



## The effect of swimming training with different time, on the expression of cholesterol reverse transport genes in the liver tissue of male Wistar rats

Maliheh Ardakani-zadeh<sup>1\*</sup> , Leyla Vesali-akbarpour<sup>2</sup>

1. Corresponding Author, Department of Sport Sciences, Faculty of Human Sciences, Damghan University, Damghan, Iran. maliheh\_ardakani@yahoo.com
2. PhD, Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Bu\_Ali Sina University, Hamedan, Iran. L.vesaliakbarpour@gmail.com

### Article Information

### Abstract

**Article type:** Research Article

**Vol:** 16

**No:** 31

**P:** 56-65

**Received:** 2024-04-11

**Revised:** 2024-08-11

**Accepted:** 2024-08-30

### Cite this Article:

Ardakani-zadeh Maliheh ,Vesali-akbarpour Leyla. The effect of swimming training with different time, on the expression of cholesterol reverse transport genes in the liver tissue of male Wistar rats. *Journal of Sport and Biomotor Sciences*. 2024;16(31):56-65. doi: 10.22034/sbs.2024.425289.1069

**Publisher:** Hakim Sabzevari University

© The Author(s)



10.22034/sbs.2024.425289.1069

**Introduction and Purpose:** The process of reverse cholesterol transport, which includes the collection of excess cholesterol from the surrounding tissues and its return to the liver for bile formation, is affected by exercise training with different durations and intensities. The purpose of the present study was to investigate the effect of swimming training at two different times on the expression of genes affecting the reverse cholesterol transport in the liver tissue of male rats.

**Materials and Methods:** This applied cross-sectional study conducted on 18 male rats ( $210 \pm 20$  g) randomly divided into three groups of six: control, moderate and long-term swimming. The training groups swam in water at  $30 \pm 2^\circ$  C for ten weeks, 5 days per week. In each session, the moderate-term group swam for one hour and the long-term group for three hours. The left lobe of the liver was separated and gene expression was measured using real-time PCR method by Ampliqon Master Mix, and DNA synthesis kit made in Denmark. Differences were determined by One-Way ANOVA, and comparison of groups was determined by Tukey's post hoc test ( $P \leq 0.05$ ).

**Results:** In long-term group, the expression values of ABCA1 and ApoA1 gene were significantly increased compared to the control group ( $P=0.04$ ), and the ApoB gene was significantly increased compared to the control group ( $P=0.003$ ), and the moderate-term group ( $P=0.009$ ).

**Discussion and Conclusion:** It seems that long-term exercise has a greater effect on the process of reverse cholesterol transport compared to moderate-term exercise. Therefore, choosing the training time for athletes or liver patients can significantly affect cholesterol levels.

**Key Words:** Reverse cholesterol transport, Liver, medium-term exercise, long-term exercise

## **Extended Abstract**

### **1. Introduction and Purpose**

Reverse cholesterol transport is a process mediated by transporters, categorized as ABC transporters (A-G based on sequence). ABCA1, the first and most prominent member of the ABC transporter family, is expressed in the liver and macrophages. Both ABCA1 and ABCG1 regulate the efflux of cholesterol and phospholipids from macrophage foam cells. The extracellular acceptor for this process, lipid-poor or minimally lipidated apolipoprotein AI (ApoA-I), is a key factor in the initial stage of reverse cholesterol transport. Regarding other genes involved in reverse cholesterol transport, apolipoprotein B (ApoB) is the primary structural component of LDL cholesterol and VLDL cholesterol. The interaction between ApoB and the LDL receptor plays a crucial role in its uptake from peripheral cells and the liver. Exercise studies have demonstrated that physical activity can positively influence key steps in reverse cholesterol transport, including increased HDL levels, cholesterol efflux from cells, ApoA-I formation and volume, and Pre-Beta HDL and LCAT activity. Safarzadeh et al. (2014) found that 12 weeks of aerobic running training significantly increased the expression of ABCA1 and ApoA-I genes in the liver tissue of male mice. Batcher et al. (2008) observed that eight weeks of low-intensity exercise training increased the expression of ABCA1 and ABCG1 genes. Despite the known effects of various exercise modalities on reverse cholesterol transport, the impact of swimming training with different session durations on this crucial factor in cholesterol removal from peripheral tissues warrants further investigation, as the influence of aerobic exercises with varying durations may have been less extensively studied.

### **2. Materials and Methods**

This study employed a cross-sectional design involving 18 male Wistar rats ( $210 \pm 20$  grams) randomly divided into three groups of six: control, intermediate swimming, and long-term swimming. The training groups swam in  $30 \pm 2$  °C water for 10 weeks, five days per week. Each session lasted three hours for both the intermediate-term and long-term groups. The left lobe of the liver was isolated, and real-time PCR was used to measure gene expression using Ampliqon Master Mix and a Danish-made DNA synthesis kit. One-way ANOVA was used to determine differences among the groups, followed by Tukey's post-hoc tests for pairwise comparisons (at a significance level of  $P \leq 0.05$ ).

### **3. Results**

One-way ANOVA revealed significant differences in ABCA1 and ApoA1 gene expression among the groups ( $df = 5.001$ ). Tukey's post-hoc tests indicated that the long-term swimming training group exhibited significantly higher levels of ABCA1 and ApoA1 gene expression compared to the control group ( $P = 0.04$ ). However, there were no significant differences in ABCG1 gene expression between the control and experimental groups. Additionally, the expression of the ApoB gene was significantly increased in the long-term swimming training group compared to both the control group ( $P = 0.003$ ) and the medium-term swimming training group ( $P = 0.009$ ).

### **4. Conclusions**

The findings suggest that the intensity and volume of exercise are positively correlated with their effects on blood lipid profiles and apolipoproteins. Long-term swimming activity may influence the expression of ABCA1, ApoA1, and ApoB genes by increasing adiponectin levels. Additionally, vigorous exercise training likely exerts its effects on reverse cholesterol transport through changes in fat metabolism, phospholipid metabolism, mitochondrial biogenesis, and other mechanisms. Previous research has demonstrated that physical activity or exercise can increase adiponectin levels, which in turn enhances reverse cholesterol transport. Conversely, adiponectin deficiency has been shown to inhibit ABCA1 expression and ApoA1 synthesis. In the present study, 10 weeks of long-term swimming training in mice demonstrated that submaximal, long-term training, compared to shorter-duration training, can more effectively facilitate reverse cholesterol transport in the liver. This suggests that such training may be a beneficial strategy for athletes and patients.

### **5. Acknowledgment & Funding**

Authors are thankful to all interview participants for supporting this research.

### **6. Ethical Consideration**

This study followed the ethical standards and was approved by the Ethics Committee of the University of human sciences with the ethical code: (IR.NAHGU.REC.1401.018).

### **7. Contribution of authors**

All authors have contributed to the article. all authors read and approved the final manuscript.

### **8. Conflict of interest**

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.



# ورزش و علوم زیست حرکتی



## تأثیر تمرین شنا با زمان متفاوت، بر بیان ژن‌های انتقال معکوس کلسترول بافت کبد موش‌های نر صحرایی

ملیحه اردکانی‌زاده<sup>۱\*</sup>، لیلا وصالی اکبرپور<sup>۲</sup>

۱. نویسنده مسئول، استادیار، گروه علوم ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه دامغان، ایران. Maliheh\_ardakani@yahoo.com

۲. دکترای تخصصی، گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران. L.vesaliakbarpour@gmail.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: پژوهشی	<b>مقدمه و هدف:</b> جمع‌آوری کلسترول اضافی از بافت‌های پیرامونی و بازگرداندن آن به کبد به منظور تشکیل صفرا، فرآیند انتقال معکوس کلسترول است، که متاثر از تمرین‌های ورزشی با مدت زمان و شدت مختلف می‌باشد. هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر تمرین شنا در دو زمان متفاوت بر بیان ژن‌های موثر بر انتقال معکوس کلسترول بافت کبد موش‌های نر بود.
دوره: ۱۶	<b>مواد و روش‌ها:</b> مطالعه حاضر از نوع مقطعی کاربردی است، که تعداد ۱۸ سر موش نر نژاد صحرایی (۲۰±۲۱۰ گرم) به صورت تصادفی به سه گروه شش‌تایی کنترل، شنای میان و شنای بلند مدت تقسیم شدند. گروه‌های تمرینی به مدت ده هفته و پنج روز در هفته در آب ۲±۳۰ درجه سانتی‌گراد شنا کردند. در هر جلسه گروه میان مدت یک ساعت و گروه بلندمدت سه ساعت شنا کردند. لوب سمت چپ کبد جدا گردید و برای سنجش بیان ژن از روش Real-time PCR توسط مستر میکس Ampliqon و کیت سنتز DNA ساخت دانمارک استفاده شد. تفاوت‌ها با روش تحلیل واریانس یک‌سویه و مقایسه گروه‌ها توسط آزمون تعقیبی توکی تعیین گردید (سطح معنی‌داری $P \leq 0.05$ ).
شماره: ۳۱	<b>یافته‌ها:</b> در گروه بلند مدت، مقادیر بیان ژن‌های ABCA1 و ApoA1 در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌دار ( $P=0.04$ ) و ژن ApoB در مقایسه با گروه کنترل ( $P=0.003$ ) و در مقایسه با گروه میان مدت ( $P=0.009$ ) افزایش معنی‌داری یافت.
صفحه: ۵۶-۶۵	<b>بحث و نتیجه‌گیری:</b> به نظر می‌رسد که اجرای تمرین بلندمدت در مقایسه با میان مدت بر فرآیند انتقال معکوس کلسترول تأثیر بیشتری داشته باشد، بر همین اساس انتخاب زمان تمرین ورزشکاران یا بیماران کبدی تأثیر مهمی بر سطوح کلسترول دارد.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۱/۲۳	<b>واژه‌های کلیدی:</b> انتقال معکوس کلسترول، کبد، شنای میان مدت، شنای بلندمدت
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۰۵/۲۱	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۰۹	

### نحوه ارجاع به این مقاله:

اردکانی‌زاده ملیحه، وصالی اکبرپور لیلا. تأثیر تمرین شنا با زمان متفاوت، بر بیان ژن‌های انتقال معکوس کلسترول بافت کبد موش‌های نر صحرایی. نشریه ورزش و علوم زیست حرکتی. ۱۴۰۳؛ ۱۶(۳۱): ۵۶-۶۵.  
doi: 10.22034/sbs.2024.425289.1069

ناشر: دانشگاه حکیم سبزواری



© نویسنده(گان).

doi 10.22034/sbs.2024.425289.1069

## مقدمه

دیگر از اصلی‌ترین پروتئین تشکیل‌دهنده ذرات HDL، آپولیپوپروتئین A است، که حدوداً ۷۰ درصد توده پروتئینی دارد، و در چرخه معکوس کلسترول، و در نتیجه کندشدن روند تصلب شرایین نقش عمده‌ای اجرا می‌کند. افزایش تولید این ژن، تشکیل فیزیولوژیک ذرات HDL جدید را تحریک می‌کند (۶). در مجموع با توجه به مطالب فوق، ژن‌هایی که بر فرآیند مفید انتقال معکوس کلسترول موثر هستند، معرفی گردید و نقش اصلی هریک در جمع‌آوری لیپیدهای کم‌چگال و مضر عنوان شد، که در نهایت در کبد متابولیزه می‌شوند، و به حالت لیپیدهای پرچگال در بافت‌ها و اندام‌های بدن ایفای نقش می‌کنند. علاوه بر اثرات سودمند این ژن‌ها، نقش فعالیت‌های ورزشی نیز انکارناپذیر است. در واقع، یکی از مهم‌ترین روش‌های بهبود سبک زندگی اجرای فعالیت ورزشی می‌باشد، که تاثیرات سودمند آن بر عوامل مرتبط با بیماری‌های قلبی عروقی به خوبی نشان داده شده است. مطالعات ورزشی نشان داده‌اند که فعالیت بدنی، تغییرات مفیدی در نیمرخ لیپوپروتئین‌های خون (کاهش تری‌گلیسرید، LDL، VLDL، و افزایش HDL) ایجاد می‌کند، و موجب بهبود برخی از مراحل کلیدی در انتقال معکوس کلسترول (همچون افزایش سطوح HDL، افزایش خروج کلسترول از سلول، افزایش تشکیل و حجم ApoA1، افزایش Pre Beta HDL و LCAT می‌گردد (۷). تاثیر فعالیت ورزشی، بر سطوح لیپیدها و لیپوپروتئین‌ها در مطالعات بسیاری مورد بررسی قرار گرفته است. نتیجه مطالعه‌ای بیان داشت که اجرای تمرینات هوازی منجر به افزایش بیان ژن ABCA1 می‌گردد (۳). در مطالعه خبازیان و قنبری‌نیکی (۲۰۰۹، ۲۰۰۸) بیان شد که اجرای سه هفته فعالیت استقامتی (کوتاه مدت با شدت متوسط) و نیز شش هفته فعالیت هوازی (۹۰ دقیقه، پنج روز در هفته)، موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن ABCA1 در بافت کبد موش‌های نر شده، و تاثیر مثبتی بر انتقال معکوس کلسترول داشته است (۱، ۲). صفرزاده و دیگران (۲۰۱۴) عنوان داشتند که اجرای ۱۲ هفته تمرین هوازی دویدن، منجر به افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های ABCA1 و ApoA1 در بافت کبد موش‌های نر می‌گردد (۶). در همین راستا قنبری‌نیکی و دیگران (۲۰۱۰) اظهار داشتند که شش هفته فعالیت هوازی متوسط، بیان ژن ABCA1 را در بافت کبد موش‌های نر افزایش می‌دهد (۸). باتچر و دیگران (۲۰۰۸) نشان دادند که هشت هفته تمرین ورزشی با شدت پایین، بیان ژن‌های ABCA1 و ABCG1 را افزایش می‌دهد (۹). جعفری و جلالی (۲۰۲۰) پس از اجرای ۱۲ هفته تمرین تناوبی شدید و تداومی متوسط، افزایش معنی‌داری در بیان ژن ABCG8

مطالعات نشان داده‌اند از جمله عواملی که به عنوان ریسک فاکتور مهمی در پیش‌بینی انواع بیماری‌ها همچون عروق کرونری تاثیر دارد، سطوح پایین کلسترول لیپوپروتئین پرچگال (HDL-C)<sup>۱</sup> در مقایسه با سطوح بالای کلسترول لیپوپروتئین کم‌چگال (LDL)<sup>۲</sup> و لیپوپروتئین خیلی کم‌چگال (VLDL)<sup>۳</sup> است (۱). عمل پیشگیرانه از تجمع کلسترول، توسط لیپوپروتئین پرچگال، در نتیجه‌ی نقش آن در فرآیند انتقال معکوس کلسترول رخ می‌دهد، که این فرآیند شامل جمع‌آوری کلسترول‌های اضافی از بافت‌های پیرامون از جمله ماکروفاژهای دیواره سرخرگ‌ها و بازگردان آن‌ها به کبد گفته می‌شود، تا در آنجا تجزیه و دفع گردند (۲).

بر اساس یافته‌های مطالعات، فرآیند انتقال معکوس کلسترول توسط ناقل‌هایی واسطه‌گری می‌شوند، که تحت عنوان ناقل‌های ABC<sup>۴</sup> معرفی شده‌اند، و بر اساس توالی به دسته‌های جداگانه A<sub>G</sub> تقسیم بندی می‌گردند (۳). عامل اصلی مرحله اول روند انتقال معکوس کلسترول، پذیرنده خارج سلولی این فرآیند یعنی آپولیپوپروتئین AI<sup>۵</sup> بدون لیپید یا دارای حداقل لیپید است، که توسط ناقل جعبه‌ای وابسته به آدنوزین تری‌فسفات (ABCA1)<sup>۶</sup> میانجی‌گری می‌شود و سبب تشکیل ذرات پری‌بتای HDL می‌گردد. خروج کلسترول تا تشکیل ذرات صفحه‌ای بزرگ‌تری از پری‌بتا HDL ادامه می‌یابد، تا اینکه در مرحله دوم، توسط مداخله آنزیم لسیتین کلسترول آسپل ترانسفراز (LCAT)<sup>۷</sup>، HDL‌های کروی ساخته می‌شوند، و تا بالغ شدن بیشتر کلسترول از لیپوپروتئین‌های دیگر یا ترکیب با ذرات کوچک‌تر، ادامه می‌یابد (۴). اولین و مهم‌ترین عضو خانواده انتقال دهنده ABC ژن ABCA1 است، که در کبد و ماکروفاژها تظاهر می‌یابد. خروج کلسترول و فسفولیپید از سلول‌های فوم ماکروفاژ توسط هر دوی ABCA1 و ABCG1<sup>۸</sup> تنظیم می‌شود، با این تفاوت که ABCA1 از طریق انتقال این مواد به لیپوپروتئین‌های عاری از چربی، منجر به تشکیل HDL اولیه می‌شود، و ABCG1 مسئول انتقال کلسترول به HDL بالغ است. برخلاف ABCA1 که در تمام بافت‌های بدن بیان می‌شود، اما ApoA1 تنها در روده کوچک و کبد سنتز می‌گردد (۴). در رابطه با دیگر ژن‌های درگیر در فرآیند انتقال معکوس کلسترول، مشخص شده است که قسمت اصلی بخشی از ساختار کلسترول LDL و کلسترول VLDL آپولیپوپروتئین B (ApoB)<sup>۹</sup> می‌باشد که هم‌کنشی آپولیپوپروتئین B با گیرنده کلسترول LDL در جذب آن از سلول‌های محیطی و کبد نقش مهمی را ایفا می‌کند (۵). یکی

6. ATP-binding cassette transporter A1  
7. Lecithin-cholesterol acyltransferase  
8. ATP-binding cassette transporter G1  
9. Apolipoprotein B

1. High-Density Lipoprotein Cholesterol  
2. Low-Density Lipoprotein Cholesterol  
3. Very Low-Density Lipoprotein Cholesterol  
4. Transporter ATP-binding Cassette  
5. Apolipoprotein A-, ApoA-1

محیط  $5 \pm 5$  درصد و چرخه روشنایی-تاریکی ۱۲:۱۲ نگه‌داری شدند. آب و غذا به‌صورت آزادانه در اختیار آن‌ها قرار داده شد. موش‌ها بر اساس میانگین وزن همگن شدند، و به‌طور تصادفی به سه گروه شش تایی شامل گروه کنترل، گروه تمرین شنای میان‌مدت، و گروه تمرین بلندمدت تقسیم شدند. هر سه سر موش به صورت جداگانه در قفس‌های پلی اتیلن ( $12 \times 23 \times 23 \text{ cm}^3$ ) نگه‌داری شدند (۱۴). استخر شنای موش‌ها شامل یک وان برای هر گروه تمرینی، به ابعاد  $60 \times 60 \times 10$  سانتی‌متر بود (موش‌ها برای جلوگیری از غرق شدن و فرار از شرایط تمرین، مجبور بودند دور تا دور وان شنا کنند). درجه حرارت آب استخر در محدوده  $30 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد تعیین شد. به منظور سازگاری موش‌ها و خو گرفتن آن‌ها با محیط شنا یک هفته (سه جلسه/هفته) تمرین شنا کردن در نظر گرفته شد؛ بدین صورت که در ساعت هشت صبح، روز اول با ۲۰ دقیقه شنا شروع شد، سپس موش‌ها در روز دوم ۴۰ دقیقه و در روز سوم ۶۰ دقیقه شنا کردند. برنامه‌ی تمرینی در گروه شنای میان‌مدت شامل ده هفته، پنج روز در هفته و یک ساعت شنا در هر جلسه بود. گروه شنای بلندمدت همان پروتکل تمرینی را انجام می‌دادند، اما هر هفته به‌طور فزاینده، ۳۰ دقیقه به مدت زمان شنای آن‌ها افزوده می‌شد، به‌طوری که از هفته پنجم تا دهم، موش‌ها سه ساعت در هر جلسه شنا می‌کردند (۱۵). یک روز پس از پایان پروتکل تمرین و ۱۲ ساعت ناشتایی، موش‌ها توسط پنتوباریتال سدیم (۸۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) کشته شدند. سپس تحت شرایط استریل و توسط متخصص آناتومی، لوب چپ کبد جدا شد. بافت مورد نظر پس از شستشو توسط PBS، بلافاصله در میکروتیوب‌هایی با حجم ۲/۵ میلی‌لیتر با برچسب متناسب با موش، وارد نیتروژن مایع گردید. بعد از اتمام تشریح و تا شروع هموژن بافت‌ها، همه آن‌ها در دمای  $-80$  -درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

روش‌های آزمایشگاهی: ارزیابی نهایی بیان ژن، طبق دستورالعمل تکنیک Real Time-PCR انجام گردید. از سایبرگرین مسترمیکس Ampliqon ساخت کشور دانمارک استفاده شد. برای تعیین غلظت DNA از رنگ‌های فلورسانس استفاده می‌شود، که در این تکنیک متداول‌ترین رنگ، سایبرگرین می‌باشد که به شیارهای کوچک DNA دو رشته‌ای متصل شده و با جذب طول موج ۴۹۸ نانومتر، نور ۵۲۲ نانومتری را به رنگ سبز ساطع می‌کند که سپس توسط دستگاه ثبت می‌شود. بنابراین افزایش شدت فلورسنت با غلظت DNA متناسب است. طبق دستورالعمل کیت و بررسی میزان کارایی ژن رفرنس و هدف، برای یک نمونه‌ی ۱۰ لاندایی، ترکیبی از مسترمیکس (۵ لاند)، پرایمر (۱ لاند)، cDNA (۱ لاند) و آب مقطر (۳ لاند) در نظر

در موش‌های چاق مشاهده نکردند (۱۰). نتایج مطالعه دیگری افزایش معنی‌دار بیان ژن ABCG1 لنفوسیت را در زنان ورزشکار، به‌دنبال اجرای فعالیت هوازی با ۷۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی بیان داشت (۱۱). حسن‌وند و دیگران (۲۰۱۹) در مطالعه خود عنوان داشتند که اجرای تمرینات تداومی زیربیشینه و تناوبی بیشینه توسط موش‌ها، منجر به افزایش بیان ژن ApoA1 کبد آن‌ها می‌شود (۷). پژوهش عزیززی و دیگران (۲۰۱۶) نشان داد که دوره‌های کوتاه مدت و زیربیشینه تمرینات هوازی موجب افزایش ApoA1 سرم زنان چاق می‌شود (۱۲).

با توجه به نتایج پژوهش‌های فوق، تاثیر تمرینات ورزشی مختلف و متنوع قابل مشاهده است، همچون تمرینات هوازی دوییدن سه، شش و دوازده هفته‌ای، کوتاه مدت، متوسط، زیربیشینه و شدید، تناوبی و تداومی، اما مطالعات کمتری تحت عنوان شنای اجباری به بررسی تاثیر بر عوامل ذکرشده پرداخته‌اند، لیکن در پژوهش حاضر، با توجه به تفاوت تمرین شنا (مینی بر اجباری بودن آن و نیز غوطه‌وری و افزایش فشار آب) از یک سو، و مقایسه دو مدت زمان مختلف (میان و بلندمدت) از سوی دیگر، احتمال می‌رود که این شاخص‌ها، نتایج متفاوتی بر بیان ژن‌های درگیر در انتقال معکوس کلسترول بافت کبد داشته باشند. علاوه بر این، در جوامع امروزی که افراد زیادی از بیماری‌های قلبی عروقی (ناشی از سطوح بالای چربی خون) رنج می‌برند، با وجود تاثیر تمرینات مختلف ورزشی بر انتقال معکوس کلسترول، پژوهش‌هایی برای بررسی تاثیر تمرین شنا با مدت زمان متفاوت (در هر جلسه) بر این عامل اصلی و مهم در برداشت کلسترول از بافت‌های پیرامونی، ضروری به نظر می‌رسد، زیرا که به‌نظر می‌رسد تاثیر تمرینات هوازی با مدت زمان متفاوت کمتر مورد توجه محققان بوده است. بر همین اساس، هدف از پژوهش حاضر، بررسی انتقال معکوس کلسترول ناشی از تاثیر ده هفته تمرین استقامتی شنای میان و بلندمدت در موش‌های صحرایی نر می‌باشد.

## روش شناسی

پژوهش حاضر از نوع مقطعی کاربردی می‌باشد، که با کد کمیته اخلاق در پژوهش IR.NAHGU.REC.1401.018 دانشکده علوم انسانی به تصویب رسید. تعیین حجم نمونه با استفاده از نرم‌افزار جی‌پاور<sup>۱</sup> نسخه ۱، ۳ محاسبه گردید، و حجم نمونه بر اساس توان آماری ۰/۸۵، اندازه اثر ۰/۵ و میزان خطای ۰/۰۵ گزارش شد، که در نهایت تعداد ۱۸ سر موش در محدوده وزنی  $20 \pm 21$  گرم تعیین گردید (۱۳). تمامی مراحل پژوهش حاضر مطابق با دستورالعمل استفاده از حیوانات انجام گرفت. حیوانات در محیطی با درجه حرارت  $22 \pm 2$  درجه سانتیگراد و رطوبت

شاپیرو-ویلک استفاده شد. برای بررسی تغییرات بین گروه‌ها در صورت طبیعی بودن داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک‌سویه و جهت تعیین تفاوت بین گروه‌ها از آزمون تعقیبی توکی (به دلیل مساوی بودن حجم نمونه‌ها و قدرت بیشتر برای رد فرض صفر در مقایسه با آزمون بونفرونی) استفاده شد. در پژوهش حاضر، به منظور رد فرضیه صفر، سطح معنی‌داری P کوچکتر مساوی ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. کلیه محاسبات آماری از طریق نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ و همچنین برای رسم نمودارها از نرم‌افزار اکسل ۲۰۲۰ استفاده شد.

گرفته شد و میزان بیان ژن با استفاده از روش نسبی، نسبت به ژن کنترل GAPDH ارزیابی شد. پس از انتقال اطلاعات به نرم افزار Excel، طبق فرمول  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  میزان بیان ژن محاسبه گردید، و با واحد Fold change بیان شد (۱۶). توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول یک قابل مشاهده است (جدول ۱).

### روش‌های آماری

برای دسته‌بندی و تعیین شاخص‌های مرکزی و پراکندگی از آمار توصیفی استفاده شد. جهت بررسی طبیعی بودن داده‌ها از آزمون

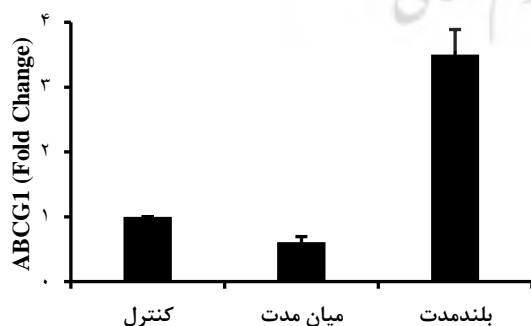
جدول ۱. توالی پرایمرهای ژن رفرنس و ژن‌های مورد نظر

mRNA		Sequence 5'-3'	PCR product size
GAPDH	F	AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG	177 bp
	R	CATACTCAGCACCAGCATCACC	
ApoA1	F	AGGACCTGCTGGGGACTAAAG	126 bp
	R	TGAGAAACCTGCTGCCT CTGC	
ApoB	F	AAATAACCTTAATCAATTGCT	107 bp
	R	GGTTCTTAGCAGCAAGAGTCC	
ABCA1	F	CGTCCTCCTTGTCATCTCTG	97 bp
	R	TAACCTTCTTCACTTTCTCGTC	
ABGA1	F	GAGTGTGCCCTGGTGTATTC	90 bp
	R	GTGCTCTTGTTTTGCTCCTGG	

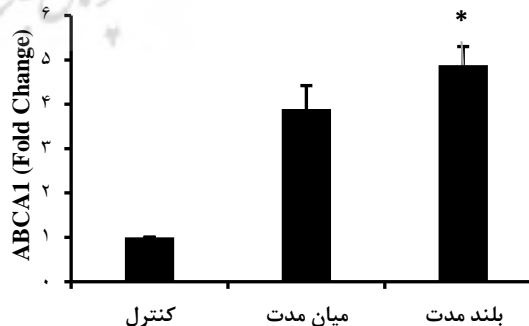
### یافته‌ها

و ApoA1 در گروه تمرین شنای بلند مدت در مقایسه با گروه کنترل، افزایش معنی‌داری وجود دارد ( $P=0/04$ ) (شکل ۱ و ۳). در مقادیر بیان ژن ABCG1 تفاوت معنی‌داری در بین گروه‌های کنترل و تجربی مشاهده نشد (شکل ۲). همچنین، مقادیر بیان ژن ApoB در گروه تمرین شنای بلندمدت در مقایسه با گروه کنترل ( $P=0/003$ ) و با گروه تمرین شنای میان مدت ( $P=0/009$ ) افزایش معنی‌داری مشاهده گردید (شکل ۴).

پس از اجرای ده هفته تمرین شنای میان و بلندمدت (زمان/جلسه)، توسط موش‌های صحرایی نر؛ نتیجه جدول آزمون تحلیل واریانس یک‌سویه، در رابطه با شاخص‌های مورد مطالعه، تفاوت معنی‌داری را بین گروه‌های کنترل (غیرفعال) و تمرین نشان داد ( $ABCG1, F=42.3$ ) ( $ABCA1, F=11$ ) ( $df=5, P=0/001$ ) ( $ApoA1, F=42.28$ ) ( $ApoB, F=67.6$ )، که پس از اجرای آزمون تعقیبی توکی مشاهده شد که در مقادیر بیان ژن ABCA1

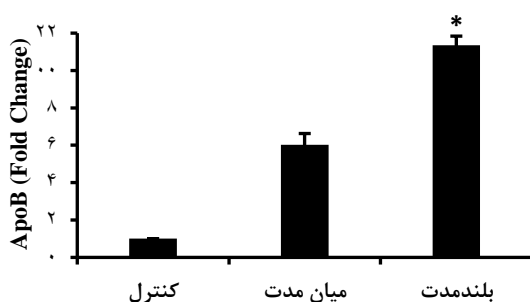


شکل ۲. مقایسه مقادیر بیان ژن ABCG1 در گروه



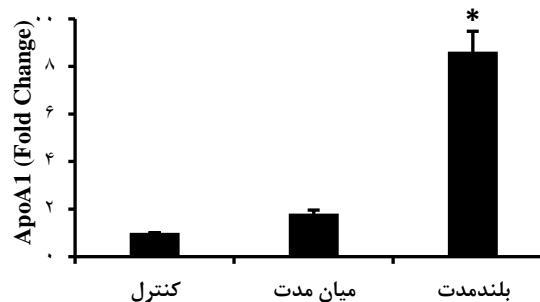
شکل ۱. مقایسه مقادیر بیان ژن ABCA1 در گروه‌ها

#: افزایش معنی‌دار در گروه تمرین بلندمدت در مقایسه با گروه کنترل ( $P=0/04$ )



شکل ۴. مقایسه مقادیر بیان ژن ApoB در گروه‌ها

\*: افزایش معنی‌دار در گروه تمرین بلندمدت در مقایسه با گروه کنترل ( $P=0/003$ )، و در مقایسه با گروه تمرین میان‌مدت ( $P=0/009$ )



شکل ۳. مقایسه مقادیر بیان ژن ApoA1 در گروه‌ها

\*: افزایش معنی‌دار در گروه تمرین بلندمدت در مقایسه با گروه کنترل ( $P=0/004$ )

## بحث

به نظر می‌رسد که بخشی از فوائد بی‌شمار فعالیت ورزشی برای سلامتی، به تغییرات نیم‌رخ لیپوپروتئین‌های خون مربوط باشد، و این تغییرات اغلب شامل کاهش تری‌گلیسرید، LDL، VLDL، و افزایش HDL است، که HDL در فرآیند تحت عنوان انتقال معکوس کلسترول نقش موثری در پیش‌گیری از بیماری‌های قلبی عروقی دارد، که این نقش را از طریق دفع کلسترول اضافی از سلول‌های پیرامونی و بازگرداندن آن‌ها به کبد اجرا می‌کند (۲). از نظر فیزیولوژیکی، به نظر می‌رسد که اجرای فعالیت ورزشی، علت افزایش سطوح HDL پلاسمایی، افزایش تولید HDL کبدی، و افزایش فعالیت LCAT و LPL، و نیز کاهش فعالیت لیپاز کبدی باشد، که در واقع، فعالیت ورزشی از طریق افزایش سطوح این آنزیم‌ها موجب افزایش سطوح ژن‌های درگیر در انتقال معکوس کلسترول نیز می‌گردد (۲۰). بر اساس مطالعات اخیر، انتقال معکوس کلسترول عبارت است از: ۱. خروج کلسترول از روی ApoA1 عاری از لیپید، یا حاوی حداقل لیپید، که این فرآیند توسط ناقل ABCA1 برای تشکیل ذرات پری‌بتای HDL میانجی‌گری می‌شود، ۲. خروج بیشتر کلسترول به HDL پری‌بتا و تشکیل ذرات صفحه‌ای بزرگ‌تر HDL، ۳. استریفه شدن کلسترول از طریق آنزیم لیسیتین کلسترول‌آسیل‌ترانسفراز، که موجب ساخت HDL کروی می‌گردد. ۴. بالغ شدن HDL یا تشکیل ذرات بزرگ‌تر HDL توسط کسب و استریفه شدن بیشتر کلسترول از لیپوپروتئین‌های دیگر، ۵. تغییر شکل HDL بالغ توسط عمل کلسترول‌استرانتانسفراز پروتئین، فسفولیپیدترانسفراز پروتئین، لیپاز کبدی، و گیرنده‌های رفتگر نوع BI با تشکیل ذرات HDL کوچک‌تر و آپولیپروتئین‌های AI دارای حداقل لیپید (۷). در همین راستا، در بیماری اختلال متابولیسم چربی (بیماری تائزیر)، تشخیص عملکرد ژن و پروتئین ABCA1 اثبات گردید. نتایج پژوهش‌های بیشتر در مدل‌های حیوانی فاقد ژن ABCA1 موجب درستی بر عملکرد این ژن در انتقال معکوس کلسترول و تشکیل ذرات بالغ HDL گردید (۲).

در مطالعه حاضر به مقایسه اثر ده هفته تمرین شنای میان و بلندمدت، بر مقادیر بیان ژن‌های موثر بر انتقال معکوس کلسترول در بافت کبد موش‌های نر صحرایی پرداخته شد. یافته‌ها حاکی از افزایش بیان ژن‌های ABCA1، ApoA1، و ApoB در گروه تمرین بلندمدت در مقایسه با گروه کنترل بود، در حالی که در مقادیر بیان ژن ABCG1 هر دو گروه تمرین، تغییر معنی‌داری مشاهده نگردید، اما بیان ژن ApoB پس از تمرین شنای بلند مدت در مقایسه با تمرین کوتاه‌مدت افزایش معنی‌داری یافت. در همین راستا، اجرای سه هفته فعالیت استقامتی و نیز شش هفته فعالیت هوازی موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن ABCA1 در بافت کبد موش‌های نر گردید (۱، ۲). همچنین عنوان شد که اجرای ۱۲ هفته تمرین هوازی دویدن، منجر به افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های ABCA1 و ApoA1 در بافت کبد موش‌های نر می‌گردد (۶). در مطالعه دیگری، شش هفته فعالیت هوازی متوسط، بیان ژن ABCA1 را در بافت کبد موش‌های نر افزایش داد (۸). ناهمسو با این یافته‌ها، افزایش معنی‌دار بیان ژن ABCG1 نفوسیت را در زنان ورزشکار، به دنبال اجرای فعالیت هوازی با ۷۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی اعلام شد (۱۱). اما همسو با یافته‌های ما، اجرای تمرین تناوبی بیشینه توسط موش‌ها، منجر به افزایش بیان ژن ApoA1 کبد آن‌ها گردید، اما بر خلاف یافته‌های ما تمرین مداوم زیربیشینه نیز بر افزایش بیان ApoA1 موثر بود (۷). برخلاف نتایج ما، هشت هفته تمرین ورزشی با شدت پایین، بیان ژن‌های ABCA1 و ABCG1 را افزایش بخشید (۹). همچنین، در رابطه با اثر تمرین کوتاه مدت، در پژوهشی، دوره‌های کوتاه مدت و زیربیشینه تمرینات هوازی موجب افزایش ApoA1 سرم زنان چاق گردید (۱۲). در حالی که در یک مطالعه، اجرای هشت هفته تمرین استقامتی تأثیری بر افزایش سطوح ApoA1 زنان نداشت (۱۷)، در همین راستا در دو مطالعه دیگر نیز تغییر معناداری در سطوح ApoA و ApoB پس از یک دوره تمرین هوازی زیربیشینه مشاهده نشد (۱۸، ۱۹).

کلسترول اجرا می‌کند، به طوری که، فعالیت ورزشی تناوبی شدید، بر تولید گلوکز کبدی اثر مستقیمی دارد، و از طریق افزایش اکسیداسیون چربی کبد و عضله (که باعث کاهش ذخایر چربی، و افزایش حساسیت به انسولین می‌شود)، روند انتقال معکوس کلسترول را در کبد بهبود می‌بخشد (۲۴). از سوی دیگری گزارش شده است با اجرای فعالیت بدنی مقادیر آدیپونکتین افزایش می‌یابد، آدیپونکتین انتقال معکوس کلسترول را افزایش می‌دهد و کمبود آن مانع بیان ABCA1 و سنتز ApoA1 می‌گردد (۲۵). در مجموع، به نظر می‌رسد که فعالیت ورزشی (از هر نوع و شدتی) می‌تواند از طریق اثر مستقیم بر تولید گلوکز کبدی، و افزایش اکسیداسیون چربی کبد و عضله، موجب کاهش ذخایر چربی شود و در نهایت منجر به بهبود روند انتقال معکوس کلسترول در کبد گردد (۲۶). از دیگر فواید فعالیت ورزشی، فعال سازی مسیر پروتئین کیناز فعال کننده آدنوزین مونو فسفات، و افزایش اکسیداسیون اسید چرب در سلول‌های عضلانی می‌باشد (۲۷). به طور کلی بهبود متابولیسم کبد، انتقال معکوس کلسترول و تغییرات کلسترولی به دنبال تمرین ورزشی به دلیل نیاز به مصرف انرژی و هزینه انرژی برای فعالیت ورزشی می‌باشد. به علاوه، افزایش متغیرهای خونی آزمودنی در هر جلسه فعالیت ورزشی، در طولانی مدت موجب بهبود شاخص‌های سلامتی، کاهش چربی‌های خون، و فعال سازی انتقال معکوس کلسترول می‌گردد (۷). در پژوهش حاضر محدودیت‌های از قبیل عدم کنترل مقدار آب و غذای مصرفی موش‌ها، استرس آن‌ها حین تمرین و جایجایی، و نیز میزان فعالیت و حرکت در آب وجود داشت.

### نتیجه گیری

پس از اجرای ده هفته تمرین شنای بلندمدت توسط موش‌ها در پژوهش حاضر، نتایج نشان دادند که با اجرای تمرین بلند مدت زیر بیشینه در مقایسه با تمرین با زمان کمتر، فرآیند انتقال معکوس کلسترول در کبد به نحو بهتری انجام می‌گیرد، که می‌تواند به عنوان راهکاری مناسب برای ورزشکاران و بیماران در نظر گرفته شود.

### تشکر و قدردانی

از همه کسانی که ما را در اجرای پژوهش حاضر یاری رساندند، کمال تشکر را داریم.

### تعارض منافع

بدین وسیله اعلام می‌گردد که بین نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

پیشنهاد شده است که اثر تنظیمی اسیدهای چرب توسط گیرنده‌های فعال شده بر اثر تکثیرکننده پراکسیزوم‌ها (PPARs) میانجی‌گری می‌شود، که دارای گیرنده‌هایی نظیر گیرنده ایکس کبدی (LXR)<sup>۱</sup> و گیرنده ایکس رتینوئید (RXR)<sup>۲</sup> هستند که وظیفه تنظیم بیان ژن‌های کنترل کننده چربی و متابولیسم گلوکز را به عهده دارند. فعال شدن لیگاند PPAR $\gamma$  منجر به فعال سازی اولیه در LXR خواهد شد و سپس تنظیم مثبت و افزایش بیان ژن دو انتقال دهنده ABCA1 و ABCG1 می‌گردد (۱۰).

یافته‌ها نشان داده است که هر چه شدت و حجم تمرین ورزشی بیشتر باشد، تاثیر آن بر پروفایل‌های چربی خون و آپولیپوپروتئین‌ها مضاعف خواهد بود؛ بر همین اساس، به نظر می‌رسد که اجرای فعالیت شنای بلند مدت ممکن است از طریق افزایش سطوح آدیپونکتین، بر بیان ژن‌های ABCA1، ApoA1، و ApoB تاثیر داشته باشد. در همین راستا در پژوهشی اجرای تمرین استقامتی با ۵۰ تا ۶۰ درصد ضربان قلب بیشینه توسط مردان، تغییر ناچیزی در مقادیر ApoA1 سرمی نشان داد، اما با پیشرفت حجم تمرین در هفته چهاردهم، افزایش معنی داری مشاهده شد (۲۱). در پژوهش دیگری اجرای تمرینات دویدن با حجم و شدت بالا در مقایسه با شدت و حجم کم یا متوسط، تاثیر بیشتری بر لیپوپروتئین‌ها داشتند، گزارش‌ها مبنی بر آن است که کاهش سطوح ApoA1 در انسان و موش‌ها سنتز HDL را کاهش می‌دهد، و انتقال کلسترول از بافت‌ها به کبد کمتر می‌شود (۲۲). مکانیسمی که برای عدم افزایش سطوح ApoA1 پیشنهاد می‌شود، مربوط به افزایش عملکرد آن است تا افزایش بیان آن، زیرا با افزایش فسفولیپیددار شدن ApoA1، بیان ژن ABCA1 که مسئول انتقال کلسترول و فسفولیپید به ApoA1 است نیز افزایش یافته است. بر همین اساس، می‌توان عنوان داشت که با اجرای تمرین طولانی مدت و افزایش بیان ApoA1، بیان ژن ABCA1 نیز بهبود داشته است، که می‌تواند بر انتقال معکوس کلسترول و افزایش مقادیر HDL نیز تاثیر داشته باشد (۲). در همین راستا، برخی مطالعات بیان داشته‌اند که شدت تمرین ورزشی با افزایش سطوح HDL رابطه مستقیمی دارد، به طوری که پس از تمرین شدید در مقایسه با تمرین متوسط، افزایش معنی دار مقادیر HDL مشاهده شده است، از منظر دیگری، جنسیت و وزن آزمودنی و همچنین پروتکل و مدت ورزش نیز فاکتورهای مهمی در پاسخ HDL به تمرینات ورزشی مختلف هستند (۲۳). از منظر دیگری، بیان شده است که تمرینات ورزشی شدید احتمالاً نقش خود را از طریق تغییر در سوخت و ساز چربی و متابولیسم فسفولیپیدها، بیوزنز میتوکندریایی و... بر انتقال معکوس



## منابع

1. Ghorbanian B, Ghasemnian A. The effects of interval combined endurance training on some key reverse cholesterol transport factors in boy adolescents. *Studies in Medical Sciences*. 2015;26(3):227-36. <http://umj.umsu.ac.ir/article-1-2807-en.html>. [In Persian]
2. Khabazian BM, Ghanbari-Niaki A, Safarzadeh-Golpordesari Ar, Ebrahimi M, Rahbarizadeh F, Abednazari H. Endurance training enhances ABCA1 expression in rat small intestine. *European journal of applied physiology*. 2009;107:351-8. doi: 10.1007/s00421-009-1133-3. [In Persian]
3. Tofighi A, Babaei S. The effect of twelve weeks of aerobic training on ABCG1 gene expression in inactive obese women. *Sport and Biomotor Sciences*. 2013;5(2):62-70. doi.org/10.22062/jkmu.2020.90638. [In Persian]
4. Taghipoor Asramy A, Ghanbari-Niaki A, Naghizadeh Qomi M, Moghanny Bashi MM. The effect of running with bee pollen on muscle ABCA1 and APOA-1 mRNA expression in rats: brief report. *Tehran University of Medical Sciences Journal*. 2016;74(7):530-4. <http://tumj.tums.ac.ir/article-1-7709-en.html>. [In Persian]
5. Faam B, Hedayati M, Azizi F. Presence of the X+ allele in apolipoprotein b gene increase the total cholesterol and apolipoprotein b concentration in tehranian people. *Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2011;12(6):588-93. <http://ijem.sbmu.ac.ir/article-1-915-en.html>.
6. Safar Zadeh A. Effect of progressive resistance training on serum A-FABP and Apolipoprotein AI concentration in male rats. *Sport Physiology*. 2014;6(21):109-22. doi.org/10.22059/jsb.2014.51991. [In Persian]
7. Hasanvand B, Karami K, Yaghoob M. The effect of training type on hepatic gene expressions of Apolipoprotein A-I, and Apolipoprotein A-II among male wistar rats. <http://sjimu.medilam.ac.ir/article-1-4675-en.html>. [In Persian]
8. Ghanbari-Niaki A. Treadmill exercise training enhances ATP-binding cassette protein-A1 (ABCA1) expression in male rats' heart and gastrocnemius muscles. *Int J Endocrinol Metab*. 2010;8(4):206-10. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.07.100.
9. Butcher LR, Thomas A, Backx K, Roberts A, Webb R, Morris K. Low-intensity exercise exerts beneficial effects on plasma lipids via PPAR $\gamma$ . *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 2008;40(7):1263-70. doi: 10.1249/MSS.0b013e31816c091d.
10. Jafari M, Jalali S. The effect of interval and continuous training on liver genes expression related to reverse cholesterol transport. *Sport Physiology & Management Investigations*. 2020;12(2):75-89. <http://pejouhesh.sbmu.ac.ir/article-1-1946-en.html>. [In Persian]
11. Rashidlamir A. Investigation of the effect of aerobic and resistance exercises on peripheral blood mononuclear cells ABCG1 gene expression in female athletes. 2012. <http://jssu.ssu.ac.ir/article-1-1903-en.html>. [In Persian]
12. Azizi M, Hussein Pordelavr S, Roozbahani S. The Comparison Effects of Submaximal Aerobic Exercise on Lipid Profiles and Apolipoprotein A-1 and B in Overweight Women. *Jundishapur Scientific Medical Journal*. 2016;15(5):507-16. [https://jsmj.ajums.ac.ir/article\\_46901.html](https://jsmj.ajums.ac.ir/article_46901.html). [In Persian]
13. Park S, Moon NR, Kang S, Kim DS. Ferulic acid and vinpocetine intake improves memory function by enhancing insulin sensitivity and reducing neuroinflammation and oxidative stress in type 2 diabetic animals with induced alzheimer's disease. *Journal of Functional Foods*. 2022;95:105180. doi.org/10.1016/j.jff.2022.105180
14. Alimohamadi Y, Sepandi M. Sample Size in Animal Studies. *Anim Sci*. 2011;50(4):445-53. 10.30699/ijmm.16.2.173. [In Persian]
15. Kılıç M, Ulusoy Ö, Cırrık S, Hindistan İ, Özkaya Y. Effect of exercise intensity on cerebrospinal fluid interleukin-6 concentration during recovery from exhaustive exercise in rats. *Acta physiologica Hungarica*. 2014;101(1):21-31. doi: 10.1556/APhysiol.100.2013.019.
16. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods*. 2001;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
17. Heitkamp H, Wegler S, Brehme U, Heinle H. Effect of an 8-week endurance training program on markers of antioxidant capacity in women. *Journal of sports medicine and physical Fitness*. 2008;48(1):113. PMID: 18212719
18. Giada F. Lipoprotein profile, diet and body composition in. 1996. PMID: 8979651
19. von Stengel S. Exercise effects on chd-risk-factors in early postmenopausal women with increased cholesterol levels-preliminary 4-year-results. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 2004;36(5):S212. doi: 10.1016/j.ajog.2016.12.017.
20. Parsa H, Mehri Alvar Y, Erfani Aadab F. Effects of eight weeks of high intensity interval training program on gene expression factors involved in cholesterol reverse transport in liver tissue of ischemic rat. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*. 2021;31(196):11-22. <http://jmums.mazums.ac.ir/article-1-16190-en.html>. [In Persian]
21. Shearman J, Micklewright D, Hardcastle J, Hamlin MJ, Draper N. The Effect of physical activity on serum lipids, lipoprotein, and apolipoproteins. 2010. doi:10.5628/aeht.v1i2.86

22. Kraus WE, Houmard JA, Duscha BD, Knetzger KJ, Wharton MB, McCartney JS, et al. Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. *New England Journal of Medicine*. 2002;347(19):1483-92. doi: 10.1056/NEJMoa020194.
23. Farsi S, Ghahramani M. Molecular adaptations of lipolysis to physical activity. *Journal of Basic Research in Medical Sciences*. 2020;7(1):1-9. <http://jbrms.medilam.ac.ir/article-1-450-en.html>
24. Lee WJ, Kim M, Park H-S, Kim HS, Jeon MJ, Oh KS, et al. AMPK activation increases fatty acid oxidation in skeletal muscle by activating PPAR $\alpha$  and PGC-1. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;340(1):291-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.12.011.
25. Ganjkhani L, Osali A. The Effect of 4 week resistance training on male rat hepatic ABCA1 protein plasma HDL-C levels. *Journal of Applied Health Studies in Sport Physiology*. 2019;6(1):22-30. doi:10.22049/JASSP.2019.26585.1248. [In Persian]
26. Gibala MJ, Little JP, Van Essen M, Wilkin GP, Burgomaster KA, Safdar A, et al. Short term sprint interval versus traditional endurance training: similar initial adaptations in human skeletal muscle and exercise performance. *The Journal of physiology*. 2006;575(3):901-11. doi: 10.1113/jphysiol.2006.112094
27. Craig Jr A, Dvorak M. Expiratory reserve volume and vital capacity of the lungs during immersion in water. *Journal of Applied Physiology*. 1975;38(1):5-9. doi: 10.1152/jappl.1975.38.1.5.

