مجله دیابت و متابولیسم ایران. فروردین- اردیبهشت ۱۳۹۹؛ دوره ۱۹ (شماره ۴) ۲۰۴-۱۹۵

مقاله پژوهشی

تغییرات پروتئین‌هایPERK وCHOP شبکه‌ی اندوپلاسمیک میوسیت‌های قلبی و TNF موش‌های ویستار دیابتی متعاقب تمرین تداومی و تناوبی

مجید جهانی عنصرودی[۱]، حسن متین همایی*[۱]، پروین فرزانگی[۱]

چکیده

مقدمه: فعالیت بدنی نقش عمده‌ای در پیشگیری از بیماری‌های قلبی عروقی و دیابت دارد، ولی تأثیر فعالیت شدید بر پروتئین‌های شبکه‌ی اندوپلاسمیک و آپوپتوز و نکروپتوز در شرایط دیابتی مشخص نیست. هدف از پژوهش حاضر بررسی تغییرات پروتئین‌های PERK و CHOP شبکه‌ی اندوپلاسمیک میوسیت‌های قلبی موش‌های ویستار دیابتی متعاقب تمرین تداومی و تناوبی بود.

روش‌ها: ۳۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار به‌طور تصادفی به ٤ گروه همگن ۸ سری شامل: گروه کنترل سالم بدون تمرین (C)، گروه کنترل دیابتی بدون تمرین (D)، گروه دیابتی و تمرین تداومی با شدت متوسط (۵۵ دقیقه با سرعت ۲٦متر/ساعت) (D+MICT) و گروه دیابتی و تمرین تناوبی (D+HIIT) با شدت ۸۵ تا ۹۰ درصد سرعت بیشینه و ۵ روز در هفته به‌مدت ۸ هفته تقسیم شدند. برای بررسی تغییرات در بیان پروتئین‌های مرتبط با مسیر آپوپتوتیک و نکروپتوتیک در میوکارد عضله‌ی قلبی دیابتی شده از روش مبتنی‌بر روش وسترن بلات استفاده شد. از تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه (One–Way ANOVA) برای بررسی تفاوت بین گروها استفاده گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد القای دیابت نوع دو سبب افزایش مرگ سلولی آپوپتوتیک و نکروپتوتیک می‌گردد (P≤۰/۰۵). لذا، هر دو نوع تمرین هوازی تداومی و تناوبی شدید موجب تعدیل مرگ سلولی آپوپتوتیک می‌شود. و هردو تمرین تناوبی و تداومی بر مرگ نکروپتوزیس سلولی تأثیر کاهشی معناداری داشت.

نتیجه‌گیری: به‌نظر می‌رسد که انواع تمرینات تداومی و تناوبی با شدت‌های مختلف بر مرگ سلولی میوسیت‌های قلبی موش‌های صحرایی دیابتی تأثیر دارد. ولی برای تأیید مرگ نکروپتوتیک دیابتی نیاز به تحقیقات بیشتری است.

واژگان کلیدی: آندوپلاسمیک رتیکولوم کیناز پانکراسی (PERK)، عامل یکدست‌کننده‌ی پروتئینی (CHOP)، آپوپتوز، نکروپتوزیس، دیابت، تمرین تداومی و تناوبی

۱- گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* ***نشانی:*** تهران، سوهانک، مجتمع ولایت، ساختمان امام علی (ع)، دانشکده‌ی تربیت بدنی، گروه علوم زیستی، کد پستی: ۱۹۵۵۸٤۷۸۸۱، پست الکترونیک: **hasanmatinhomaee@gmail.com**

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۲۵ **تاریخ درخواست اصلاح: ۱۳۹۹/۰۱/۲۷** **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۰۲**

مقدمه

دیابت نوع دو یک اختلال متابولیکی غددی است که به‌دلیل هیپرگلایسمی و هیپرلیپیدمی در اثر نقص در ترشح انسولین توسط سلول‌های بتای پانکراس به‌وجود می‌آید. عامل اصلی بروز دیابت نوع دوم، کاهش حساسیت انسولینی و مقاومت به انسولین است که سبب کاهش پاسخ بافت‌های محیطی به عملکرد انسولین است [۱]. افراد مبتلاء به دیابت همواره در معرض بیماری‌های قلبی و عروقی قرار دارند. بنابراین، عوارض قلبی–عروقی علت اصلی مرگ و میر ناشی از دیابت است [۲]. دیابت از عوامل خطر شناخته شده بیماری‌های قلبی عروقی است که می‌تواند موجب مرگ زودرس یا ناتوانی گردد، که منجر به ایجاد بیماری‌های عروقی (میکروآنژیوپاتی دیابتی) در عروق مرکزی و محیطی در اندام‌های حیاتی مانند قلب می‌شود و باعث از بین رفتن جریان خون خواهدشد [۳]. دیابت باعث توسعه‌ی آپوپتوز در سلول‌های قلبی می‌شود. با وجود اینکه آپوپتوز شکلی از مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی بوده و تحت شرایط فیزیولوژیکی در حفظ هومئوستاز بافتی مشارکت دارد اما در وضعیت‌های پاتولوژیکی معین مثل کبد چرب و دیابت میزان آن از حدود طبیعی فراتر می‌رود [٤]. آپوپتوز یک فرآیند بیوشیمیایی است و به سه نوع آپوپتوز، شبه آپوپتوز و شبه نکروز (نکروپتوزیس) دسته‌بندی می‌شود [۲]. تراکم کروماتین درون هسته، چروکیدگی سیتوپلاسم، قطعه قطعه شدن DNA را می‌توان از مشخصات آپوپتوز عنوان کرد. از طرفی نکروپتوزیس در بسیاری از بیماری‌ها با زمینه‌ی التهابی مانند پانکراتیت، بیماری کرون و آنفارکتوس میوکارد دیده می‌شود [٤]. سازوکار سیگنالینگ نکروپتوزیس با تولید TNF-α شروع می‌شود که لیگاند گیرنده‌ی TNF-α (TNFR1) است. زمانی‌که این گیرنده‌ها توسط لیگاندهای مربوطه تحریک شوند، سبب فعال شدن کاسپازها و القاء آپوپتوز می‌گردند [۵]. اخیراً نشان داده شده آپوپتوز نقش عمده‌ای در فرآیند بیماری‌های قلبی عروقی ایفا می‌کند. در نتیجه مهار آپوپتوز در میوکارد، راهبرد مهمی در درمان بیمارهای قلبی عروقی و عوارض ناشی از آن در افراد مبتلا به دیابت نوع دو است [٦].

تمرینات ورزشی هوازی به‌عنوان یک عامل مؤثر در پیشگیری و درمان چاقی و عوارض ناشی از آن مثل بیماری‌های قلبی عروقی و دیابت است [۷–۹]. در تمرینات هوازی به شکل تناوبی دوره‌های تکراری و کوتاه‌مدت فعالیت با شدت بالا با وهله‌های استراحت غیرفعال یا فعال با شدت متوسط یا پایین انجام می‌گردد. در روش تداومی، فعالیتی مداوم و بدون توقف با شدت متوسط بدون وهله‌های استراحت انجام می‌گیرد [۱۰]. در بیماران دیابتی با توجه به تجمع چربی، اضافه وزن، امکان ابتلا به سندرم متابولیک، بیماری‌های قلبی عروقی و آترواسکلروزیس، تعیین شدت تمرین مهم است. از طرفی گزارش شده که حداقل شدت تمرینی برای تأثیر گذاری بیشتر بر لیپیدها، فعالیت بدنی با شدت ۷۵٪ حداکثر شدت ضربان قلب است. [۱۱]. که البته این شدت از تمرین با چالش‌هایی مواجه است [۱۰]. در همین راستا Kazemi و همکاران (۲۰۱٦) با بررسی تأثیر تمرین تناوبی شدید بر سطوح عامل نکروز تومور آلفا در بافت چربی و مقاومت به انسولین در موش‌ها گزارش کردند که تمرین تناوبی شدید می‌تواند باعث کاهش سطوح عامل نکروز تومور آلفا در بافت چربی و نیز انسولین پلاسمایی شود [۱۲]. در مقابل Kanter و همکاران (۲۰۱٦) در مطالعه‌ای با عنوان تأثیر تمرینات با شدت کم بر آپوپتوز در بافت قلبی موش‌های دیابتی بیان کردند که تمرینات با شدت کم اثرات محافظتی در برابر آپوپتوز حاصل از دیابت در بافت قلبی موش‌های دیابتی دارد [۱۳]. با این حال Klu و همکاران (۲۰۱۵) در تحقیقی با عنوان مقایسه اثر شدت تمرینات هوازی بر روی آپوپتوز و استرس اکسیداتیو در موش‌ها بیان کردند تمرینات تناوبی با شدت بالا و تمرینات تداومی با شدت متوسط هر دو اثر یکسانی را بر آپوپتوز و استرس اکسیداتیو در بافت قلب موش‌ها دارند [١٤]. در مقابل Lemos و همکاران (۲۰۱۱) در یک مطالعه‌ی مروری با عنوان مقایسه اثرات تمرین شدید و متوسط بر استرس اکسیداتیو و التهاب ناشی از دیابت نوع دو مثل TNF-α در موش‌ها نتیجه‌گیری کردند که، انجام تمرینات با شدت متوسط به‌دلیل خاصیت ضد التهابی و ضد آنتی اکسیدانی اثرات مفیدی بر متابولیسم افراد دیابتی دارند. آن‌ها همچنین عنوان کردند انجام تمرینات با شدت بالا ممکن است برای افراد دیابت مضر باشند [۱۵]. بررسی مطالعات پیشین حاکی

از وجود تناقض در نتایج مطالعات صورت گرفته دارد. از طرفی تاکنون مطالعه‌ی کافی در رابطه با اثرات شدت تمرین هوازی در برابر عوارض آسیب قلبی و آپوپتوز ناشی از دیابت انجام نشده است. لذا تحقیق حاضر به‌منظور بررسی اثر شدت تمرین هوازی بر انواع مرگ‌های برنامه‌ریزی شده سلول‌های قلبی ناشی از دیابت در موش‌های صحرایی نر مبتلا به دیابت صورت گرفته است.

روش‌ها

تحقیق حاضر از نوع مطالعات حیوانی بالینی مداخله‌ای تجربی در قالب یک طرح پس‌آزمون دو عاملی است که با استفاده از ٤ گروه ۸ سری از موش‌ها براساس مقررات نحوه‌ی کار با حیوانات آزمایشگاهی در محل آزمایشگاه مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی تبریز پس از تصویب در کمیته‌ی اخلاق در پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری (IR.IAU.SARI.REC.1397.8) انجام شد. برای این منظور، تعداد ۳۲ سر موش‌های صحرایی نر سفید نژاد ویستار از مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی تبریز با سن حدود سه ماه و در محدوده‌ی وزنی ۲۲۵ الی ۳۰۰ گرمی تهیه شد. به‌منظور ایجاد حالت سازش با محیط، جلوگیری از استرس و تغییر شرایط فیزیولوژیکی آزمودنی‌ها در محیط آزمایشگاهی ویژه‌ی حیوانات با دارا بودن شرایط ذیل: دما ۲±۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۵±۵۰ درصد، با کم‌ترین سر و صدا و چرخه‌ی روشنایی-تاریکی ۱۲:۱۲ ساعته (شروع روشنایی از ساعت ۷:۰۰ صبح الی ۱۹:۰۰ عصر) به‌صورت ۳ تا ۵ عدد موش در هر قفس از جنس پلی‌کربنات شفاف با قابلیت اُتو کلاو قرار داده شد. در طی این دوره، تمامی حیوانات به‌صورت آزادانه[1] به آب و غذای استاندارد حیوانی (پلت تهیه شده از شرکت خوراک‌سازان اصفهان) به‌مدت دو ماه دسترسی داشتند که این میزان غذای مصرفی به‌صورت دقیق اندازه‌گیری و ثبت گردید. مداخلات تمرینات ورزشی پس از گذشت دست کم دو هفته استقرار حیوانات و در آغاز چرخه‌ی شبانه (ساعت ۱۹:۰۰) در آزمایشگاه حیوانات انجام شد. سپس نمونه‌ها (به غیر از گروه‌های کنترل سالم و کنترل دیابتی) به‌مدت ۷ روز تحت برنامه‌ی آشنایی با نحوه‌ی فعالیت روی نوارگردان قرار گرفتند. طی دوره‌ی آشنایی، شیب نوارگردان صفر درصد، سرعت ۱۵-۱۰ متر در دقیقه و مدت تمرین نیز ۱۰-۵ دقیقه در روز بود. در پایان این دوره، آزمودنی‌ها پس از مطابقت وزنی به‌طور تصادفی در یکی از ٤ گروه ۸ سری قرار گرفتند.

روش القاء دیابت

پس از گذشت دو هفته از شرایط سازگاری با محیط آزمایشگاه، برای القای دیابت نوع دو، طبق روش گروه مطالعاتی Sasidharan و همکاران (۲۰۱۳)، دو هفته مصرف غذای پُرچرب (٤۵٪ چربی، ۲۱٪ پروتئین و ۳٤٪ کربوهیدرات) که توسط محققان و با همکاری شرکت خوراک‌سازان اصفهان تهیه گردید و سپس تزریق درون صفاقی (IP)[2] استرپتوزوسین[3] (شرکت سیگما آلدریچ[4]، آمریکا) در یک دوز ۳۵ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن حل شده در بافر سیترات ۰/۱ مولار (PH=٤/۵) بعد از ۱۲ ساعت ناشتایی به‌صورت تک وهله‌ای اعمال شد [۱٦]. برای گروه کنترل سالم و دیابتی (بدون تمرین) نیز همان مقدار بافر سیترات ۰/۱ مولار برای ایجاد شرایط کاملاً یکسان با گروه‌های دریافت کننده‌ی STZ تزریق شد. ٤۸ ساعت پس از تزریق STZ، میزان گلوکز نمونه خونی از ورید دُمی حیوان و با استفاده ازگلوکومتر بررسی گردید [۱۲]. و غلظت گلوکز خون بالاتر از ۳۰۰-۲۵۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر دیابتی نوع دو وارد تحقیق شدند.

روش تمرین تناوبی

روش تمرینی (تناوبی) تحقیق حاضر برگرفته از مطالعه‌ی Asgari Hazaveh و همکاران (۲۰۱۸) بود که در آن آزمودنی‌ها برای ۵ روز در هفته (شنبه، یکشنبه، سه‌شنبه، چهارشنبه و پنج‌شنبه) برای مدت ۸ هفته در یک برنامه‌ی تمرین تناوبی شدید (HIIT) در پایان سیکل استراحتی و شروع فعالیت حیوانات در محدوده‌ی ساعت ۱۸-۱٦ عصر بر روی نوارگردان الکترونیکی هوشمند

[1] Ad libitum

[2] Intraperitoneal injection
[3] Streptozotocin
[4] Sigma-Aldrich

حیوانی شرکت کردند [۱۷]. قبل از اجرای پروتکل، آزمون رسیدن به واماندگی برای محاسبه‌ی بیشینه سرعت موش‌ها انجام شد. به‌طوری‌که، سرعت دویدن با ۱۰ متر بر دقیقه شروع و در هر دو دقیقه یکبار، سرعتی معادل با سه متر بر دقیقه به آن تا زمان رسیدن به حالت واماندگی افزوده شد. زمان رسیدن به خستگی با عدم توانایی موش‌ها در دویدن روی نوارگردان باوجود ایجاد شوک الکتریکی مشخص شد. روش تمرین HIIT شامل سه مرحله‌ی گرم کردن، بدنه‌ی اصلی تمرین و سرد کردن بود. تمرینات در مرحله‌ی گرم و سرد کردن به‌مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰ متر در دقیقه (برابر با شدت۴۰-۳۰ درصد $VO2_{max}$) برای موش‌ها در نظر گرفته شدند. بدنه‌ی اصلی تمرین نیز برابر با شدت ۹۰-۸۵ درصد سرعت بیشینه در ٦ تا ۱۲ وهله (هر هفته یک نوبت به وهله‌های فعالیتی حیوانات اضافه می‌گردد) بود. به‌علاوه، تناوب‌های یک دقیقه‌ای استراحت فعال که شامل دویدن‌های ادامه‌دار روی نوارگردان با سرعت ۱۰ متر در دقیقه است که میان وهله‌های فعالیتی اعمال شد. همچنین، گروه کنترل سالم که در هیچگونه برنامه‌ی فعالیتی شرکت نکردند، برای ایجاد شرایط کاملاً یکسان با سایر گروه‌های تمرینی، ۵ روز در هفته به‌مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در هر جلسه برای سازگاری با محیط بر روی نوارگردان بی‌حرکت قرار داده شدند. به‌منظور تحریک موش‌ها برای دویدن از محرک الکتریکی با وُلتاژ کم تعبیه شده در قسمت عقبی نوارگردان، استفاده شد.

تمرین تداومی

گروه تمرین تداومی ۵ جلسه در هفته و ۸ هفته بر روی نوار گردان موتوردار دویدند. در ابتدا، موش‌های صحرایی به‌مدت ۱۰ دقیقه هر جلسه و با سرعت ۱۰ متر در دقیقه و با شیب صفر درجه تمرین خود را در پایان سیکل استراحتی و شروع فعالیت حیوانات در محدوده‌ی ساعت ۱۸-۱٦ عصر بر روی نوارگردان الکترونیکی هوشمند حیوانی انجام دادند (هفته اول). سرعت و مدت تمرین به تدریج در طول ۳ هفته بعد افزایش یافت تا اینکه در هفته‌های پایانی مدت و شدت تمرین به‌ترتیب به ۵۵ دقیقه در روز و ۲٦ متر در دقیقه رسید برنامه‌ی تمرینی کامل در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- پروتکل تمرین تداومی

		سرعت	مدت تمرین
هفته اول	روز اول	(m/min) ۱۰	(min) ۱۰
	روز دوم	(m/min)۱۱	(min) ۱۵
	روز سوم	(m/min) ۱۲	(min) ۲۰
	روزچهارم	(m/min)۱۳	(min) ۲۵
	روز پنجم	(m/min) ۱٤	(min) ۳۰
هفته دوم	روز اول	(m/min) ۱٦	(min) ٤۰
	روز دوم	(m/min) ۱۷	(min) ٤۰
	روز سوم	(m/min) ۱۸	(min) ٤۵
	روز چهارم	(m/min) ۱۹	(min) ۵۰
	روز پنجم	(m/min) ۲۰	(min) ۵۵
هفته سوم		(m/min) ۲۲	(min) ٦۰
هفته چهارم		(m/min) ۲۳	(min) ٦۰
هفته پنجم		(m/min) ۲٤	(min) ٦۰
هفته ششم		(m/min) ۲۵	(min) ٦۰
هفته هفتم		(m/min) ۲٦	(min) ٦۰
هفته هشتم		(m/min) ۲۷	(min) ٦۰

روش ایمونو بلاتینگ

تمامی موش‌های صحرایی، ٤٨ ساعت پس از آخرین جلسه‌ی تمرینی (جهت از بین بردن اثرات حاد تمرین) و پس از ۱۲ تا ١٤ ساعت ناشتایی، با تزریق داخل صفاقی کتامین ($mg.kg^{-1}$ ۹۰) و زایلازین ($mg.kg^{-1}$ ۱۰) به روش بدون درد توسط متخصصین کارآزموده بیهوش و جراحی شدند. در ادامه نیز برای ارزیابی میزان سنتز برخی از پروتئین‌های درگیر درمسیرهای نکروپتوزیس از روش وسترن بلات استفاده شد. ابتدا، برای تهیه‌ی هموژنه ۱۰ درصد وزنی حجمی بافت قلب از بافر ریپا (شرکت سیگما) حاوی مهار کننده‌ی پروتئاز کوکتیل (سیگما) استفاده شد. غلظت تام پروتئین با روش برآدفورد[1] (سیگما) اندازه‌گیری شد. سپس پروتئین‌ها در ژل ۱۰ درصد دناتوره کننده‌ی پلی‌آکریل‌آمید حاوی سدیم دودسیل سولفات (SDS)[2] با دستگاه الکتروفورز (Biorad) تفکیک شدند. بعد از تفکیک، باندهای پروتئینی بر روی غشاء پلی وینیلیدین دی فلوراید (PVDF)[3] سیگما منتقل شدند. بعد از استفاده از بافر بلاکینگ برای پوشش دادن نواحی خالی از پروتئین غشاء از بابت بلوکه کننده‌ی حاوی سرم آلبومین گاوی ۳ درصد استفاده شد. سپس غشا با آنتی بادی‌های اولیه‌ی موشی ضد ۳ sc (B2 MLkL(293201,TNFα (4E1) sc 130349، با رقت ۱ به ۲۰۰ (در طول شب) استفاده شد. غشاها پس از چهار بار شستشو هر بار به‌مدت ۵ دقیقه با بافر فسفات نمکی حاوی ۰/۰۵ درصد توین ۲۰، در معرض آنتی بادی ثانویه‌ی ضد موشی کونژوگه با HRP به‌مدت یک ساعت قرار گرفتند. پس از شستشوی مجدد با روش قبلی این بار به‌صورت سه تکرار از کیت (BioRad، ECL) که برای آشکارسازی مجموعه‌های ایمنی تشکیل شده استفاده گردید. غشاها در معرض فیلم رادیوگرافی قرار گرفته و دانسیته‌ی باندها توسط نرم‌افزار Image J اندازه‌گیری شده و دانسیته‌ی باندهای پروتئین هدف در مقابل لودینگ کنترل بتا-اکتین نرمالیزه شد. در انتها نیز نتایج بصورت دانسیتهٔ نسبی (نسبت به گروه کنترل) ارائه شده است [٢٤].

روش TUNEL

برای بررسی میزان آپوپتوز از کیت تانل (Roche-11684795910 استفاده شد. رنگ آمیزی مطابق دستور العمل کیت به‌طور خلاصه به‌ترتیب زیر عمل شد. ابتدا برش‌های بافت آغشته به پارافین قلب تهیه و بعد از دپارافینه و آبدهی شدن در بافر سیترات و به‌مدت ۱۵ دقیقه در مایکروویو ٦۰۰ وات قرار داده شدند. و بعد از ظاهر شدن آنتی ژن‌ها بعد از شتشوی لام‌ها در PBS مخلوط واکنش تانل به نمونه‌ها اضافه شد و به‌مدت ٦۰ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه شد. و مجدداً اسلایدها با PBS شسته شده و لام‌ها مونته گردیدند و با میکروسکوپ فلورسنت (OLYMPUS) و طول موج تحریکی ٤٥۰ نانومتر در طول موج خروجی ٥٦٥ نانومتر رویت گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

بعد از جمع آوری داده‌ها توزیع داده‌ها با تست کلموگروف – اسمیرنوف تعیین و به‌علت توزیع نرمال داده‌ها میانگین با آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی توکی مقایسه گردید. نتایج به‌صورت میانگین و انحراف از استاندارد بیان گردید.

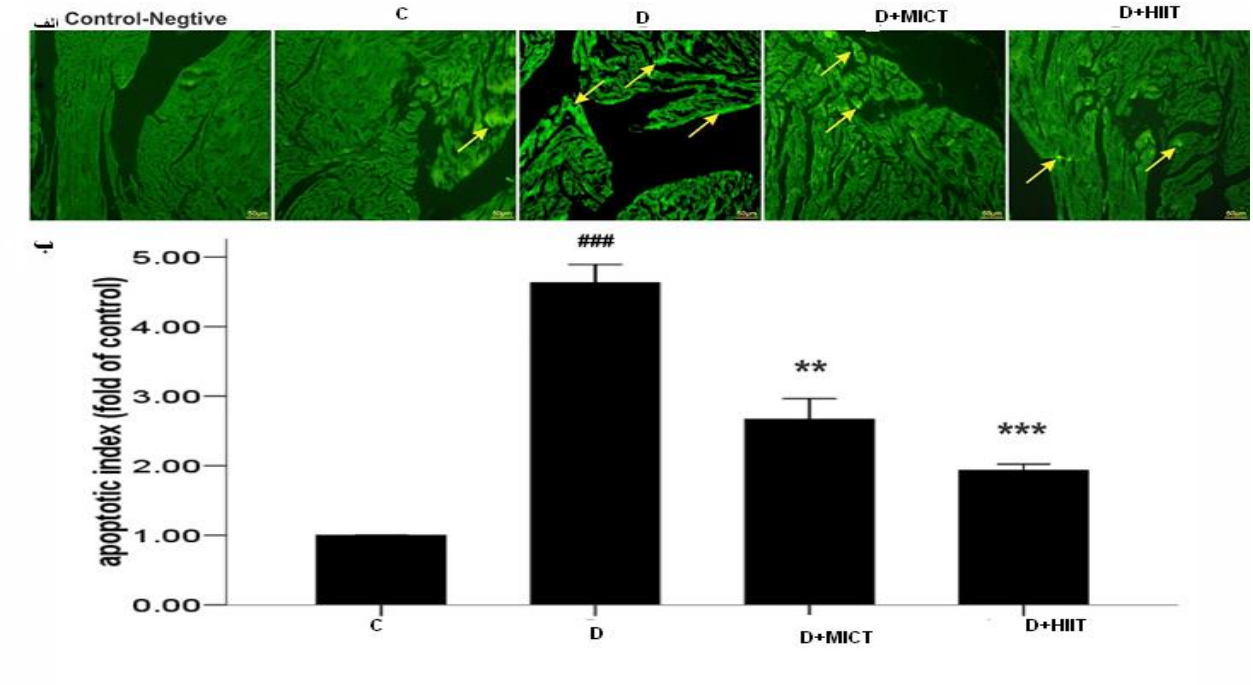
نتایج

اثر دو نوع تمرین ورزشی HIIT و MICT برروی شاخص آپوپتوزی: بررسی نتایج تست تانل نشان داد که دیابت سطح آپوپتوز را در بافت قلب در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش می‌دهد ($P<0.05$) (شکل ۱) هر دو نوع تمرین ورزشی تداومی و تناوبی سطح شاخص آپوپتوز را در مقایسه با گروه کنترل کاهش دادند ($P<0.05$) اما اثر ورزش تناوبی در مقایسه با ورزش تداومی بیشتر بود (شکل ۱).

اثر دو نوع تمرین ورزشی HIIT و MICT برروی شاخصهای نکروپتوزی: نتایج نشان داد که دیابت سطح نکروپتوز را نیزدر بافت قلب در مقایسه با گروه کنترل به‌طور

[1] Bradford
[2] Sodium dodecyl sulfate
[3] Polyvinylidene fluoride

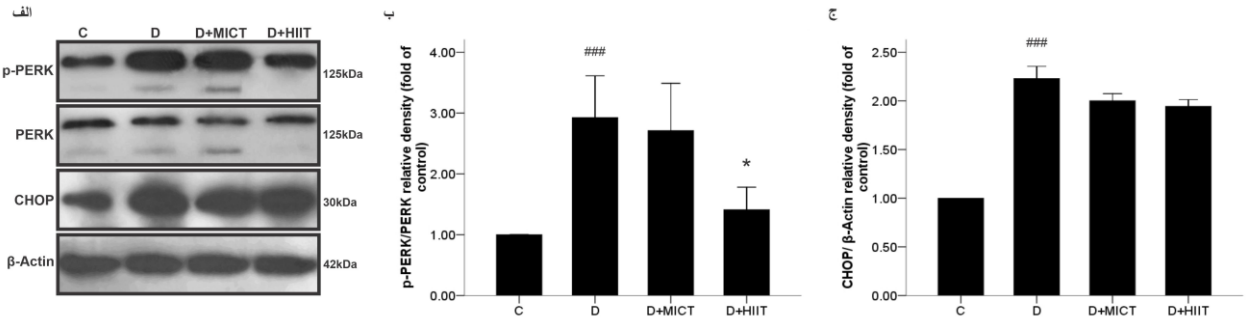
معنی‌داری افزایش می‌دهد (P<0.05) (شکل ۲). همچنین نتایج تست تعقیبی توکی نشان داد که فقط ورزش تناوبی بر مرگ نکروپتوزیس تأثیر معنی‌داری دارد و ورزش تداومی بر مرگ نکروپتوزیس تأثیر محسوسی نشان نداد (شکل ۲).



شکل ۱- مقایسه میانگین آپوپتوز در گروه‌های مختلف مورد مطالعه

الف-تصاویر برش‌های بافتی بطن قلب رنگ آمیزی شده با روش تانل قسمت‌های فلورسانت سبز نشان دهنده‌ی سلول‌های دچار مرگ اپوپتوتیک هستند (پیکان‌های زرد) ب) مقادیر کمی شده‌ی تصاویر تانل با نرم‌افزار image j

تعداد در هر گروه N=۸ (P≥0.001) در مقایسه با گروه کنترل (P≥0.001) و(P≥0.001) در مقایسه با گروه دیابت



شکل ۲- مقایسه میانگین TNFα, PERK, CHOP در گروه‌های مختلف مورد مطالعه

در مقایسه با گروه کنترل ** (P≥0.001) در مقایسه با گروه دیابت + کنترل) *** (P≥0.001) در مقایسه با گروه دیابت + کنتر ل

بحث و نتیجه‌گیری

هدف از پژوهش حاضر تعیین اثر شدت تمرین تداومی و تناوبی بر آپوپتوز و نکروپتوزیس در سلول‌های قلب موش‌های دیابتی شده با استروپتوزوتوسین بود. نتایج نشان داد که با تزریق استروپتوزوتوسین با دوز ۳۵ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن، دیابت نوع دو القاء شده و هر دو نوع مرگ سلولی آپوپتوتیک و نکروز اتفاق می‌افتد. همچنین هر دو نوع تمرین هوازی تداومی با شدت متوسط و تناوبی شدید بر مرگ آپوپتوتیک تأثیر دارد. اما تأثیر ورزش تناوبی بیشتر از ورزش تداومی با شدت متوسط است. همچنین فقط ورزش تناوبی بر مرگ نکروپتوزیس تأثیر معناداری داشت. چنانچه القاء دیابت توسط استرپتوزوتوسین در مطالعات قبلی نیز دیده شده است نتایج حاضر نیز دور از انتظار نبود [۱۸]. آپوپتوز به‌عنوان یکی از آسیب‌های دیابت بر میوکارد توسط فعال‌سازی اجزای مسیر آپوپتوز و فعالیت کاسپاز نشان داده شده و مرگ سلول‌های میوکاردی به‌عنوان یک اتفاق مهم در پیشرفت آسیب قلبی ناشی از دیابت شناخته شده است [۱۹]. نشان داده شده که افزایش استرس اکسیداتیو متعاقب بیماری دیابت باعث افزایش میزان گونه‌های فعال اکسیژنی و کاهش ظرفیت دفاع آنتی اکسیدانی شده و در نتیجه مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های قلبی یا الگوی آپوپتوز رخ می‌دهد. تحقیقات گزارش کرده‌اند که علت وقوع آپوپتوز سلول‌های قلبی در اثر دیابت علاوه برافزایش استرس‌های اکسیداتیو، وقوع فرآیند التهابی است [۲۰، ٤]. در مطالعه‌ی حاضر از تست تانل برای بررسی آپوپتوز استفاده شده که، القای آپوپتوز در گروهای دیابتی را در مقایسه با گروه کنترل تأیید کرد (شکل ۱).

به‌نظر می‌رسد که در دیابت نوع دو هر دو نوع مرگ سلولی (نکروز و آپوپتوز) اتفاق می‌افتد. که این نتایج در مطالعات قبلی نیز نشان داده شده‌اند [۲۰، ۱۵]. نکروز پاسخ طبیعی سلول به صدمه‌های فیزیولوژیکی است که با برهم خوردگی توانایی سلول برای نگه‌داری هموستازی شروع می‌شود، با نفوذ آب و یون‌های خارج سلولی تمام اندامک‌های درون سلولی به‌خصوص میتوکندری متورم می‌شود و سپس با از هم پاشیدگی غشای سلولی و لیز سلولی تخریب صورت می‌گیرد و اجزای سیتوپلاسمی نظیر آنزیم‌های لیزوزومی در مایع خارج سلولی رها می‌شوند. بنابراین به‌علت پاسخ‌های التهابی، مرگ سلولی از طریق نکروز با تخریب گسترده‌ی بافتی همراه است. سازوکار سیگنالینگ نکروپتوزیس با تولید TNF-α شروع می‌شود که لیگاند گیرنده‌ی TNF-α (TNFR1) است. زمانی‌که این گیرنده‌ها توسط لیگاندهای مربوطه تحریک شوند، سبب فعال شدن کاسپازها و القا آپوپتوز می‌گردند [۵]. در این مطالعه مقایسه‌ی اثر شدت‌های مختلف ورزش نشان داد که هر دو نوع تمرین هوازی تداومی با شدت متوسط و تناوبی شدید بر مرگ آپوپتوتیک تأثیر دارد. اما تأثیر ورزش تناوبی قوی‌تر از ورزش تداومی است. همچنین فقط ورزش تناوبی بر مرگ نکروپتوزیس تأثیر معناداری داشت.

اثر تمرینات ورزشی روی آپوپتوز در مطالعات قبلی به وضوح دیده شده است [۲۱، ۱۳]. در همین ارتباط، Mohammadi و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعه‌ای بیان داشتند که افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی و کاهش سطح پروکسیداسیون لیپیدی که به‌دنبال فعالیت ورزشی پدید می‌آید، دارای تأثیرات مهمی در جلوگیری از عوارض آپوپتوز ناشی از دیابت و آسیب‌های بافتی ایجادشده ناشی از استرس اکسیداتیو است [۲۲]. همچنین نشان داده شده است که تمرین ورزشی قبل از وقوع ایسکمی موجب کاهش نسبت بین پروتئین‌های پیش آپوپتوز و پروتئین‌های ضدآپوپتوز مانند PERK و کاهش سیگنالینگ فعال سازی کاسپاز – ۳ (کاسپاز نهایی مسیرآپوپتوز) می‌شود [۲۳]. در همین رابطه، وینکر و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که شش هفته تمرین روی نوارگردان باعث افزایش Bcl-2 و کاهش PERK و نسبت CHOP به PERK در موش‌های صحرایی می‌شود [۱۹]. از طرفی، یافته‌های تحقیق ما نشان داد که هر دو نوع شدت تمرینی بر مرگ آپوپتوتیک تأثیر دارد ولی اثر ورزش تناوبی قوی‌تر از اثر ورزش تداومی است. همچنین نتایج مشابهی در تحقیقات قبلی به‌دست آمده است [۲۵، ۲٤]. هر چند سازوکارهای تأثیر ورزش HIIT هنوز به‌طور کامل مشخص نیست ولی به‌نظر می‌رسد که این نوع شدت تمرینی با افزایش Vo2 max در مقایسه با شدت تمرینی

MICT با توسعه‌ی بیشتر عروق خونی باعث افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی در برابر رادیکال‌های آزاد می‌شود. در مقابل Teixeira de Lemos و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه‌ای با مقایسه اثرات شدت تمرین بر روی موش‌های دیابتی نتیجه‌گیری کردند که تمرینات ورزشی با شدت ملایم به‌دلیل خاصیت بیشتر ضد التهابی و آنتی اکسیدانی بر متابولیسم دیابتی‌ها تأثیر بیشتری دارند که این نتایج با یافته‌های تحقیق حاضر مغایرت دارد.

از دلایل مغایرت می‌توان به نوع تمرینات، (تمرینات شنا در مقابل تمرینات بر روی تریدمیل) مدت زمان تمرین و همچنین شدت تمرینات اشاره کرد [۱۵].

از دیگر نتایج تحقیق حاضر نشان داده شد که تنها ورزش تناوبی با شدت بالا بر مرگ نکروپتوزیس تأثیر معناداری دارد که با نتایج تحقیقات قبلی برروی افراد دیابتی نوع دو مطابقت دارد [۲۶]. در همین ارتباط Gomez-Merino و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه‌ای حیوانی به‌مدت ۷ هفته با انجام ورزش تناوبی باشدت بالا بیان کردند که انجام تمرینات با شدت بالا باعث کاهش بافت چربی سفید و همچنین کاهش بیشتر شاخص‌های التهابی مثل TNF-α، IL-6 و IL-8 می‌شود [۲۷].

با توجه به نتایج اغلب مطالعات انجام شده به‌نظر می‌رسد که تمرین هوازی ممکن است یک عامل اصلی و بالقوه در تغییرات مربوط به TNF-α باشد. با این حال پاسخ‌های متابولیکی طی تمرین تناوبی، شدیدتر از پاسخ‌های تمرین‌های تداومی و متوالی و با شدت متوسط است [۲۸].

علاوه براین، به‌نظر می‌رسد که سازوکار تغییرات TNF-α پس از تمرین‌های تناوبی شدید، قوی‌تر از تغییرات آن پس از تمرینات هوازی با شدت متوسط است بنابراین، به احتمال زیاد تمرین‌های تناوبی شدید مانند تمرین‌های تداومی طولانی‌مدت با تغییر در میزان دسترسی به مواد غذایی طی ورزش و ایجاد کسر انرژی، مسیرهای متابولیکی مؤثر در تنظیم بیان TNF-α را فعال کرده و از این طریق در تعدیل و تنظیم این سایتوکاین مؤثر واقع می‌شوند. با توجه به نتایج به‌دست آمده از این مطالعه، اجرای تمرینات هوازی با شدت‌های مختلف بر مرگ آپوپتتیک تأثیر دارد. با این حال با توجه به اهمیت تعیین نوع تمرین، شدت و مدت زمان تمرین در افراد دیابتی پیشنهاد می‌شود تحقیقات بیشتری در این رابطه انجام پذیرد.

سپاسگزاری

از مساعدت و همکاری صمیمانه‌ی مسؤولین آزمایشگاه مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی تبریز و تمام افرادی که موجب انجام این پژوهش شدند، تقدیر و تشکر می‌گردد. پژوهش حاضر حاصل پایان‌نامه‌ی دکتری رشته فیزیولوژی ورزشی گرایش قلب، عروق و تنفس است.

مآخذ

1. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995–2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes care* 1998; 21(9):1414-31.
2. Iltis I, Kober F, Dalmasso C, Cozzone PJ, Bernard M. Noninvasive Characterization of Myocardial Blood Flow in Diabetic, Hypertensive, and Diabetic–Hypertensive Rats Using Spin-Labeling MRI. *Microcirculation* 2005; 12(8):607-14.
3. Rubler S, Dlugash J, Yuceoglu YZ, Kumral T, Branwood AW, Grishman A. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *The American Journal of Cardiology* 1972; 30(6):595-602.
4. Guleria RS, Choudhary R, Tanaka T, Baker KM, Pan J. Retinoic acid receptor-mediated signaling protects cardiomyocytes from hyperglycemia induced apoptosis: Role of the renin-angiotensin system. *Journal of Cellular Physiology*. 2011; 226(5):1292-307.
5. Wang H, Sun L, Su L, Rizo J, Liu L, Wang L-F, et al. Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3. *Molecular Cell* 2014; 54(1):133-46.
6. Gill C, Mestril R, Samali A. Losing heart: the role of apoptosis in heart disease—a novel therapeutic target? *The FASEB Journal* 2002; 16(2):135-46.
7. Riddell M, Iscoe K. Physical activity, sport, and pediatric diabetes. *Pediatric Diabetes* 2006; 7(1):60-70.
8. Health UDo, Services H. Physical activity guidelines advisory committee final report. Washington, DC: Department of Health and Human Services; 2008.
9. Nabilpour M, Mayhew J. Effect of peripheral heart action on body composition and blood pressure in women with high blood pressure. *International Journal of Sport Studies for Health* 2018; 1(2).
10. Colberg SR, Sigal RJ, Yardley JE, Riddell MC, Dunstan DW, Dempsey PC, et al. Physical activity/exercise and diabetes: a position statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2016; 39(11):2065-79.
11. Wisløff U, Helgerud J, Kemi OJ, Ellingsen Ø. Intensity-controlled treadmill running in rats: V̇ o 2 max and cardiac hypertrophy. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2001; 280(3):H1301-H10.
12. Kazemi A, Eslami R, Karimqasemi L. The effect of high-intensity interval training on tumor necrosis factor-alpha levels in visceral and subcutaneous adipose tissue and insulin resistance in male rats. 2017.
13. Kanter M, Aksu F, Takir M, Kostek O, Kanter B, Oymagil A. Effects of low intensity exercise against apoptosis and oxidative stress in Streptozotocin-induced diabetic rat heart. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 2017; 125(09):583-91.
14. Lu K, Wang L, Wang C, Yang Y, Hu D, Ding R. Effects of high-intensity interval versus continuous moderate‐intensity aerobic exercise on apoptosis, oxidative stress and metabolism of the infarcted myocardium in a rat model. *Molecular Medicine Reports* 2015; 12(2):2374-82.
15. Teixeira de Lemos E, Pinto R, Oliveira J, Garrido P, Sereno J, Mascarenhas-Melo F, et al. Differential effects of acute (extenuating) and chronic (training) exercise on inflammation and oxidative stress status in an animal model of type 2 diabetes mellitus. *Mediators of inflammation* 2011; 2011.
16. Sasidharan SR, Joseph JA, Anandakumar S, Venkatesan V, Madhavan A, Nair C, et al. An experimental approach for selecting appropriate rodent diets for research studies on metabolic disorders. *BioMed research international* 2013; 2013.
17. Asgari Hazaveh D, Riyahi MS, Babaei S. Effect of Eight Weeks High Intensity Interval Training and Medium Intensity Interval Training and Aloe vera Intake on Serum Vaspin and Insulin Resistance in Diabetic Male Rats. *J Arak Uni Med Sci* 2018; 20(11): 67-75
18. Fiordaliso F, Li B, Latini R, Sonnenblick EH, Anversa P, Leri A, et al. Myocyte death in streptozotocin-induced diabetes in rats is angiotensin II-dependent. *Laboratory investigation* 2000; 80(4):513.
19. Wencker D, Chandra M, Nguyen K, Miao W, Garantziotis S, Factor SM, et al. A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *The Journal of clinical investigation* 2003; 111(10):1497-504.
20. Cao JY, Wang H. Role of Fas-FasL in insulitis in nonobese diabetic mouse. *Chinese Medical Journal* 2004; 117(4):615-7.
21. Aboutaleb N, Shamsaei N, Khaksari M, Erfani S, Rajabi H, Nikbakht F. Pre-ischemic exercise reduces apoptosis in hippocampal CA3 cells after cerebral ischemia by modulation of the Bax/Bcl-2 proteins ratio and prevention of caspase-3 activation. *The Journal of Physiological Sciences* 2015; 65(5):435-43.
22. Mohammadi M, Salehi I, Farajnia S. Effect of swimming exercise on oxidative stress in hippocampus of diabetic male rats. *Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences* 2008; 30(2): 111-118.
23. Derouich M, Boutayeb A. The effect of physical exercise on the dynamics of glucose and insulin. *Journal of biomechanics* 2002; 35(7):911-7.
24. Lee S, Tjønna A, Rognmo Ø, Stølen T, Bye A, Haram P. Aerobic interval training versus

continuous moderate exercise as a treatment for the metabolic syndrome. *Circulation* 2008; 118(4):346-54.
25. Ramos JS, Dalleck LC, Tjonna AE, Beetham KS, Coombes JS. The impact of high-intensity interval training versus moderate-intensity continuous training on vascular function: a systematic review and meta-analysis. *Sports medicine* 2015; 45(5):679-92.
26. Little JP, Gillen JB, Percival M, Safdar A, Tarnopolsky MA, Punthakee Z, et al. Low-volume high-intensity interval training reduces hyperglycemia and increases muscle mitochondrial capacity in patients with type 2 diabetes. *J Appl Physiol (1985)* 2011; 111(6):1554-60.
27. Gomez-Merino D, Drogou C, Guezennec C, Chennaoui M. Effects of chronic exercise on cytokine production in white adipose tissue and skeletal muscle of rats. *Cytokine* 2007; 40(1):23-9.
28. Rodahl K, Astrand P-o, Dahl HA, Stromme SB. *Textbook of work physiology: physiological bases of exercise:* Human Kinetics; 2003.

CHANGES OF PERK AND CHOP PROTEINS IN ENDOPLASMIC RETICULUM OF CARDIAC MYOCYTES AND TNF IN DIABETIC WISTAR RATS FOLLOWING CONTINUOUS AND INTERVAL EXERCISE

Majid Jahani[1], Hasan Matin Homaee*[1], Parvin Farzanegi[1]

1. Department of physiology exercise, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

ABSTRACT

Background: Physical activity plays a major role in the prevention of cardiovascular disease and diabetes, but the effect of intense activity on endoplasmic reticulum proteins and apoptosis and necroptosis in diabetic conditions is unclear. The aim of the present study was to investigate the changes of PERK and CHOP proteins in endoplasmic reticulum of cardiac myocytes of diabetic Wistar rats following continuous and interval exercise.

Methods: For this purpose, 32 male white wistar were purchased and were randomly divided into 4 groups of hemogenus 8 rats in each group: Healthy control (C), Diabetic control (D), Diabetic with moderate-intensity continuous training intensity at the 55min on 26 m/min speed (D+MICT) and Diabetic with high-intensity interval training intensity at the 85-90% of maximum speed (D+HIIT); 5 days/week for 8 weeks. For evaluate changes in the expression of the proteins associated with apoptosis and necroptotic death in the diabetic heart muscle myocardium, based on Western blot analysis will be used. Also, the one-way analysis of variance (ANOVA) is used to determine differences between the study groups.

Results: The results showed that induction of type 2 diabetes increased apoptotic and necroptosis cell death ($P \geq 0.05$). Therefore, both continuous and intermittent aerobic exercise modulate apoptotic cell death. And both intermittent and continuous exercise had a significant effect on cell necroptosis death.

Conclusion: It seems that different levels of aerobic exercise have different effects on cardiac myocytes cell death in diabetic rats. But more research is needed to confirm the death of diabetic necroptics.

Keywords: Pancreas Endoplasmic Reticulum Kinase, CHOP, Apoptosis, Necroptosis, Diabetes**,** Continuous And Interval Exercise

*Tehran-Sohanak, Velayat Complex, Imam Ali Building, Faculty of Physical Education, Department of Biological Sciences, Postal Code: 1955847881, Email: hasanmatinhomaee@gmail.com