مجله دیابت و لیپید ایران. بهمن- اسفند ۱۳۸۹؛ دوره ۱۰ (شماره ۳) ۲۶۲-۲۵۱

تاثیر تمرین استقامتی بر محتوی پروتئینی مبادله‌گر سدیم هیدروژن و کوترانسپورتر سدیم بی‌کربنات در عضلات اسکلتی رت‌های دیابتی نوع ۲

امیرعباس منظمی[۱]، حمید رجبی[۱*]، رضا قراخانلو[۲]، محمد جوان[۲]، منیژه نوروزیان[۱]، کبری امیدفر[۳]، روح الله نیکویی[۱]

چکیده

مقدمه: هدف از تحقیق حاضر تعیین اثر تمرین استقامتی بر میزان محتوی پروتئینی مبادله‌گر سدیم هیدروژن (NHE ۱) و کوترانسپورتر سدیم بی‌کربنات (NBC ۱) در غشای عضلات اسکلتی رت‌های دیابتی نوع ۲ بود.

روش‌ها: تعداد ۴۰ رت نژاد ویستار نر در سن ۴ هفتگی با میانگین وزن ۹/۸±۹۳/۷ گرم انتخاب و به طور تصادفی به سه گروه کنترل سالم (۷ سر رت) کنترل دیابتی (۹ سر رت) و تمرینی دیابتی (۹ سر رت) تقسیم شدند. دیابت از طریق ترکیب تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین و مصرف غذای پرچرب ایجاد و تمرین استقامتی (دویدن روی نوار گردان جوندگان، شروع با ۲۰min/m تدریجاً به ۳۰ min/m در هفته آخر) به مدت هفت هفته، بر گروه تمرینی دیابتی اعمال شد. جهت تایید مقاومت انسولین از مقادیر HOMA-IR استفاده گردید. ۲۴ ساعت پس از اتمام پروتکل تمرینی، رت‌ها تشریح و عضله نعلی (SOL) و باز کننده طویل انگشتان (EDL) استخراج شدند. اندازه‌گیری انسولین پلاسما به روش ELISA، غلظت گلوکز پلاسما با روش آنزیماتیک گلوکز اکسیداز و میزان محتوی پروتئینی NHE۱ و NBC ۱ با تکنیک وسترن بلاتینگ انجام گرفت و با استفاده تکنیک Scanning Densitometric نرم افزار Image j چگالی باندهای NHE۱ و NBC ۱ تعیین شد. جهت تعیین معنی‌دار بودن تفاوت متغیرها بین گروه‌های تحقیق از آزمون آنوای یک راهه و آزمون تعقیبی توکی TUKEY استفاده شد.

یافته‌ها: یافته‌های تحقیق نشان داد مقادیر HOMA–IR INDEX در دو گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم بیشتر بود (P<۰/۰۰۱)، همچنین اختلاف معنی‌دار بین میزان محتوی پروتینی NHE۱ عضله EDL بین گروه تمرینی دیابتی و کنترل دیابتی یافت شد (P<۰/۰۵). میزان محتوی پروتئینی NBC۱ عضله EDL و همچنین میزان محتوی پروتئینی NHE۱ و NBC۱ عضله نعلی نیز در هر دو گروه دیابتی کنترل و تمرین افزایش پیدا کرد اما این افزایش غیر معنی‌دار بود (P<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: نتایج تحقیق نشان داد که محتوی پروتئینی NHE۱ و NBC ۱ عضلات اسکلتی رت‌های دیابتی نوع ۲ در مقایسه با گروه کنترل سالم کاهش داشته است و تمرین استقامتی محتوی این ترانسپورترها را در گروه تمرینی دیابتی افزایش می‌دهد. بنابر این می‌تواند سطوح این ترانسپورترها را به شرایط نرمال نزدیک کند.

واژگان کلیدی: تمرین استقامتی، مبادله‌گر سدیم هیدروژن، کوترانسپورتر سدیم بی‌کربنات، رت‌های با دیابت نوع ۲

۱- دانشگاه تربیت معلم تهران

۲- دانشگاه تربیت مدرس تهران

۳- مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

* ***نشانی***: تهران، اتوبان شهید حقانی، جنب ورزشگاه شهید کشوری، دانشکده تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، تلفن: ۰۹۱۲۷۹۳۷۷۶۸، نمابر: ۲۲۲۶۹۵۴۷، پست الکترونیک: hrajabi@hotmail.com

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۰/۰۶ **تاریخ درخواست اصلاح: ۸۹/۱۰/۲۸** **تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۱/۰۳**

مقدمه

دیابت نوع ۲ یا دیابت غیر وابسته به انسولین (NIDDM)[1] به علت مقاومت به انسولین یا کاهش گیرنده‌های غشای هدف به انسولین و همچنین عملکرد تغییر یافته سلول‌های پانکراس توصیف می‌شود [۳-۱]. مقاومت به انسولین موجب هایپر گلیسیمیا، افزایش گلوکونئوژنز در کبد و افزایش لیپولیز و مصرف بیش از حد کتون بادی‌ها می‌گردد که در نهایت PHC خون حالت اسیدی پیدا می‌کند [۷-۴]. تغییر به سمت اسیدی شدن خون به ویژه به صورت مزمن، بسیار خطرناک است زیرا پروتئین‌ها (بافت‌های بدن، آنزیم‌ها و غیره) در این شرایط ماهیت خود را از دست می‌دهند و منجر به آسیب به بافت، اختلال در عملکرد و نقص ارگان و در نهایت مرگ می‌شوند [۸،۹]. به هر حال در شرایط تمرین و دیابت مکانیزم‌هایی جهت هومئوستاز PH_i فعال می‌شوند که از مهمترین آنها می‌توان به فعالیت سیستم بافرینگ و فعالیت ترانسپورترهای غشایی اشاره کرد [۱۲-۱۰]. از مهمترین بافرهای بدن در این خصوص، سیستم بافری بی‌کربنات و سیستم بافری غیر بی‌کربنات (شامل فسفات‌ها و پروتئین‌ها] هستند.

سیستم بافری بی‌کربنات حدود ۷۵ درصد از کل سیستم بافر کردن پروتون را بر عهده دارد درحالی که نقش سیستم غیر بی‌کربنات جهت بافر کردن پروتون به ۲۵ درصد می‌رسد [۱۷-۱۳]. مهمترین ترانسپورترهای غشایی کوترانسپورتر لاکتات[2] و پروتون، کوترانسپورتر سدیم و بی‌کربنات[3] و مبادله‌گر سدیم پروتون[4] هستند [۲۰-۱۸]. این ترانسپورترهای غشایی از طریق انتقال یون‌هایی مثل بی‌کربنات، پروتون، لاکتات، سدیم و کلر نقش بسیار مهمی را در تنظیم محیط درون سلولی به عهده می‌گیرند [۱۰،۱۱،۱۸]. در این مجوعه MCT ها یا انتقال دهنده‌های لاکتات و پروتون به عنوان تنظیم کننده‌های وابسته به لاکتات وNBC ها (انتقال دهنده سدیم و بی‌کربنات) و NHE ها (مبادله‌گر سدیم و هیدروژن) هر دو به عنوان تنظیم کننده‌های غیر وابسته به لاکتات شناسایی شده‌اند [۱۱]. به هر حال در شرایط استراحتی اسیدوز دیابتی (NIDDM) و تمرین زیر بیشینه تجمع لاکتات پایین است و به همین دلیل بخش اصلی دفع پروتون بوسیله مکانیزم‌های غیر وابسته به لاکتات تعدیل می‌گردد. ولی طی تمرین با شدت بالا نقش سیستم وابسته به لاکتات برجسته‌تر است، به گونه‌ای که در این شرایط سیستم دفعی غیر وابسته به لاکتات تنها حدود دو برابر شرایط استراحتی افزایش پیدا می‌کند در حالی که سیستم دفعی وابسته به لاکتات می‌تواند تا حدود پنج برابر حالت استراحتی افزایش پیدا کند [۲۴-۲۱]. بنابر این در شرایط استراحت، اسیدوز دیابتی (NIDDM) و تمرین زیر بیشینه NHE ها وNBC ها مهم‌ترین ترانسپورترهای انتقال پروتون به شمار می‌روند در حالی که در شرایط تمرین بیشینه نقش اصلی به MCT ها واگذار می‌گردد [۲۸-۲۵، ۲۱].

از آنجایی که عضلات مهم‌ترین جایگاه تولید لاکتات و پروتون می‌باشند و همچنین تنوع شدت‌های تمرینی زیر بیشینه و بیشینه موجب به کارگیری واحدهای حرکتی کند و تند می‌شود، لذا به نظر می‌رسد که تمرین زیر بیشینه بتواند محتوی این ترانسپورترها را در عضلات کند و تند در شرایط دیابتی تغییر دهد و از این طریق به تنظیم و کنترل اسیدوز دیابتی در بیماران NIDDM کمک نماید [۱۴،۲۹،۳۰].

تا کنون ۱۰ ایزوفرم از NHE ها و ۴ ایزوفرم ازNBC ها در موش و انسان شناسایی شده‌اند که توزیعی وابسته به بافت دارند. به هر حال در عضلات اسکلتی انسان و حیوان دو ایزوفرم NHE۱ و NHE۳ و NBC۱ و NBC۴ با خصوصیات کنتیکی و مکان‌های متفاوت بیشتر از همه بیان می‌شوند. NHE۱ بیشتر در تارهای تند بیان می‌شود ولی NBC ۱ توزیعی یکسان در همه تارها دارد [۱۲]. تحقیقات نسبتاً زیادی در مورد فعالیت MCT ها و محتوی پروتئینی آنها در شرایط دیابت و تمرین صورت گرفته است. برای مثال جول و همکاران اثر تمرینات قدرتی بر محتوی پروتئینی MCT۱ و MCT ۴ عضلات اسکلتی افراد دیابتی نوع دو را مورد ارزیابی قرار دادند و نشان دادند که محتوی MCT۱ در گروه کنترل دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم پایین‌تر است و تمرین قدرتی محتوی پروتئینی MCT۱ را

1- Non-insulin Dependent Diabetes Mellitus
2- Lactate/H Cotransporter
3- Na/HCO3 Cotransporter
4- Na/H Exchanger

در گروه تمرینی دیابتی افزایش داده است و آن را به شرایط نرمال رسانده است [۳۱]. اخیراً نیکویی و همکاران اثر تمرینات استقامتی بر بیان ژن‌های MCT۱ و MCT ۴ در عضلات اسکلتی رت‌های دیابتی را مورد ارزیابی قرار دادند و نتایج آن‌ها نشان داد که تمرین استقامتی بیان ژن‌هایMCT۱ و MCT۴ را در گروه تمرینی دیابتی افزایش می‌دهد [۳۲].

همچنین کلایر و همکاران اثر تمرینات اینتروال شدید بر محتوی پروتئینی MCT۱ و MCT۴ و NBC را مورد ارزیابی قرار دادند و نشان دادند که محتوی پروتئینی MCT۱ و NBC در تارهای کند نسبت به تند افزایش پیدا کرده است [۲۵]. کارستن جول نیز اثر تمرینات اینتروال شدید بر محتوی پروتئینی NHE ۱ عضلات اسکلتی رت مورد ارزیابی قرار داد و نشان داد که محتوی پروتئینی ۱ NHE در عضلات تند نسبت به عضلات کند بیشتر افزایش پیدا کرده است [۳۶-۳۳، ۲۰]. فلمینگ و همکاران اثر تمرینات قدرتی بر محتوی پروتئینی NHE۱ عضلات اسکلتی افراد دیابتی نوع دو را مورد ارزیابی قرار دادند و نشان دادند که تمرین قدرتی اثر مثبتی بر محتوی پروتئینی این ترانسپورتر نداشته است [۳۷]. در مجموع به نظر می‌رسد که این گونه تحقیقات بیشتر ترانسپورترهایی را که در شرایط تمرینات بیشینه فعال می‌شوند مورد توجه قرار داده‌اند و همچنین نمونه‌های تحقیقاتی مورد توجه بیشتر در شرایط سالم بوده‌اند. اما تحقیقات در ارتباط با اثر تمرین استقامتی بر محتوی این ترانسپورترها (NHE۱ و NBC۱) در عضلات اسکلتی مختلف رت در شرایط دیابت نوع دو محدود می‌باشد [۳۸]. در نتیجه تحقیق حاضر به بررسی اثر تمرین استقامتی بر محتوی پروتئینی این ترانسپورترها درغشای عضلات تند و کند در شرایط دیابت نوع دو می‌پردازد تا از این طریق برخی از مکانیزم‌های مسئول تنظیم و کنترل PH_i در شرایط NIDDM مورد مطالعه قرار گیرد.

روش‌ها

تعداد ۴۰ رت نر نژاد ویستار در سن ۴ هفتگی با میانگین وزنی ۹/۸±۹۳/۷ گرم از انستیتو پاستور ایران تهیه و در شرایط دمایی ۴±۲۲ درجه سانتی‌گراد تحت سیکل ۱۲:۱۲ ساعت تاریکی- روشنایی نگهداری شدند. وزن بدن به طور روزانه ثبت و رت‌ها با غذای مخصوص رت و آب تغذیه شدند. بعد از گذشت دو هفته (سازگاری با محیط آزمایشگاه و رسیدن به وزن مطلوب)، رت‌ها با میانگین وزن ۱۱/۴±۱۸۳/۴۷ گرم به طور تصادفی ضمن همسان‌سازی بر اساس وزن به سه گروه کنترل سالم (n=۷)، کنترل دیابتی (n=۹) و تمرینی دیابتی (n=۹) تقسیم شدند. دیابت در این تحقیق از طریق ترکیب مصرف غذای پر چرب و تزریق استرپتوزوتوسین ایجاد شد. غذای مورد استفاده شامل ۵۸ درصد چربی، ۲۵ درصد پروتئین و ۱۷ درصد کربوهیدرات بود و عناصر تشکیل دهنده آن در جدول ۱ گزارش شده است [۳۶]. این ترکیب غذایی بوسیله تیم تحقیق به صورت دست‌ساز و با همکاری شرکت کانی دام و مؤسسه واکسن‌سازی و سرم‌سازی رازی ایران انجام گرفت. رت‌های گروه دیابتی به مدت دو هفته تحت مصرف غذای چرب قرار گرفتند در حالی که گروه کنترل سالم غذای طبیعی مصرف می‌کرد. بعد از آن تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین به میزان kg/mg ۳۵ در بافر سیترات PH=۴/۵۱M بعد از ۶ ساعت ناشتایی در دو گروه دیابتی انجام گرفت. ۴۸ ساعت بعد از تزریق دارو، نمونه خونی از چشم حیوان جمع‌آوری و جداسازی سرم با ۳۰۰۰g، ۱۰min، ۴ C انجام و غلظت گلوکز از روش آنزیماتیک گلوکز اکسیداز با کیت شرکت پارس آزمون اندازه‌گیری گردید. غلظت گلوکز بالاتر از ۳۰۰ dl/mg به عنوان دیابت تعریف و رت‌های واجد شرایط وارد تحقیق شدند [۳۶].

پروتکل تمرینی

تمرین استقامتی به مدت ۷ هفته، هر روز بر گروه تمرینی دیابتی اعمال شد (جدول ۲). به دلیل شرایط خاص رت‌های تحقیق (دیابت شدید)، اعمال مدت‌های طولانی‌تر تمرینی بیشتر از ۳۵ دقیقه امکان‌پذیر نبود و این مدت به عنوان مدت نهایی در اواخر تمرین در نظر گرفته شد.

ضمن این که شدت به گونه‌ای انتخاب گردید که سطوح لاکتات را در حین تمرین دستخوش تغییر قابل ملاحظه نماید (۷۰-۶۰ درصد VO2MAX). بروکس و همکاران نشان دادند که این شدت تمرینی موجب افزایش قابل توجه سطوح لاکتات می‌شود [۳۹]. تمامی این اطلاعات با انجام pilot study روی ۴ رت بدست آمد. میزان لاکتات در شدت تمرینی۳۰min/m (۶۰ تا۷۰ درصد vo2max) برابر با mmol/lit ۴بود. دو هفته آخر نیز تمامی متغیرهای تمرینی ثابت نگه داشته شدند تا سازگاری‌های انجام شده در زمان تشریح به حالت یکنواخت خود برسند [۴۰،۴۱].

تست HOMA-IR

۲۴ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی، بعد از ۸ ساعت ناشتایی نمونه خونی به میزان ml ۱ از چشم حیوان جمع‌آوری و جداسازی پلاسما با سانتریفیوژ کردن در ۳۰۰۰g، ۱۰ min، C ۴ انجام و جهت اندازه‌گیری گلوکز و انسولین ناشتایی جهت تعیین HOMA-IR در ۸۰- نگهداری شد. اندازه‌گیری انسولین به روش ELISA و با کیت ساخت شرکت Millipore با حساسیت اندازه‌گیری 1 ng/ml، catalog number: # EZRMI-13K و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. غلظت گلوکز با روش آنزیماتیک گلوکز اکسیداز با کیت شرکت پارس آزمون اندازه‌گیری گردید. مقادیر HOMA-IR با استفاده از فرمول زیرمحاسبه گردید [۴۱]:

HOMA-IR=Insulin [µU/ml]*Glucose [mmol/l]/22.5

واجد بودن شرایط مقاومت انسولین منوط به داشتن دو شرط بود: ۱- مقادیر HOMA-IR بالاتر از ۲/۵ [۴۱] و ۲- مقادیر انسولین ناشتایی بالاتر از pmol ۱۶۰ [۴۱] و تنها رت‌هایی که شرایط فوق را دارا بودند در تجزیه و تحلیل نهایی وارد شدند.

استخراج نمونه

۲۴ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی رت‌ها بوسیله تزریق درون صفاقی کتامین (۹۰ mg/kg) و زایلازین (۱۰mg/kg) بی‌هوش و عضلات نعلی و EDL بلافاصله استخراج و در نیتروژن ۸۰- منجمد و برای تجزیه و تحلیل بعدی نگهداری شد.

تهیه و آماده‌سازی بافت

حدود ۲۰۰-۱۵۰میلی‌گرم از عضلات جهت استخراج غشا سلولی با روش هاون کوبی پودر گردید. سپس بافت را در بافر A متشکل از ۴۰mM NaCl، ۳۰ mM Hepes، ۲۵۰ mMsucrose, mM phenylmethylsulphonyl ,2fluoride [PMSF] و PH=۷/۴ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد هموژن و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه در g ۱۰۰۰ سانتریفیوژ شدند تا مواد RBC از بافت جدا شوند. سوپرناتانت برداشته شد و به مدت سه ساعت با سرعت g ۲۳۰۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتریفیوژ شد تا پروتئین‌های انقباضی جدا شود و pellet جمع‌آوری شد و در ۲۰۰ لاندا از بافر B متشکل از ۱۰ mMTris، ۴٪ SDS، ۲ mMEDTA، ۲ MPMSF، PH=۷/۴ و محصول نهایی جهت برداشت اجزای نامحلول در دمای اتاق g ۱۱۰۰ سانتریفیوژ، سوپرناتانت برداشته و در دمای ۸۰- نگهداری شد. جهت تعیین غلظت پروتئین، نمونه‌ها با استفاده از روش برادفورد و bovineserumalbumin (BSA) به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت [۱۲،۳۱].

آنتی‌بادی‌ها

هر دو آنتی‌بادی از شرکت abcam که مشخصات آن در جدول ۳ ارائه گردیده است، خریداری شدند.

وسترن بلاتینگ

میزان ۳۰ میکروگرم پروتئین در هر چاهک ریخته شد و جداسازی پروتئین با استفاده از تکنیک SDS–PAGE با ژل ۱۲ درصد انجام گرفت و پروتئین‌های جدا شده به غشای PVDF انتقال داده شدند. سپس مرحله blocking غشاء با محلول محتوی ۱ m NaCL۱، ۱۰ m M TRIS-BASE، ۰/۱٪ Tween-۲۰، PH= ۷/۴ به مدت ۲ ساعت خوابانده شد، سپس غشاء در طول شب در محلول محتوی آنتی‌بادی اولیه با غلظت mg/mL ۲ که در بافر محتوی BSA ۱٪، low fat dry milk ۰/۵٪ رقیق شده بود، قرار گرفت. پس از

انجام شستشوی غشا جهت رفع آنتی‌بادی‌های غیر متصل، غشا در معرض آنتی‌بادی ثانویه HRP شده قرار گرفت و مجدداً به وسیله آب مقطر، ۱ m NaCL، ۲۰-Tween ۰/۵٪ شسته شد. سپس بیان پروتئین با استفاده از روش ECL (آمرشام) اندازه‌گیری شد. غشا در معرض فیلم رادیوگرافی قرار گرفت و ظهور باندها بر روی فیلم در تاریک‌خانه به انجام رسید. از تکنیک Dens itometric Scanning (نرم‌افزار j image) چگالی باندهای NHE۱ و NBC ۱ تعیین شد و جهت نیمه کمی کردن پروتئین‌های NHE۱ و NBC ۱ از میزان پروتئین erythrocyte ghosts برای NHE ۱ و یکی از نمونه‌های NBC ۱استفاده گردید [۱۲،۳۱].

تجزیه و تحلیل آماری

بعد از این که نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون K –S تأیید شد، جهت تعیین معنی‌دار بودن تفاوت متغیرها بین گروه‌های تحقیق از آزمون آماری ONE WAY ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey استفاده گردید. مقدار α در تمامی مراحل برابر با ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

وزن بدن

تغییرات وزن بدن در شکل ۱ گزارش شده است. کاهش اندک در وزن بدن در هفته بعد از تزریق STZ در گروه‌های دیابتی مشاهده و بعد از آن روند افزایش وزن در تمامی گروه‌ها به صورت طبیعی ادامه یافت. بعد از گذشت ۴ هفته از زمان شروع مصرف غذای پرچرب توسط گروه‌های دیابتی، اختلاف وزن بین گروه کنترل دیابتی و سایر گروه‌ها معنی‌دار شد و این اختلاف تا پایان تحقیق ادامه داشت.

تاثیر STZ و غذای پر چرب بر متغیرهای متابولیک

جدول ۴ تأثیر STZ و غذای پرچرب بر متغیرهای متابولیک را نشان می‌دهد. همچنین نتایج گلوکز خون پلاسما قبل و بعد از اجرای پروتکل تمرینی در شکل ۲ آورده شده است. نتایج تست تأیید دیابت قبل از شروع تحقیق افزایش معنی‌دار سطح گلوکز خون (Pre glucose) در گروه‌های دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم را نشان داد (P</۰۰۱). نتایج آزمون HOMA-IR نیز در پایان تحقیق اختلاف معنی‌دار بین سطوح گلوکز خون پلاسما بین گروه‌های دیابتی و گروه کنترل سالم را نشان داد (شکل ۳) (P</۰۰۱).

همان طور که در جدول ۴ نشان داده شده است اختلاف معنی‌دار بین سطوح انسولین پلاسما گروه کنترل دیابتی و دو گروه دیگر (P<۰/۰۵) بدست آمد (شکل ۲) (P<۰/۰۵). همچنین مقادیر HOMA-IR index در دو گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم افزایش معنی‌دار داشت (P</۰۰۱)، ضمن این که بین دو گروه دیابتی نیز اختلاف معنی‌دار مشاهده شد (P</۰۱).

محتوی پروتئین‌ها

تمامی تغییرات محتوی پروتئینی NHE۱ و NBC ۱ در گروه‌های دیابتی مورد مطالعه نسبت به گروه کنترل سالم استاندارد شدند. آنتی‌بادی NHE۱ یک باند را در عضلات رت هموژن شده به وزن ۹۲ KDA شناسایی نمود همچنین این باند برای NBC ۱ ۱۲۰ KDA, توسط آنتی‌بادی مربوطه شناسایی گردید. میزان کاهش محتوی NHE ۱ در گروه کنترل دیابتی در عضله نعلی و EDL به ترتیب ۳۴ و ۳۲ درصد بود (شکل ۴) در حالی که کاهش محتوی پروتئینی NBC ۱ در گروه کنترل دیابتی در عضله نعلی و EDL به ترتیب ۲۴ و ۱۳ درصد بود (شکل ۵). اختلاف معنی‌دار بین محتوی پروتئینی NHE ۱ گروه تمرینی دیابتی و کنترل دیابتی در عضله EDL یافت شد (شکل ۴) (P<۰/۰۵).

به هر حال افزایش محتوی پروتئینی NHE ۱ در گروه تمرینی دیابتی نسبت به کنترل دیابتی در عضله نعلی معنی‌دار نبود (شکل ۴) (P<۰/۰۵) همچنین علی‌رغم افزایش محتوی پروتئینی NBC ۱ گروه تمرینی دیابتی نسبت به کنترل دیابتی، این اختلاف در هر دو عضله نعلی و EDL معنی‌دار نبود (شکل ۵) (P<۰/۰۵).

جدول ۱- ترکیب غذای پرچرب و عناصر تشکیل دهنده آن

عناصر تشکیل دهنده	گرم / کیلو گرم
پودر غذای طبیعی رت	۳۶۵
روغن گیاهی	۳۱۰
کازئین	۲۵۰
کلسترول	۱۰
ویتامین و مواد معدنی	۶۰
متیونین	۳
کلراید سدیم	۱
جوش شیرین	۱

جدول ۲- مشخصات پروتکل تمرینی

زمان	آشناسازی ۵ روز	هفته ۱	هفته ۲	هفته۳	هفته۴	هفته۵	هفته ۶	هفته۷
سرعت [m/min]	۱۵	۲۰	۲۰	۲۵	۲۵	۳۰	۳۰	۳۰
مدت [min]	۲۰	۲۰	۲۵	۲۵	۳۰	۳۰	۳۵	۳۵

جدول ۳- مشخصات آنتی‌بادی‌های مورد استفاده در تحقیق

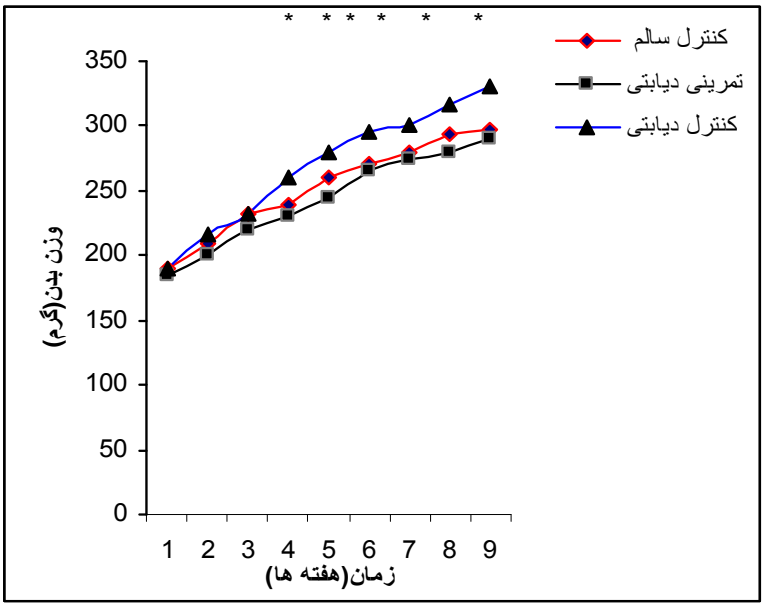
کاربرد	واکنش	کد شناسایی	آنتی بادی اولیه
وسترن بلاتینگ	انسان، رت	ab ۳۰۳۲۲	NHE۱
وسترن بلاتینگ	انسان، رت	ab ۶۷۳۱۳	NBC۱

جدول ۴- مشخصات آنتروپومتریک و متابولیک گروه‌های تحقیق

گروهها	کنترل سالم	کنترل دیابتی	تمرین دیابتی
وزن [g]	۲۹۹/۷ ± ۳۰/۸۱ †	۳۳۱/۷ ± ۱۸/۱۴ *	۲۹۱/۱۷ ± ۲۵/۲۱ **
گلوکز[ng/dl]	۱۰۶/۴ ± ۹/۲۶ †	۳۹۴/۴۴ ± ۴۸/۷۴ *	۳۰۱/۷ ± ۴۷/۹۵ *,†
انسولین [µU/ml]	۶/۲۵ ± ۱/۱۵ †	۱۰/۵۵ ± ۱/۱۲*	۸/۹۵ ± ۰/۷۸ *,†
شاخص HOMA	۱/۶۲ ± ۰/۲۴†	۱۰/۴۸ ± ۱/۴۴ *	۶/۶۸ ± ۱/۳۱ *,†

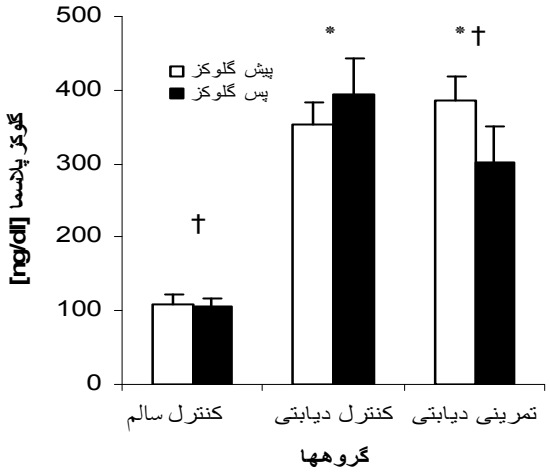
* اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل سالم (P<۰۵/)،

† اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل دیابتی (P<۰۵/)، [کنترل سالم (n=۷) ، دیابتی (n=۹)، تمرین دیابتی (n=۹)]



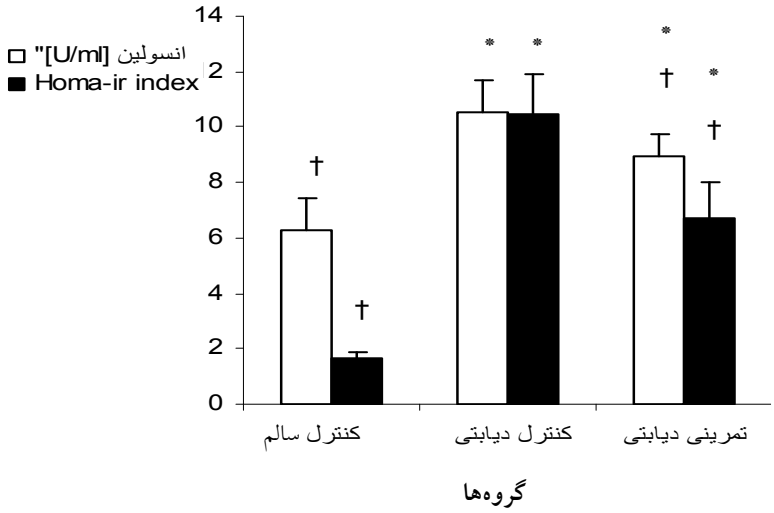
*اختلاف معنی‌دار گروه کنترل دیابتی با سایر گروه‌ها (P<۰۵)، [کنترل سالم (n=۷)، دیابتی (n=۹)، تمرین دیابتی (n=۹)]

شکل ۱- تغییرات وزن بدن در گروه‌های مختلف تحقیق



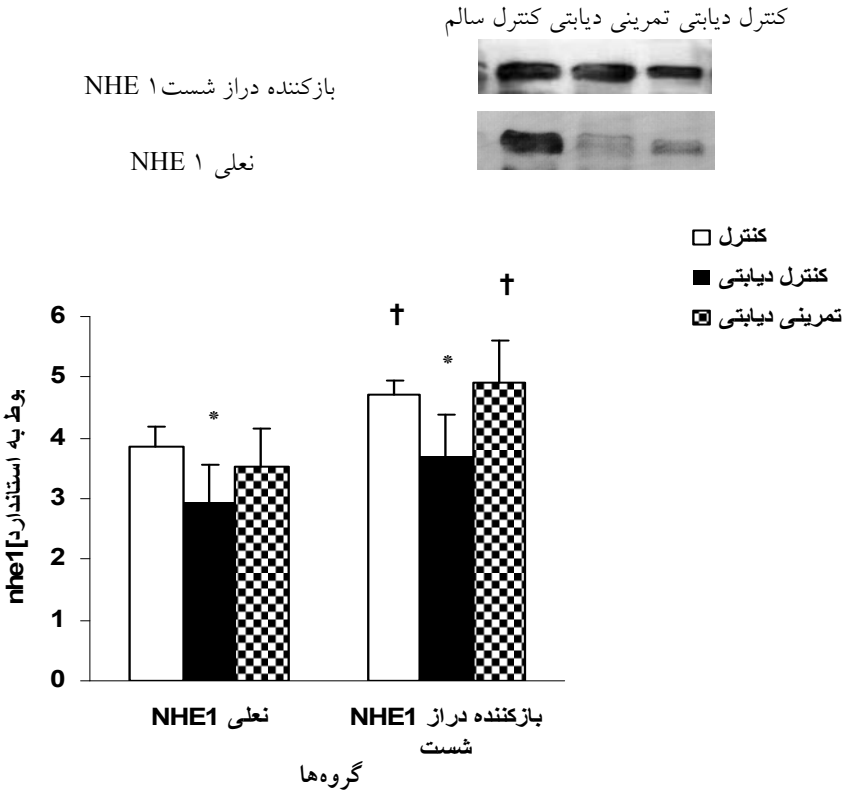
*اختلاف معنی دار با گروه کنترل سالم (P< ۰/۰۵)، † اختلاف معنی دار با گروه کنترل دیابتی (P< ۰/۰۵)

شکل۲- تغییرات گلوکز پلاسما قبل و بعد از پروتکل تمرینی



*اختلاف معنی دار با گروه کنترل سالم (P< ۰/۰۱)،†اختلاف معنی دار با گروه کنترل دیابتی (P< ۰/۰۱)

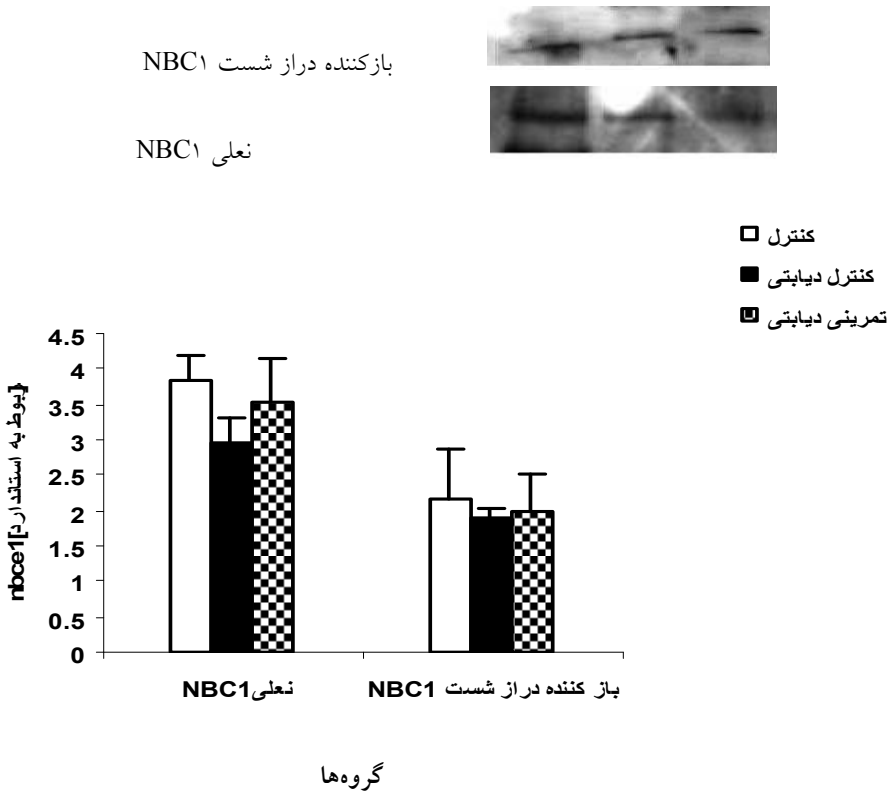
شکل ۳- نمودار تغییرات انسولین پلاسما و index ir-homa



.کنترل سالم (N=۶)، کنترل دیابتی (N=۶) و تمرینی دیابتی (N=۶)

*اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل سالم (P< ۰/۰۵)،† اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل دیابتی (P< ۰/۰۵)

شکل ۴- میزان بیان پروتئین ۱ NHE در عضلات اسکلتی گروه‌های تحقیق (P<۰/۰۵)



.کنترل سالم (N=۶)، کنترل دیابتی (N=۶) و تمرینی دیابتی (N=۶)

شکل ۵- بیان میزان پروتئین NBC۱ در عضلات اسکلتی گروه‌های تحقیق (P</۰۵)

بحث

توانایی تنظیم PH درون سلولی عضله بستگی به مجموع همه سیستم‌های تنظیم کننده PH دارد که شامل سیستم‌های NHE, NBC, MCT, NBCE و AE[1] می‌باشد. در مطالعه حاضر مدل مقاومت به انسولین به عنوان دیابت نوع دو مورد استفاده قرار گرفت که عملکرد برخی از این ترانسپورترها را در شرایط کتواسیدوز دیابتی مورد ارزیابی قرار دهد. تحقیق حاضر اولین تحقیقی است که اثرات بلند مدت تمرین استقامتی را بر محتوی NHE۱ و NBC ۱ در عضلات اسکلتی رت در شرایط دیابتی نوع دو مورد مطالعه قرار می‌دهد. هرچند ایجاد شرایط مطلوب دما ۲۲ درجه (دما بین ۲۲ تا ۲۶ درجه متغیر بود) و کنترل مواد معدنی در غذای گروه‌های کنترل و تمرینی سالم (متاثر در فرایند هضم و جذب) از جمله محدودیت‌های این تحقیق به شمار می‌رود اما تغییرات وزن، گلوکز خون، سطح انسولین و شاخص مقاومت به انسولین HOMA-IR INDEX در گروه‌های دیابتی همگی دلالت بر این داشت که مدل دیابت نوع دو به درستی اعمال گردیده است. در مجموع نتایج تحقیق نشان داد که محتوی پروتئینی NHE۱ و NBC۱ در شرایط دیابت نوع دو نسبت به شرایط طبیعی کاهش می‌یابد و تمرین استقامتی می‌تواند از میزان کاهش محتوی این پروتئین‌ها جلوگیری نماید.

در تحقیق حاضر کمتر بودن میزان محتوی NHE ۱ در عضلات اسکلتی نعلی و EDL در گروه کنترل دیابتی مشاهده شد. میزان کاهش محتوی پروتئینی NHE ۱ در عضله نعلی و EDL به ترتیب ۳۲ و ۳۴ درصد بود که دلالت بر این دارد که محتوی NHE ۱ تحت تأثیر تغییرات متابولیکی واقع شده است که با نتایج تحقیق Feuvray و Maynard [۲۶،۳۸] که در آن به کاهش محتوی ترانسپورترهای غشا در اثر دیابت نوع دو اشاره کرده‌اند هم راستاست. کاهش محتوی پروتئینی NHE۱ در گروه کنترل دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم و افزایش محتوی این پروتئین در گروه تمرینی دیابتی نشان داد که تمرین

1- Anion exchanger

استقامتی می‌تواند بر متغیرهای متابولیکی ناشی از دیابت (افزایش لاکتات، انسولین و گلوکز) فایق آید. اما نتیجه دیگر این که الگوی افزایش تغییرات در بین تارهای کند و تند عضلات متفاوت بود. به گونه‌ای که این افزایش محتوی پروتئینی NHE۱ در عضله EDL گروه تمرینی دیابتی نسبت به گروه کنترل دیابتی معنی‌دار بود اما در عضله نعلی گروه تمرینی دیابتی این افزایش معنی‌دار نبود. در همین راستا Juel و همکاران نشان دادند که اثر تمرین تناوبی شدید بر میزان بیان محتوی پروتئینی NHE۱ در عضلات تند گلیکولیتیکی در مقایسه با عضلات کند اکسیداتیوی متفاوت است و این پروتئین در تارهای گلیکولیتیکی بیشتر بیان شده است [۱۲]. البته علت این افزایش را می‌توان به ویژگی این ترانسپورتر و نوع تمرین نسبت داد. در حقیقت NHE ۱ به تغییرات PH_i به شدت حساس بوده [۱۲] و تمرین با شدت بالا موجب تجمع بیش از حد پروتون و کاهش PH_i می‌گردد و از آنجایی که عضلات گلیکولیتیکی نسبت به عضلات اکسیداتیوی اسید لاکتیک بیشتری تولید می‌کنند [۱۲] این پروتئین در این عضلات بیشتر بیان شده است تا بتواند پروتون بیشتری را از سلول خارج سازد و به تنظیم و کنترل PH کمک نماید. به هر حال Dela و همکاران نشان دادند که در تمرینات قدرتی به علت داشتن وهله‌های استراحتی تجمع پروتون افزایش نمی‌یابد در نتیجه این گونه تمرینات محتوی پروتئینی NHE۱ را افزایش نمی‌دهند [۳۵]. بنابر این به نظر می‌رسد حساسیت به پروتون و تغییر PH_i مهم‌ترین محرک NHE۱ است. همچنین میزان کاهش محتوی پروتئینی NBC۱ در گروه کنترل دیابتی در عضله نعلی و EDL به ترتیب ۲۴ و ۱۳ درصد بود و تمرین استقامتی محتوی پروتئینی این ترانسپورترها در گروه تمرینی دیابتی در هر دو عضله نعلی و EDL افزایش غیر معنی‌دار داد. به هر حال میزان افزایش در عضله نعلی نسبت به EDL بیشتر بود. این میزان افزایش بیشتر در عضله نعلی با تحقیق Thomas و همکاران هم راستاست .آنها نشان دادند که در اثر تمرین تناوبی شدید محتوی پروتئینی NBC۱ در عضله نعلی افزایش معنی‌دار می‌یابد ولی محتوی این پروتئین در عضله EDL تغییر پیدا نمی‌کند و این افزایش را به ویژگی تمرین نسبت دادند که موجب می‌شود NBC۱ به عضلات اکسیداتیو در تنظیم PH کمک نماید [۲۵]. هرچند Juel و همکاران [۱۲] نشان دادند که NBC۱ توزیعی وابسته به تار ندارد و در همه تارها یکسان بیان می‌شود، اما نتایج تحقیق Thomas و همکاران با توجه به شدت تمرین گمراه کننده است. یکی از علت‌هایی که می‌توان به عدم وجود اختلاف معنی‌دار در افزایش NBC۱ در عضلات نعلی و EDL اشاره کرد حضور دیگر ترانسپورترها علاوه بر این ترانسپورتر و همچنین سیستم‌های دفاعی دیگر در تنظیم و کنترل PH_i است. افزایش محتوی پروتئینی دیگر ترانسپورترها و همچنین ظرفیت بافرینگ سلول نسبت به تنوع شدت‌های تمرین مؤید این موضوع می‌باشد [۱۲،۲۵،۳۲،۳۷،۴۲،۴۳]. به طور خلاصه نتاج تحقیق نشان داد که محتوی پروتئینی NHE۱ و NBC ۱ در عضلات رت‌های دیابتی کاهش قابل ملاحظه دارد و تمرین استقامتی می‌تواند این کاهش را جبران و به سطوح نرمال نزدیک کند. همچنین الگوی بیان محتوی پروتئینی این ترانسپورترها در عضلات اسکلتی مختص تار عضلانی است که از لحاظ متابولیکی با یکدیگر متفاوتند. تحقیقات بعدی بر روی دیگر ایزوفرم‌ها، ترانسپورترها و سیستم بافرینگی که در کنترل PH_i نقش دارند، می‌تواند به عنوان پیشنهاداتی جهت تعیین و درک هر چه بیشتر مکانیزم‌های کنترل و تنظیم PH_i در شرایط دیابت نوع دو به شمار رود [۴۲-۴۴].

سپاسگزاری

نویسندگان بدینوسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از صندوق حمایت از پژوهشگران کشور (ریاست جمهوری) به جهت حمایت مالی از تحقیق حاضر، شرکت دام و طیور کانی دام و مؤسسه واکسن‌سازی و سرم‌سازی رازی کرج به جهت همکاری در تهیه غذای پر چرب ابراز می‌دارند.

مأخذ

۱. گائینی، عباسعلی؛ رجبی، حمید. آمادگی جسمانی. انتشارات سمت؛ ۱۳۸۲. ۶۱-۵۸.

۲. برابادی، زهرا. بررسی اثر انسولین از طریق کانال‌های پتاسیمی حساس به ATP بر جریان خون پوستی در حیوانات سالم و دیابتی در حضور و عدم حضور NO در شرایط ورزش. پایان‌نامه ارشد. دانشگاه تربیت مدرس؛ ۱۳۸۶. ۶۸-۶۵.

3. Gerald I , Shulman.Cellular Mechanisms of Insulin Resistance. *Journal of Clinical Investigation* 2000; 106:171-6.
4. Soleimani M , Barnhan CE. Na: HCO3 cotransporter [NBC]: Cloning and Characterization. *J Membrane Biol183* 2001; 71-84.
5. Wiederkebr M , Krapt R. Metabolic and Endocrine Effect of Metabolic Acidosis in Humans. *Swiss Medwkly* 2001; 131: 127-132.
6. Giri M. Medical Management of Obesity. *Acta Clinica Belgica* 2006; 286-294.
7. Pan X, Li GW, Hu Yh. Effect of Diet and Exercise in Preventing NIDDM in People With Impaired Glocuse Tolerance. *Diabetes Care* 1997; 20: 537-544.
8. Van ZD. Diagnosis and Treatment of Diabetic Ketoacidosis. *SA FAMPRAC* 2008; 50: 35-40.
9. Messonnier L.Importance of pH regulation and lactate/H_ transport capacity for work production during supramaximal exercise in humans. *J Appl Physiol* 2007; 102: 1936–1944.
10. Juel C. Muscle PH regulation : role of training. *Acta physiol scand* 1998;162:359-366.
11. Juel C. Regulation of PH in Human Skeletal Muscle: Adaptaion to Physical Activity. *Acta Physiol* 2008; 193: 17-24.
12. Juel C. Expression of The Na/H Exchanger Isoform NHE1 in Skeletal Muscle and Effect of Training. *Acta Physiol Scand* 2000;170:59-63.
13. Dieter B , Carola K. Extracellular Bicarbonate and Nonbicarbonate Buffering against lactic acid during and after exercise. *Eur appl physiol* 2007;99:163-171.
14. Charles TP, Norman LJ , George JFH. Effects of short-term training on plasma acid–base balance during incremental exercise in man. *J Physiol* 2003; 550.2: 585–603.
15. Johann E, David B, Carmel G. The effects of training intensity on muscle buffer capacity in females. *Eur J Appl Physiol* 2006; 96: 97–105.
16. David B, Edge J , Goodman C .Muscle buffer capacity and aerobic fitness are associated with repeated –sprint ability in women. *Eur J appl physiol* 2004; 92:540-547.
17. Boning D , klarhola C .causes of differences in exercise-induced changes of base excess and blood lactate. *Eur appl physiol* 2007; 99:163-171.
18. Puceat M. PHi regulatory ion transporters: An Update on Structure, Regulation and Cell Function Clms. *Cell Mol Lifesci* 1999; 55: 1216-1229.
19. Alan RS , Ronald K. Insulin Signalling and The Regulation of Glocuse and Lipid Metabolism. *Nature* 2001; 414:799-806.
20. Federico GST,Elisabeth VM .Effect of physical activity and weight loss on skeletal muscle mithochondria and relationship with gloucose control in type2 diabetes. *Diabetes* 2007; 56: 2142-2147.
21. Juel C. effect of high-intensity exercise training on lactate/H transport capacity in human skeletal muscle. *American physiological society* 1999; 255-261.
22. Juel C, Klarskov C, Nielsen JJ, Krustrup P ,Bangsbo J. Effect of high-intensity intermittent training on lactateand H+ release from human skeletal muscle. *Am J PhysiolEndocrinol Metab* 2004; 286: E245–E251.
23. Dubouchaud H, Butterfield GE, Wolfel E, Bergman BC , Brooks GA. Endurance training, expression, and physiology ofLDH, MCT1, and MCT4 in human skeletal muscle. *Am J Physiol* 2000; 278: E571–E578.
24. Pilegaard H, Domino K, Noland T, Juel C, Hellsten Y, Halestrap AP , Bangsbo J. Effect of high intensity exercise training on lactate/H+ transport capacity in human skeletal muscle. *Am J Physiol* 1999; 276: E225–E261
25. Thomas C, Bishop D, Moore-Morris T, and Mercier J. Effect of High- Intensity Training on MCT1, MCT4 and NBC Expressions in Rat Skeletal Muscles:Influwnce of Chronic Metabolic Alkalosis. *Am J Physiol Endocrinol Metabol* 2007; 293: E916-E922.
26. Maynard T. Physiological response to exercise in diabetes mellitus. *Diabetes Educ* 1991; 17: 196-206.
27. Horton ES. Exercise and diabetes mellitus. *Med Clin North* 1988; 72:1301-132134.
28. Rodnick J, Piper RC, Slot JW , James DE. Interaction of insulin and exercise on glucose transport in muscle. *Diabetes Care* 1992; 15: 1679-1689.
29. Armstrong JJ. A brief overview of diabetes mellitus and exercise. *Diabetes Educ* 1991; 17: 175-178.
30. Dela F, Holten M , Juel C. Effect of resistance training on Na,K-pump and Na+/H+ exchange protein densities in muscle from control and patients with type 2 diabetes. *Eur J Physiol* 2004; 447:928–93.
31. Juel C, Mads KH , Dela F. Effect of Strenght Training on Muscle Lactate Release and MCT1 and MCT4 Content in Healthy and Type 2 Diabetic Humans. *J Physiol* 2004; 55: 1: 297-304.

۳۲. نیکویی، روح الله. تعدیل کاهش بیان ژن MCT1 و MCT4 در عضلات اسکلتی رت‌های دیابتی نوع ۲ متعاقب تمرین استقامتی. *مجله دیابت و لیپید ایران*؛ ۱۳۸۹. ۸۹-۸-۵۷۹

33. Gerald I , Shulman N .Cellular Mechanisms of Insulin Resistance. *Journal of Clinical Investigation* 2000; 106:171-6.
34. Juel C. Training-induced changes in membrane transport proteins of human skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol* 2006; 96: 627–63.
35. Juel C. Skeletal muscle Na/H exchanger in rats: PH dependency and effect of training. *Acta Physiol Scand* 1998; 164: 135-140.
36. Viswanad KB, Lydia A, Ramarao P. Combination of High-Fat-Diet-Fed and Low-Dose Streptocin-Treated Rat: A Model for Type 2 Diabetes and Pharmacological Screening Srinivasan. *Pharmacological Research* 2005; 52: 313-32.
37. Bonen A, McCullagh KJ, Putman CT, Hultman E, Jones NL , Heigenhauser GJ. Short-term training increases humanmuscle MCT1 and femoral venous lactate in relation to muscle lactate. *Am J Physiol* 1998; 274: E102–E107.
38. Feuvray D. The regulation of intracellular pH in the diabetic myocardium. *Cardio vascular Research* 1997;34: 48–54.
39. Brooks GA , White TP. Determination of metabolic and heart rat responses of rats to treadmill exercise. *J Appl Physiol* 1978; 45: 1009–1015.
40. Norten A. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice:practical implications for exercise training. *EUR Society of Cardiology* 2007; 14: 753-760.
41. Sharma AK, Srinivasan BP. Triple verses glimepiride plus metformin therapy on cardiovascular risk biomarkers and diabetic cardiomyopathy in insulin resistance type 2 diabetes mellitus rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009; 38: 433–444.
42. Weston AR, Myburgh KH, Lindsay FH, Dennis SC, Noakes TD , Hawley JA. Skeletal muscle buffer capacity and endurance performance after high-intensity interval training by well-trained cyclists. *Eur J Appl Physio* 1997; 75: 7–13.
43. Mannion AF, Jakeman PM, Willan PLT. Effects of isokinetic training of the knee extensors on high-intensity exercise performance and skeletal muscle buffering. *Eur J Physiol* 1994; 68: 356-361.
44. Parkhouse WS , McKenzie DC. Possible contribu tion of skeletal muscle buffer to enhanced anaerobic per- formance: a brief review. *Med Sci Sports Exer* 1984; 16: 328–338.