ترتیب $p=0/079$ و $p=0/554$). هر چند تا حدی مقدار میانگین تغییرات توان هوازی ژنوتیپ CT بعد از ۸ هفته تمرین هوازی نسبت به دو ژنوتیپ دیگر بیشتر بود، اما این تفاوت معنی‌دار نبود. جدول ۱ در پیش‌آزمون توان هوازی حاکی از آن است که در توان هوازی ژنوتیپ‌های HIF1- α زنان غیر فعال تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ($p=0/079$)؛ هر چند تا حدی میانگین پیش‌آزمون توان هوازی ژنوتیپ CC ژن HIF1- α نسبت به نوع CT بیشتر می‌باشد. در جدول ۲ بین پس‌آزمون توان هوازی پروفایل‌های ژن HIF1- α به دنبال هشت هفته تمرینات هوازی تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ($p=0/554$). هر چند تا حدی میانگین ژنوتیپ CT ژن HIF1- α نسبت به نوع CC بیشتر می‌باشد. همچنین در جدول ۳، نتایج مقایسه بین تغییرات میانگین پیش و پس‌آزمون توان هوازی ژنوتیپ‌های HIF1- α به دنبال هشت هفته تمرین تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ($p=0/114$)؛ هر چند تا حدی مقدار مقدار تفاوت در ژنوتیپ CT نسبت به نوع CC بیشتر است.

شد. انجام هضم آنزیمی در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد و به صورت یک شب شامل یک میکرولیتر آنزیم، ۳ میکرولیتر محصول PCR، ۲ میکرولیتر بافر مخصوص و ۱۵ میکرولیتر آب دیونیزه بود.

پس از هضم آنزیمی، محصول هضم آنزیمی روی ژل پلی‌اکریل‌امید (PAGE) ۱۲ درصد جهت مشاهده قطعات برش یافته الکتروفورز شد و سه نمونه با ژنوتیپ‌های مختلف برای توالی‌یابی 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.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری لوین و تی مستقل در سطح اطمینان ۹۵ درصد تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

نتایج آزمون تی مستقل مربوط به توان هوازی آزمودنی‌ها و ارتباط ژنوتیپ‌های مختلف ژن

جدول ۱: مقایسه میانگین‌های توان هوازی (میلی‌لیتر بر کیلوگرم در دقیقه) پیش‌آزمون پروفایل‌های ژنی HIF1- α

ژنوتیپ	تعداد	انحراف معیار \pm میانگین	سطح معنی‌داری
CC	۱۷	۲۹/۶±۶/۰۹	۰/۰۷۹
CT	۶	۲۸/۳±۸/۹۱	

جدول ۲: مقایسه میانگین‌های توان هوازی (میلی‌لیتر بر کیلوگرم در دقیقه) پس از آزمون پروفایل‌های ژنی $HIF1-\alpha$

ژنوتیپ	تعداد	انحراف معیار \pm میانگین	سطح معنی‌داری
CC	۱۷	۳۵/۷ \pm ۴۵/۷	۰/۵۴۴
CT	۶	۳۷/۵ \pm ۴/۱۴	

جدول ۳: مقایسه تفاوت‌های پیش و پس از آزمون‌های توان هوازی (میلی‌لیتر بر کیلوگرم در دقیقه) پروفایل‌های ژنی $HIF1-\alpha$

ژنوتیپ	تعداد	انحراف معیار \pm میانگین	سطح معنی‌داری
CC	۱۷	۳۵/۷ \pm ۴۵/۷	۰/۱۱۴
CT	۶	۳۷/۵ \pm ۴/۱۴	

بحث

نقش برجسته ژن $HIF1\alpha$ در سازگاری به تمرینات هوازی مورد تایید قرار گرفته است. تا کنون اطلاعات دقیقی در مورد ژنوتیپ‌های این ژن وجود ندارد، لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی مقدار تغییرات حداکثر اکسیژن مصرفی در پاسخ به تمرین هوازی در بین حاملین ژنوتیپ‌های متفاوت $HIF1-\alpha$ بود.

بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر، توان هوازی آزمودنی‌ها در پس از آزمون افزایش یافته، اما تفاوت‌ها معنی‌دار نیست و حاکی از آن است که تغییرات توان هوازی معنی‌دار نبوده است.

پژوهش‌ها نشان داده که تمرین هوازی منجر به افزایش توان هوازی در افراد کم تحرک می‌شود (۱۷ و ۱۵). یافته‌های مشابه گزارش کرده‌اند که تمرین تداومی و اینتروال، توان هوازی را به میزان زیادی افزایش می‌دهد (۱۹ و ۱۸). کاملاً پذیرفته شده است که افزایش VO_{2max} همراه با تمرین، به دلیل افزایش برون ده قلبی و افزایش تهویه ریوی است (۱۲). با این حال، داده‌های ژنتیکی در مورد

تأثیرگذاری ژنوتیپ‌های ژن $HIF1a$ بر تغییرات توان هوازی زیاد نیستند.

به هر حال ما نتوانستیم مطالعه‌ای را در مورد ارتباط ژنوتیپ‌های ژن $HIF1-\alpha$ با تغییرات توان هوازی در زنان غیرفعال پیدا کنیم، لذا یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که تغییرات توان هوازی با ژنوتیپ‌های CT و CC در زنان غیرفعال معنی‌دار نبود. لذا برای اخذ نتایج بهتر و دقیق‌تر نیازمند پژوهش‌های بیشتری در این زمینه می‌باشد. در هر صورت چنانچه در پژوهش‌های آینده از حجم نمونه بالاتری از آزمودنی‌ها استفاده شود، شاید بتوان تفاوت معنی‌دار بین تغییرات توان هوازی ژنوتیپ‌های مختلف را مشاهده کرد. در پژوهشی بر مبنای متآنالیز با مطالعه ۳۵ مقاله، نشان داده شد که ۹۷ ژن می‌توانند در سازگاری با تمرینات استقامتی برای بهبود توان هوازی دخالت داشته باشند (۲۰). برخی از ژن‌هایی که در انواع توالی DNA انسان با ظرفیت استقامتی و یا تمرین پذیری VO_{2max} همراه است عبارتند از: (ACTN3, ADCY5, ADRB2, BDKRB2, HIF1A, PPARC1A, PPARC1B, PPP3CA) ، این

تنوع ژنتیکی ژن‌های استقامتی به تغییر ظرفیت استقامتی انسان نیز کمک می‌کند (۳۳). با این حال، همان طور که گفته شد، بر اساس پژوهش حاضر مطالعه‌ای به بررسی ارتباط ژنوتیپ‌های مختلف HIF1-a با تغییرات توان هوازی به دنبال تمرین انجام نشده است. بررسی اثر ژنوتیپی HIF-1a در سازگاری با تمرینات ورزشی به دلیل نقش این ژن در هموستاز اکسیژن دارای اهمیت است (۲۱). اگر چه نتیجه پژوهش حاضر نشان داد رابطه تغییرات توان هوازی با ژنوتیپ‌های ژن HIF1a معنی‌دار نمی‌باشد.

پژوهش‌هایی در مورد عامل القای هایپوکسی در فیزیولوژی و پزشکی و تأمین اکسیژن برای مصرف در سلول و نقش آن در متابولیسم انجام شده است. نتیجه گرفته‌اند که هموستاز اکسیژن یک اصل سازمان دهنده برای درک تکامل و توسعه در فیزیولوژی و پاتوبیولوژی در یاخته‌های پر سلولی‌ها است. بر همین اساس، فاکتورهای ناشی از هایپوکسی (HIFs) فعال کننده‌های رونویسی هستند (۶). پژوهش‌های جدید، پیشرفت‌هایی در روشن کردن نقش هموستاتیک HIF ها در بسیاری از سیستم‌های فیزیولوژیکی به دست آورده‌اند. ممکن است برای اهداف درمانی نیز، تعیین عواقب و علل بد تنظیمی پاتولوژیک HIF ها دارای اهمیت باشد (۵). همچنین ارتباط ژن HIF1a P582S در پاسخ به تمرین استقامتی در زنان جوان که تغییرات توالی در ژن کد کننده فاکتور ۱-القاه هایپوکسی (HIF1a) با عملکرد فیزیولوژیکی همراه بوده و می‌تواند با پاسخ‌های

ورزشی همراه باشد (۸). همچنین تغییر توالی HIF1- α ناشی از هایپوکسی ارتباط با حداکثر اکسیژن مصرفی دارد و با نتایج پژوهش حاضر همخوان است. عامل القای هایپوکسی (HIF1- α) یک ژن نامزد در ارتقاء توان هوازی (VO2max) قبل و بعد از تمرینات استقامتی است. تحقیقی برای شناسایی تغییر توالی ژن HIF1- α و این که آیا این توالی با حد اکثر اکسیژن مصرفی، قبل و بعد از تمرینات هوازی ارتباط دارد یا خیر انجام شد و نتایج نشان داده افرادی که دارای ژنوتیپ CC بوده و در سنین ۶۵ و ۶۰ سال بودند، توان هوازی در اثر تمرینات استقامتی آنها معنی‌دار نبوده است (p=۰/۰۷۶) (۲۲).

همچنین در این راستا، بررسی تأثیر سه هفته تمرین استقامتی در شرایط نورموکسی و هایپوکسی بر مقادیر HIF1- α و VEGF عضله اسکلتی و لوکوسیت‌ها پرداخته شده و نتیجه‌گیری شده که بیان ژن HIF1- α در عضله گروه تمرین در شرایط هایپوکسی کاهش و در لوکوسیت‌ها افزایش یافته است در حالی که مقادیر آن در گروه تمرین در شرایط نورموکسی در عضلات افزایش داشته است و مقادیر VEGF در هر دو گروه تجربی افزایش معنی‌داری داشته است (۱۸).

همچنین در فیزیولوژی و پزشکی نشان داده شده که هموستاز اکسیژن یک اصل سازمان دهنده برای درک تکامل، توسعه دانش فیزیولوژی و پاتوبیولوژی در یاخته‌های پر سلولی‌ها است و فاکتورهای ناشی از هایپوکسی (HIFs) فعال کننده‌های

ممکن است با مقادیر هایپوکسی حاد حاصل نشود. بنابراین به نظر می‌رسد تمرین به مدت طولانی‌تری نیاز باشد تا نتایج و سازگاری‌های لازم حاصل گردد(۹).

هم‌چنین کادمیوم موجب تخریب وابسته به پروتئازوم پروتئین HIF1- α و کاهش فعالیت آن و نیز کاهش بیان ژن‌های القایی هایپوکسی در شرایط هایپوکسیک می‌شود(۲۵). فاکتور القایی هایپوکسی (HIF1- α) تنظیم‌کننده مهمی در پاسخ‌های مولکولی به هایپوکسی و میانجی دامنه وسیعی از سازوکارهای سلولی و فیزیولوژیکی ضروری برای سازگاری با کاهش اکسیژن به منظور بقای ارگانیسم است(۲۶).

در پژوهشی از افزایش سطوح HIF-1a در اثر تمرینات ورزشی استقامتی حمایت شده است(۲۷). هم‌چنین هایپوکسی موضعی ایجاد شده ناشی از تمرینات استقامتی از محرک‌های اولیه برای سازگاری‌هایی مانند افزایش چگالی مویرگی و ظرفیت اکسیداتیو محسوب می‌شود(۲۱). مشاهده شده است افزایش فعالیت HIF-1-a و ساز و کارهای وابسته به آن حتی بعد از یک جلسه فعالیت استقامتی مؤثر است(۲۸). علاوه بر این، برخی پژوهش‌ها سازگاری و تثبیت یا کاهش HIF1- α در اثر تمرینات ورزشی را گزارش کرده‌اند(۲۹). هم‌چنین تحقیقی بر روی موش‌ها انجام شد که نتایج آن نشان داد که هایپوکسی درون سلولی در هنگام انجام فعالیت ورزشی در شرایط نورموکسی می‌تواند باعث افزایش القای HIF1- α و متعاقب آن رونویسی ژن VEGF شود(۳۰).

رونویسی بسیاری از ژن‌هاست که به عنوان تنظیم‌کننده اصلی هموستاز اکسیژن در کلیه گونه‌های پر سلولی و آسیب‌شناسی عمل می‌کنند. پیشرفت‌های سریع در روشن کردن نقش هموستاتیک HIFها در بسیاری از سیستم‌های فیزیولوژیکی و تعیین عواقب و علل شدید بدتنظیمی پاتولوژیک و بررسی احتمالی HIFها برای اهداف درمانی است(۶). هم‌چنین کمبود اکسیژن و پاسخ به استرس هیپوکسی، اکسیژن که یک ماده مغذی ضروری است و به عنوان یک بستر کلیدی در متابولیسم سلولی و انرژی‌های زیستی عمل می‌کند. در انواع حالات فیزیولوژیک و پاتولوژیک، موجودات زنده با کم بود اکسیژن کافی مواجه می‌شوند. برای مقابله با این استرس، پاسخ‌های حفظ شده تکاملی درگیر هستند، در پستانداران، پاسخ رونویسی اولیه به استرس هیپوکسیک، به وسیله عوامل ناشی از هیپوکسی (HIF) انجام می‌شود، در حالی که به طور متعارف به وسیله آنزیم‌های حاوی پرولیل-هیدروکسیلاز تنظیم می‌شود که زیر واحدهای HIF و تعداد زیادی از عوامل دیگر، از جمله HIF1- α (FIH1)، سیرتوئین‌ها و متابولیت‌های مهارکننده فاکتور، پاسخگو هستند. این عوامل رونویسی در هموستاز بافت طبیعی عمل کرده و بر جنبه‌های مهم پیشرفت و بهبود بیماری تأثیر می‌گذارد.

هم‌چنین پاسخ عضلات اسکلتی انسان به یک دوره تمرین حاد در محیط هیپوکسیک، بر بیان ژن‌های مؤثر در متابولیک تأثیر دارد. بهبود عملکرد میتوکندری با تمرینات متناوب در شرایط هایپوکسی

بر خود لازم می‌دانند از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد و تمامی آزمودنی‌های شرکت‌کننده و کسانی که ما را در اجرای این تحقیق یاری رساندند، نهایت تشکر و قدردانی را داشته باشند.

پاسخ‌های التهابی، القای بیان سیتوکین‌های التهابی و پاسخ به رادیکال‌های آزاد از تأثیرات تمرینات ورزشی مرتبط با بیان HIF1- α می‌باشند (۱۳). نکته قابل ذکر این که یکی از محدودیت‌های پژوهش حاضر، عدم کنترل دقیق رژیم غذایی آزمودنی‌ها بود که امکان دارد تغذیه بر سازگاری‌های ناشی از تمرین تأثیر داشته باشد، پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های آینده به آن توجه شود، لذا پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های آینده تمرینات استقامتی با تعداد آزمودنی و زمان بیشتر انجام شود.

نتیجه‌گیری

هشت هفته تمرین هوازی منجر به افزایش توان هوازی در زنان چاق می‌شود و در این راستا، افزایش HIF1- α و به دنبال آن القای هایپوکسی ایفای نقش می‌کند. با این حال، به نظر نمی‌رسد که تفاوتی بین ارتباط ژنوتیپ‌های مختلف ژن HIF1- α با توان هوازی و این تغییرات وجود داشته باشد. با وجود این برای درک بهتر و روشن‌تر از نقش ژنوتیپ‌های HIF1- α نیاز به تلاش‌های علمی و تحقیقاتی بیشتری است.

تقدیر و تشکر

پژوهش حاضر حاصل کار رساله دکتری فیزیولوژی ورزشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد با کد اخلاق IR.IAU.B.REC.1399.008 می‌باشد که با حمایت مالی این دانشگاه انجام شد. نویسندگان

REFERENCES

1. Ahmetov II, Egorova E, Gabdrakhmanova L, Fedotovskaya O. Genes and athletic performance: an update. *Genetics and Sports* 2016; 61: 41-54.
2. McPhee JS, et al., HIF1A P582S gene association with endurance training responses in young women. *European Journal of Applied Physiology* 2011; 111(9): 2339-47.
3. Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Molecular Cell* 2010; 40(2): 294-309.
4. Mooren F, Völker K. *Molecular and Cellular Exercise Physiology*. Human Kinetics Publishers, 2005.
5. Lindholm M, Rundqvist H. Skeletal muscle hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and exercise. *Exp Physiol* 2016; 101(1): 28-32.
6. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 2003; 3(10): 721-32.
7. Bouchard C, Sarzynski M, Rice T, Kraus W, Church T, Sung Y, et al. Genomic predictors of the maximal O₂ uptake response to standardized exercise training programs. *Journal of Applied Physiology* 2011; 110(5): 1160-70.
8. Cao D, Hou M, Guan Y, Jiang M, Yang Y, feng Gou H. Expression of HIF-1 α and VEGF in colorectal cancer: association with clinical outcomes and prognostic implications. *BMC Cancer* 2009; 9(1): 1-9.
9. Slivka D, Heesch M, Dumke C, Cuddy J, Hailes W, Ruby B. Human skeletal muscle mRNA response to a single hypoxic exercise bout. *Wilderness Environ Med* 2014; 25(4): 462-5.
10. Yaghoob Nezhad F, Verbrugge S, Schönfelder M, Becker L, Angelis M, Wackerhage H. Genes whose gain or loss-of-function increases endurance performance in mice: a systematic literature review. *Frontiers in Physiology* 2019; 10: 262.
11. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* 2012; 148(3): 399-408.
12. Hickson R, Bomze H, Holloszy J. Linear increase in aerobic power induced by a strenuous program of endurance exercise. *Journal of Applied Physiology* 1977; 42(3): 372-6.
13. Jones L, Viglianti B, Tashjian J, Kothadia S, Keir S, Freedland S, et al. Effect of aerobic exercise on tumor physiology in an animal model of human breast cancer. *Journal of Applied Physiology* 2010; 108(2): 343-8.
14. Xia X, Kung AL. Preferential binding of HIF-1 to transcriptionally active loci determines cell-type specific response to hypoxia. *Genome Biology* 2009; 10(10): 1-12.
15. Bouchard C. Genomic predictors of trainability. *Experimental Physiology* 2012; 97(3): 347-52.
16. Arabzadeh E, Mirdar S, Fathi Z. Measurement of levels of lung HIF-1 α protein in response to tapering for 14-and 21-day with nigella sativa supplementation in maturing rat, with histological study. *Sport Sciences for Health* 2015; 11(2): 195-202.
17. Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen O. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2007; 14(6): 753-60
18. Mounier R, Pialoux V, Roels B, Thomas C, Millet G, Mercier J, et al. Effect of intermittent hypoxic training on HIF gene expression in human skeletal muscle and leukocytes. *European Journal of Applied Physiology* 2009; 105(4): 515-24.
19. Vogt M, Puntchart A, Geiser J, Zuleger C, Billeter R, Hoppeler H. Molecular adaptations in human skeletal muscle to endurance training under simulated hypoxic conditions. *J Appl Physiol* 2001; 91: 173-82.
20. Williams CJ, Williams MG, Eynon N, Ashton KJ, Little JP, Wisloff U, et al. Genes to predict VO₂max trainability: a systematic review. *BMC Genomics* 2017; 18(8): 81-110.
21. Lindholm M, Rundqvist H. Skeletal muscle hypoxia-inducible factor-1 and exercise. *EXP Physiol* 2016; 101(1): 28-32.
22. Prior SJ, Hagberg JM, Phares DA, Brown MD, Fairfull L, Ferrel RE, et al. Sequence variation in hypoxia-inducible factor 1 α (HIF1A): association with maximal oxygen consumption. *Physiological Genomics* 2003; 15(1): 20-6.

23. Gorgi AO, Mirdar Harijani SH, Nazari S, Hedayati M. The effect of endurance training and curcumin supplement on lung HIF- α 1 levels in rat exposed to lead acetate. *Sport and Exercise Physiology* 2011; 7: 523-34.
24. Mirdar Harijani SH, Ali asgharzede Oliaei H, Hamidian G, Mosavi N. The effect of swimming endurance training and silymarin supplementation during pregnancy on maternal cadmium exposure-induced apoptosis in hepatocytes of rat neonates. *Journal of Practical Studies of Biosciences in Sport* 2014; 2(3): 9-18.
25. Maxwell PH, Wiesener M, Chang G, Clifford S, Vaux E, Cockman M, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999; 399(6733): 271-5.
26. Weidemann A, Johnson R. Biology of HIF-1 α . *Cell Death & Differentiation* 2008; 15(4): 621-7.
27. Yessis M. *Secrets of Russian Sports Fitness and Training: Ultimate Athlete Concepts*, 2008.
28. Bentley JK, Hershenson MB. Airway smooth muscle growth in asthma: proliferation, hypertrophy, and migration. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2008; 5(1): 89-96.
29. Vogt M, Puntschart P, Geiser J, Zuleger C, Billeter R, Hoppeler H. Molecular adaptations in human skeletal muscle to endurance training under simulated hypoxic conditions. *Journal of Applied physiology* 2001; 91(1): 173-82.
30. Tang K, Breen E, Wagner H, Brutsaert T, Gassmann M, Wagner P. HIF and VEGF relationships in response to hypoxia and sciatic nerve stimulation in rat gastrocnemius. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 2004; 144(1): 71-80.
31. Dastah S, Tofighi A, Tolouei Azar J, Alivand M. Aerobic exercise leads to upregulation of Mir-126 and angiogenic signaling in the heart tissue of diabetic rats. *Gene Reports* 2020;100914.
32. Scribbans T, Vecsey S, Hankinson P, Foster W, Gurd B. The effect of training intensity on vo_{2max} in young healthy adults: a meta-regression and meta-analysis. *International Journal of Exercise Science* 2016; 9: 230-47.
33. Yaghoob Nezhad F, Verbrugge SAJ, Schönfelder M, Becker L, Hrabe de Angelis M, Wackerhage H. Genes whose gain or loss-of-function increases endurance performance in mice: a systematic literature review. *Front Physiol* 2019, 00262.
34. McLaughlin EJ. A comparison between two training programs and their effects on fatigue rates in women. *J Strength Cond Res* 2001; 15(1): 25-9.

Investigating the Amount of Changes in VO₂-Max in Response to Aerobic Exercise Among Careers of Different Genotypes of HIF-1 α Gene

Shojaei P¹, Ghahramani M^{2*}, Farsi S³

¹Department of Exercise Physiology, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran, ²Department of Exercise Physiology, Gilan-E-Gharb Branch, Islamic Azad University, Gilan-E-Gharb, Iran, ³Department of Exercise Physiology, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran

Received: 14 Oct 2022 Accepted: 19 Feb 2023

Abstract

Background & aim: The prominent role of HIF1 α gene in adaptation to aerobic exercise has been confirmed. So far, there is no accurate information about the genotypes of this gene, so the aim of the present study was to determine and investigate the amount of changes in maximum oxygen consumption in response to aerobic exercise among carriers of different HIF-1 α genotypes.

Methods: The present semi-experimental study of developmental and applied type was conducted in 2021. The studied samples were 23 inactive overweight women (height 157 ± 2.8 cm, weight 74 ± 1.8 kg, age 38 ± 5.4 years, body mass index 32 ± 2.4 kg/m², selection and They participated in 8 weeks of aerobic training including 5 sessions per week and each session lasting 30 minutes with increasing intensity (55-75% of maximum heart rate). Before and after the training period, aerobic power (VO₂max) was measured through the Bruce test. Sample Saliva was collected from all the subjects within 24 hours and sent to the laboratory to determine the genotype. The subjects were divided into two genotypic groups, including CC and CT. The collected data were analyzed using Levin's and independent t-tests at the 95% confidence level. became

Results: The findings indicated that the aerobic capacity of CC and CT genotypes of HIF1- α gene increased. No significant difference was observed between the two genotype groups ($p=0.079$ and $p=0.544$). Although to some extent, the average value of changes in aerobic power of CT genotype after 8 weeks of aerobic training was higher than the other two genotypes, but this difference was not significant.

Conclusion: Eight weeks of aerobic training led to an increase in aerobic capacity in inactive obese women, and in this regard, the increase of HIF1- α followed by the induction of hypoxia plays a role. However, it does not seem that there is a difference between the different genotypes of the gene. HIF1- α is present in these changes.

Keywords: aerobic exercise, genotype, HIF1 α

***Corresponding Author:** Ghahramani M, Department of Exercise Physiology, Gilan-E-Gharb Branch, Islamic Azad University, Gilan-E-Gharb, Iran

Email: Mehran.physiology@gmail.com

Please cite this article as follows: Shojaei P, Ghahramani M, Farsi S. Investigating the Amount of Changes in VO₂-Max in Response to Aerobic Exercise Among Careers of Different Genotypes of HIF-1 α Gene. Armaghane-danesh 2022; 28(2): 218- 232.