مجله دیابت و متابولیسم ایران. خرداد- تیر ۱۳۹۹؛ دوره ۱۹ (شماره ۵) ۳۰۳-۲۹۰

مقاله پژوهشی

تأثیر تمرین تناوبی شدید و مصرف عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه بر بیان ژن PPARα وPPARγ در بافت پانکراس رت‌های نر مبتلا به دیابت نوع دو

بهاره غنی*[1]، مهسا محسن‌زاده[1]، فواد فیض الهی[1]

چکیده

مقدمه: اگرچه برخی مطالعات، سازوکار عملکرد سلول‌های‌های بتا را در مدل‌های حیوانی و کم و بیش در جمعیت‌های انسانی مطالعه نموده‌اند، اما تاکنون نقش ورزش درمانی یا اجرای فعالیت ورزشی HIIT همراه با مصرف مکمل انگور سیاه بر بیان ژن‌های درگیر در سلول‌های بتای پانکراس کمتر مطالعه شده است، لذا هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی اثر هشت هفته تمرین تناوبی شدید همراه با مصرف مکمل انگور سیاه بر میزان بیان ژن PPARα و PPARγ در بافت پانکراس رت‌های نر مبتلا به دیابت نوع دو است.

روش‌ها: مطالعه در قالب یک طرح تجربی انجام شد. آزمودنی‌های این طرح را ٤٠ رت نر ٨ ماهه با میانگین وزنی ۲۵۰ گرم تشکیل دادند. پس از آشنایی آزمودنی‌ها با تمرین و القاء دیابت توسط STZ به‌صورت تصادفی در ۵ گروه شامل تمرین، مکمل، تمرین و مکمل، کنترل دیابتی و کنترل پایه تقسیم شدند. پس از ٨ هفته تمرین که ۵ جلسه در هفته و به‌مدت ٨ هفته که فعالیت بر روی نوارگردان با شدت٩٠٪ Vo2max و مکمل‌دهی عصاره‌ی هسته‌ی انگور سیاه بود، میزان ژن‌های PPARα و PPARγ بعد از استخراج RNA از پانکراس و سنتز cDNA اندازه‌گیری شد. میزان ژن PPARα و PPARγ با روش PCR Time-Real مورد سنجش قرار گرفت. داده‌ها با استفاده از آزمون t مستقل و تحلیل واریانس دو عاملی در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ٢٤ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: اثر تمرین به همراه مصرف عصاره‌ی دانه انگور سیاه بر بیان ژن‌های PPARγ و PPARα در پانکراس رت‌های دیابتی معنادار نبود، اما تمرین به تنهایی سبب افزایش معنادار بیان ژن PPARα در بافت پانکراس نمونه‌های دیابتی شد. همچنین مصرف عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه نیز به تنهایی موجب افزایش معنادار بیان ژن‌های PPARγ و PPARα شد.

نتیجه‌گیری: به‌نظر می‌رسد تنظیم بیان ژن‌های PPARα و PPARγ از طریق تمرین و مصرف عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه احتمال دارد منجر به بهبود و حفظ عملکرد سلول‌های بتای پانکراس در رت‌های دیابتی شود.

واژگان کلیدی: دیابت، تمرینات تناوبی شدید(HIIT)، عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه، پروتئین PPARα، پروتئین PPARγ، پانکراس

۱- گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحدکرج ، تهران، ایران

***نشانی:** کرج، انتهای رجایی شهر، تقاطع بلوار موذن و استقلال، مجتمع دانشگاهی امیرالمونین، کدپستی: ۳۱٤۹۹٦۸۱۱۱، تلفن: ۰۲٦۳٤۲۵۹۵۷۱، نمابر: ۳٤٤۱۸۱۵٦، پست الکترونیک: bahar1986.gh@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۳۰ **تاریخ درخواست اصلاح:** ۱۳۹۹/۰۳/۰۲ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۹/۰۴/۲۰

مقدمه

دیابت نوع دو (T2DM)، بیماری ناشی از اختلال هموستاز گلوکز است که براساس تخمین، بین ۲۰۰ تا ۲۵۰ میلیون نفر در سراسر جهان به آن مبتلا هستند. پاتوژنز T2DM شامل مقاومت به انسولین محیطی و ترشح انسولین ناکارآمد از سلول β پانکراس است. تحقیقاتی که تاریخچه‌ی طبیعی این بیماری را نشان می‌دهند، دو نقش را برای سلول β پانکراس مشخص کرده‌اند. اول اینکه افراد در معرض خطر یک گرایش ذاتی به سمت شکست سلول β دارند. بنابراین، این افراد مستعد توسعه‌ی دیابت در محیطی هستند که حساسیت به انسولین در معرض خطر قرار دارد. وضعیت چاقی و کاهش حساسیت به انسولین محیطی منجر به افزایش سطح سرمی گلوکز، آدیپوسایتوکین‌ها و اسیدهای چرب آزاد و همچنین سایر مواد واسطه‌ی چربی مضر می‌شوند. این واسطه‌های سمی با استفاده از چند سازوکار متقاطع از جمله استرس اکسیداتیو، اختلال عملکرد میتوکندری، اختلال در تنظیم اپی ژنیک و فعال‌سازی مسیرهای تنش رتیکولوم اندوپلاسمیک به سلول β آسیب می‌رسانند. درحالی‌که هم پوشانی بزرگی بین بسیاری از این فرآیندها وجود دارد، آخرین مسیر متداول به اختلالات عمکرد و مرگ سلول β می‌انجامد. بنابراین، مؤلفه‌ی دوم این الگو این است که محیط متابولیک تغییر یافته T2DM منجر به شکست پیشرونده‌ی سلول β و از دست دادن توده‌ی عملکردی سلول β در طول زمان می‌شود. با توجه به این درک گسترده و در حال رشد از نقش سلول β در پاتوژنز T2DM، نیاز بالینی برای شناسایی راهبردهای درمانی و اهداف دارویی وجود دارد تا از توسعه‌ی دیابت در افراد در معرض خطر ژنتیکی یا غیرژنتیکی جلوگیری کند. علاوه بر این، یک نیاز موازی برای حفظ عملکرد و توده‌ی سلول β1 در افراد تحت تأثیر وجود دارد [۱]. گیرنده‌های فعال‌کننده‌ی تکثیر پراکسیزوم (PPARs)، گروهی از گیرنده‌های هورمونی درون هسته‌ای هستند که حاوی سه نوع ایزوتیپ مختلف α، β/δ و γ بوده که عملکردشان در سطح رونویسی است.

PPARα هدف اصلی داروهای فیبراتور است (کلافیبرات، ژمفیبروزیل، سایپروفیبرات و فنوفیبرات). آنها برای اختلالات کلسترول و اختلالات سطح کلسترول بالا نشان داده شده‌اند. PPARα، در عضلات اسکلتی و کبد، جایی که در بدن، اسیدهای چرب تجزیه و انتقال پیدا می‌کنند، تولید می‌شود. PPARα نقش حیاتی در کاهش التهاب هم در دیواره‌ی عروق و هم در کبد بازی می‌کنند [۲]. PPARγ به‌طور عمده در بافت چربی بیان شده است، اما در بافت‌های دیگر نیز وجود دارد. آگونیست‌های مصنوعی PPARγ، تیازولیدین‌ها، برای بهبود تحمل گلوکز از طریق افزایش حساسیت به انسولین و بازگرداندن عملکرد سلول‌های بتا در افراد دیابتی توسعه یافته‌اند. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد آگونیست‌های PPARγ به‌طور مستقیم ژن‌های سنجش گلوکز را در کبد و سلول‌های β پانکراس را فعال می‌کنند. این اطلاعات دخالت مستقیم کبد و سلول‌های بتای پانکراس در بهبود هموستاز گلوکز در افراد مبتلا به دیابت نوع دو با استفاده از آگونیست‌های PPARγ را نشان می‌دهد [۳]. از طرفی نشان داده شده است که ترکیبات مغذی موجود در انگور نقش مهمی در سلامتی دارند [٤].

پروآنتوسیانیدین دیمر موجود در هسته‌ی انگور مؤثرترین ترکیب آنتی‌اکسیدان است. آنتی‌اکسیدان‌ها موادی هستند که با حضورشان در غذا یا بدن حتی در مقادیر بسیار کم، بدن را در برابر انواع مختلفی از آسیب‌های اکسیداتیو که ممکن است در اثر گونه‌های فعال اکسیژن ایجاد گردد، محافظت می‌کنند. استرس اکسیداتیو که عبارت از عدم تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و ظرفیت دفاع آنتی اکسیدانی بدن است، به‌شدت با دیابت و عوارض آن در ارتباط است، به‌طوری که نشان داده شده است که طی هر دو نوع دیابت یک و دو و حتی در غیاب عوارض دیابتی، استرس اکسیداتیو در خون افزایش یافته و درمان با آنتی‌اکسیدان‌هایی نظیر ویتامین E و ملاتونین منجر به کاهش عوارض دیابت گردیده است. با توجه به موارد ذکر شده، استفاده از عوامل آنتی‌اکسیدانی نقش به‌سزایی در کاهش عواقب ناشی از بیماری دیابت خواهد داشت و در این بین استفاده از ترکیبات با منشاء گیاهی که معمولاً با عوارض جانبی کمتری همراه است، اهمیت خاص خود را دارد [۵].

از طرفی دیگر تحقیقات مختلف نشان داده‌اند که فعالیت بدنی در پیشگیری از بیماری دیابت نوع دوم و همین‌طور مشکلات حاد تندرستی دیگر مثل بیماری قلبی عروقی و سرطان‌های خاص، نقش مهمی بازی می‌کند. بدیهی است که بیماری بیشتر افراد دارای دیابت نوع دوم، با عدم تحرک تشدید خواهد شد [٦]. طی سال‌های اخیر

نوع تمرین پرشدت تناوبی توجه زیادی را به خود معطوف ساخته است. انجام طولانی مدت تمرینات پرشدت، منجر به تشکیل یون های هیدروژن (H+) شده که منجر به اسیدوز در بدن و احتمالاً خستگی می‌شود. تحقیقات نشان داده‌اند که جایگزین نمودن تمرینات طولانی مدت با تمرینات کوتاه مدت اما پرشدت و تناوبی منجر به بهبود در پارامترهای هوازی می‌شود و خستگی را نیز به تأخیر می اندازد. هدف تمرینات پرشدت تناوبی اعمال فشارهای مکرر بر دستگاه‌های بدن است که به‌طور فیزیولوژیکی، منجر به سازگاری‌های کوتاه مدت و بهبود کارایی انرژی و متابولیکی در بدن می‌شود. نشان داده شده است که دو هفته تمرینات پرشدت می‌تواند عملکرد انسولین را در مردان جوان به‌طور معنادار بهبود بخشد. به‌طور مشابه در زنان نیز تمرینات پرشدت سه جلسه در هفته به‌مدت پانزده هفته در مقایسه با تمرینات پیوسته‌ی همسان، با کاهش معنادار در کل چربی بدن، چربی زیرپوستی پاها و تنه و مقاومت انسولینی مرتبط بود و به همین دلیل پیشنهاد شده است که تمرینات پرشدت می‌توانند شیوه‌ی مناسبی برای پیشگیری و بهبود چاقی و عوارض مرتبط با آن باشند [۷]. هنوز اثرات پروتئین‌های PPARα و PPARγ و نقش نوع فعالیت ورزشی در تنظیم این دو پروتئین به‌خوبی مشخص نشده است. همچنین نقش این پروتئین‌ها در انواع بیماری‌های مرتبط با چاقی مانند دیابت نوع دو، پُرفشاری خون، بیماری‌های قلبی و سرطان ناشناخته مانده است. بنابراین تحقیقات بیشتری بر روی پروتئین‌های PPAR آلفا و PPAR گاما در سلول‌های بتای بافت پانکراس مورد نیاز است. از طرفی محققان حاضر تاکنون پژوهش‌های بسیار کمی که تأثیر یک دوره تمرینات HIIT و عصاره‌ی دانه انگور سیاه بر تنظیم PPAR آلفا و PPAR گاما را بررسی کرده باشند مشاهده نموده‌اند. با توجه به نقش‌های بسیار مهم ذکر شده این دو پروتئین در بازسازی سلول‌های بتا در دیابت نوع دو و همچنین با توجه به اثرات ضد دیابتی پروآنتی سیانیدین در عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه، این پژوهش به‌دنبال پاسخ این سؤال است که آیا یک دوره تمرین‌های HIIT و مصرف عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه تأثیری بر بیان پروتئین‌های PPAR آلفا و PPAR گاما در سلول‌های بتای پانکراس موش‌های صحرایی دیابتی نوع دو دارد؟

روش‌ها

تحقیق از نوع بنیادی توسعه‌ای و به‌صورت تجربی انجام شد. جامعه ی آماری این مطالعه ۲۰۰ سر رت‌های نر ۸ هفته‌ای هستند که از انستیتو پاستور توسط آزمایشگاه هیستوژنیک در محدوده‌ی وزنی۲۵۰ گرم خریداری شدند. از بین جامعه‌ی آماری با توجه به هزینه‌های آزمایشگاهی، ٤٠ سر رت نر نژاد ویستار ۸ هفته به‌صورت تصادفی انتخاب شد. رت‌های مذکور در آزمایشگاه با درجه حرارت ۲۰- ۲۳ درجه سانتی‌گراد و چرخه‌ی روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعت و در رطوبت نسبی۵۰ درصد و تعداد هر سه راس رت در یک قفس پرورشی با آب و غذای استاندارد نگه‌داری شدند. همه‌ی جلسات تمرین عصرهنگام که بهترین زمان تمرین در ریتم فعالیت طبیعی رت‌هاست، انجام گرفت.٤٠ سر رت به شرح زیر به پنج گروه تقسیم شد: گروه تمرین، گروه مکمل، گروه تمرین و مکمل، گروه کنترل دیابتی، گروه کنترل پایه.

نحوه‌ی جمع‌آوری اطلاعات

رت‌ها به‌مدت یک هفته با شرایط داخل قفس و نحوه‌ی دویدن روی نوارگردان آشنا شدند. جهت آشناسازی رت با تمرین دو هفته و سه روز در هفته با سرعت ۱۰ متر در ثانیه تمرین داده شد. یک هفته پس از سازگاری با محیط آزمایشگاه، فرآیند دیابتی شدن آغاز شد که شروع آزمایشات تمرینی بعد از ٤٨ ساعت از القاء دیابت و نگه‌داری رت‌ها صورت گرفت.

دیابتی کردن رت‌ها با STZ

جهت دیابتی کردن حیوانات از داروی استروپتوزوتوسین ساخت شرکت سیگما استفاده شد که پس از یک هفته سازگاری حیوانات با محیط آزمایشگاه حیوانات تحت تزریق داخل صفاقی STZ که ٦٠ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن که در محلول نرمال سالین قرار گرفتند.

برنامه‌ی تمرین

پس از انتقال حیوانات به آزمایشگاه دو هفته زمان جهت آماده‌سازی و سازگاری آنها به تمرین تنظیم شد. در طول این دو هفته حیوانات

۲ روز در هفته با سرعت ۱۵ و ۲۵ متر بر دقیقه با دویدن روی تردمیل آشنا شدند. پس از سازگاری با محیط آزمایشگاه، روند دیابتی شدن صورت گرفت. ۹۶ ساعت پس از القاء دیابت رت‌ها به‌طور تصادفی به ۵ گروه و در هر گروه ۱۲ سر: گروه تمرین، گروه مکمل، گروه تمرین و مکمل، گروه کنترل دیابتی و گروه کنترل پایه تقسیم شدند. همچنین ۵ سر از رت‌ها به‌عنوان گروه آزمایشی برای اندازه‌گیری حداکثر سرعت دویدن روی نوارگردان (که معادل با حداکثر اکسیژن مصرفی VO2maxحیوان در نظر گرفته شد)، انتخاب شدند. برای برآورد حداکثر سرعت دویدن آزمون عملکرد ورزشی مدرج با شیب صفر درجه اجرا شد، که با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه آغاز و به ازای هر ۱ دقیقه ۱ متر بر سرعت تردمیل افزوده می‌شد تا زمانی که رت‌ها دیگر قادر به دویدن نباشند (واماندگی) که این سرعت معادل با سرعت رسیدن به VO2max در نظر گفته شده و شدت تمرین براساس آن کنترل می‌شد. پس از برآورد حداکثر سرعت، گروه HIIT و دیابتی HIIT ۵ جلسه در هفته و به مدت ۸ هفته به فعالیت برروی نوارگردان پرداختند. بعد از اینکه آزمودنی‌ها دیابتی شدند، آزمودنی‌های موش در گروه دیابتی HIIT و گروه HIIT چاق با پروتکل تمرین به‌مدت یک هفته آشنا شدند، سپس آزمودنی‌های این تحقیق برای مدت ۸ هفته، هر هفته پنج دور به فعالیت‌های تردمیل (نوارگردان) با شدت۹۰٪ Vo2max به‌طول ۱۵ تا ۳۰دقیقه و سرعت ۲۹ متر بر دقیقه در هفته اول و ۳۶ متر در دقیقه در از هفته آخر دویدند. زمان استراحت بین فواصل یک دقیقه بود. این کار پنج بار در هفته اولی و ۱۲ بار در هفته‌ی آخر تکرار شد. در این پروتکل موش‌ها ۵ دقیقه در ابتدا گرم کردند و در انتها ۵ دقیقه سرد کردند.

مکمل‌دهی ماده‌ی مؤثره‌ی دانه‌ی انگور

۲۵۰ میلی‌گرم عصاره‌ی پروآنتی سیانیدین به ازای کیلوگرم وزن بدن یک بار در روز به‌مدت ۸ هفته با محتوای بیشتراز ۹۶٪ پروآنتی سیانیدین به نمونه‌ها تزریق شد.

نمونه‌های بافتی و آماده سازی نمونه‌ها

۲۴ ساعت بعد از آخرین جلسه‌ی تمرینی رت‌ها به‌وسیله گاز CO2 بیهوش شدند.

ثابت‌سازی بافت

به‌طور کلی به‌منظور نگه‌داری سلول‌ها و بافت‌های بدن در حالتی مشابه و نزدیک به حالت زنده‌ی آن‌ها، عمل ثبوت انجام می‌گیرد. پس از جدا کردن نمونه از بدن موجود زنده بلافاصله به‌مدت ۷۲ – ۲۴ ساعت در محلول فرمال سالین۱۰٪ قرار گرفت.

آبگیری

به‌دلیل وجود درصد زیادی آب در بافت، پارافین به داخل بافت‌ها نفوذ نمی‌کند. در نتیجه باید آب‌گیری با الکل اتیلیک انجام شود. آبگیری با الکل اتیلیک به‌صورت زیر از درجات پایین شروع شده تا به الکل مطلق رسید.

شفاف سازی

وجود الکل در پارافین ایجاد اشکال می‌کند پس بهتر است آب با ترکیبی از محیط خارج گردد که از یک طرف با الکل و از طرف دیگر با پارافین واکنش دهد و حلال همدیگر باشند. ترکیب به‌کار گرفته شده در این مرحله چون باعث افزایش قدرت انکسار (ضریب شکست) بافت می‌شود به‌عنوان شفاف کننده شناخته شده است. برای این منظور از محلولی بنام زایلول استفاده گردید.

آغشتگی

هدف از آغشتگی عبارت است از جایگزین کردن عامل شفاف کننده با ترکیبی که صلابت و سختی به بافت بدهد تا بتوان از آن قالب تهیه و سپس برش‌گیری کرد.

قالب‌گیری

نمونه‌ی آغشته شده با پارافین در قالب پر از پارافین مذاب قرار گرفت سپس سرد شد تا ضمن انجماد پارافین، نمونه نیز در داخل آن سخت شده و آماده مقطع‌گیری شود.

برش‌گیری

از نمونه‌ها توسط دستگاه میکروتوم به ضخامت ۵ میکرومتر برش تهیه شد، سپس برش‌ها روی لام‌های آغشته شده به چسب

آلبومین قرار داده شدند و در چند منطقه با لنز ٤٠ مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس مراحل پارافین‌زدایی و رنگ آمیزی انجام شد. به کمک رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین هسته‌ها رنگ آبی و سیتوپلاسم رنگ صورتی به خود گرفتند. سپس عمل چسباندن یک لام بر روی نمونه‌ها برای بررسی با میکروسکوپ نوری انجام گرفت.

روش آزمایشگاهی: استخراج RNA

جهت بررسی‌های مولکولی در سطح بیان ژن، ابتدا استخراج RNA از بافت‌ها در همه گروه‌های مورد بررسی، طبق پروتکل شرکت سازنده (کیاژن، آلمان) انجام گرفت. ابتدا به نمونه‌ها ۳۰۰-۲۰۰ لاندا کیازول اضافه شد و به‌مدت ٢٤ ساعت آن را در دمای ۸۰- قرار گرفت. پس از ٢٤ ساعت پلاک موجود در کرایوتیوب را در حالت نیمه انجماد توسط سرسمپلر خرد کرده، سپس کمی پیپتاژ گردید. سپس به نمونه حدود ۱۰۰ لاندا کلروفرم اضافه شد تا سلول‌ها لیز شوند. این محلول حدود ۱ دقیقه باید با سلول‌ها در تماس باشد. پس از ۱ دقیقه محلول با دور ۱۲۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از سانتریفیوژ محلول به سه فاز تقسیم شد. قسمت بالایی لوله که شفاف و حاوی RNA بود. قسمت وسطی لوله که سفید رنگ و حاوی بافت لیز شده بود. قسمت پایینی لوله که صورتی و حاوی کیازول بود. مایع شفاف قسمت بالایی لوله که حاوی RNA بود به آرامی برداشته و در یک میکروتیوب DEPC شده قرار داده شد. سپس ۱ سی سی ایزوپروپانول بر روی RNA شفاف ریخته شد و به‌مدت ۱ دقیقه با دست هم زده شد. ایزوپروپرانول شفاف بوده و RNA نیز شفاف است، اما وقتی این دو با هم مخلوط شوند مایع کدری را به‌وجود می‌آورند. بهتر است این محلول به دست آمده یک شب در دمای ۸۰- قرار گیرد. پس از افزودن ایزوپروپرانول نمونه‌ها در سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. پس از خارج کردن از سانتریفیوژ مایع رویی تخلیه و روی آن ۱ سی‌سی الکل ۷۰ اضافه گردید. پس از Vortex کردن، مخلوط در سانتریفیوژ به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۷۵۰۰ قرار گرفت. سپس مایع رویی با سمپلر تخلیه گردید و سپس پلاک در داخل میکروتیوب خشک شد. به‌منظور حل کردن RNA به‌میزان ۲۰ لاندا آب مقطر ٦٠ درجه بر روی پلاک داخل میکروتیوب ریخته شد. سپس کمی با سرسمپلر پیپتاژ و به‌مدت ۵ دقیقه بر روی صفحه‌ی ٦٠ درجه قرار داده شد. RNA استخراج شده تا زمان استفاده در دمای ۸۰- قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

برای کمی‌سازی مقادیر بیان ژن هدف مورد نظر، از فرمول ۲ ΔCT- استفاده شد. برای تحلیل داده‌های بیان ژن PPARα و PPARγ از پروتکل استاندارد لیواک و با مقیاس ($2^{-\Delta\Delta Ct}\times 103$) استفاده شد. داده‌های بیان ژن براساس ژن خانه‌دار (کنترل داخلی) نرمالایز داخلی شدند و سپس با استفاده از آزمون‌های پارامتریک داده‌های بیان ژن پرت (دورافتاده) تعدیل و نرمال سازی صورت گرفت. جهت نشان دادن شاخص‌های گرایش مرکزی و شاخص های پراکندگی از آمار توصیفی استفاده شد. بررسی فرض نرمالیتی داده‌های بیان ژن‌ها با استفاده از آزمون کلموگروف اسمیرنف، انجام شد. همچنین برای بررسی اثر دیابتی شدن بر فاکتورهای مورد مطالعه و مقایسه‌ی جفتی برخی از گروه‌ها از آزمون t مستقل استفاده گردید. به‌منظور بررسی میزان اثر تمرین HIIT و مکمل دانه‌ی انگور بر روی ژن‌ها از تحلیل واریانس دو عاملی (۲=۲) استفاده شد. تمامی محاسبات با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ٢٤ در سطح معنی‌داری آلفای ۰/۰۵ انجام گرفت.

یافته‌ها

جدول۱ میانگین و انحراف استاندارد مقادیر بیان ژن (نرمالایز شده) PPARα و PPARγ در بافت پانکرانس رت‌های مبتلا به دیابت نوع دوم را در پنج گروه رت‌های پایه، دیابتی-کنترل، دیابتی-عصاره، دیابتی-تمرین و دیابتی-تمرین-عصاره نشان می دهد.

جدول ۱- توصیف متغیرهای تحقیق

گروه‌ها	PPARγ		PPARα	
	M	SD	M	SD
پایه	۰/۳۵۰۶	۰/۱۲۰	۰/۰۰۷۳	۰/۰۰۳
دیابتی - کنترل	۰/۰۴۰۱	۰/۰۱۵	۰/۰۰۰۶	۰/۰۰۰۲
دیابتی - مکمل	۰/۱۶۴۸	۰/۰۷۲۲	۰/۰۰۲۷	۰/۰۰۰۸
دیابتی - تمرین	۰/۱۲۱۵	۰/۰۲۲۲	۰/۰۰۳۹	۰/۰۰۰۷
دیابتی - مکمل و تمرین	۰/۱۶۶۳	۰/۰۴۷۷	۰/۰۰۶۷	۰/۰۲

نتایج آزمون کالموگراف اسمیرنف در جدول ۲ نشان داد که توزیع داده‌های بیان ژن (نرمالایز شده) PPARα و PPARγ در گروه رت‌های پایه، دیابتی-کنترل، دیابتی-تمرین، دیابتی-مکمل، دیابتی-مکمل-تمرین طبیعی است.

جدول ۲- نتایج آزمون کالموگراف-اسمیرنف

گروه‌ها	PPARγ			PPARα		
	D	df	Sig.	D	df	Sig.
پایه	۰/۳۰۶	۵	۰/۱۴۱	۰/۲۳۱	۵	۰/۲۰۰
دیابتی - کنترل	۰/۲۳۶	۵	۰/۲۰۰	۰/۲۵۷	۵	۰/۲۰۰
دیابتی - مکمل	۰/۲۳۳	۵	۰/۲۰۰	۰/۱۹۸	۵	۰/۲۰۰
دیابتی - تمرین	۰/۳۰۴	۵	۰/۱۴۶	۰/۲۴۵	۵	۰/۲۰۰
دیابتی - مکمل و تمرین	۰/۲۳۷	۵	۰/۲۰۰	۰/۲۸۲	۵	۰/۲۰۰

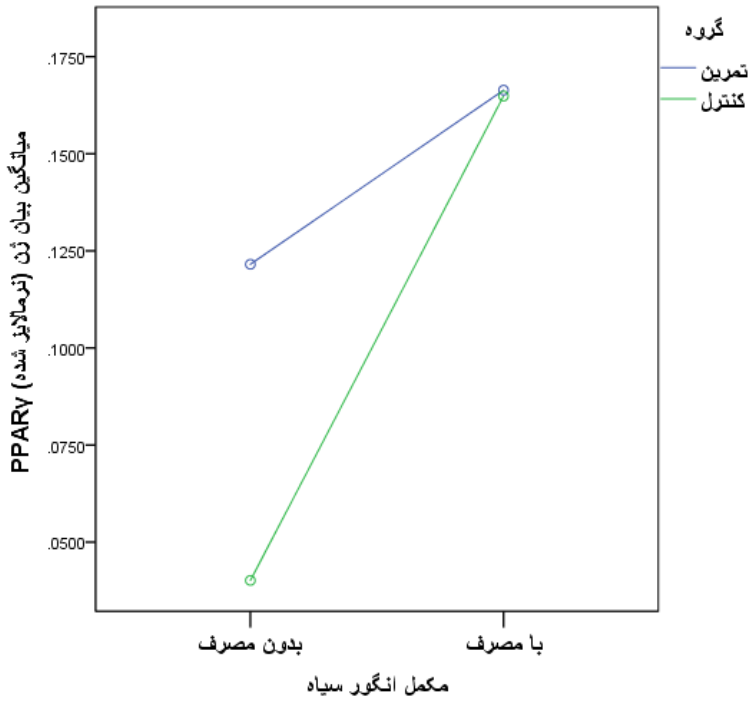
نتایج تحلیل t- مستقل در جدول ۳ نشان داد که بین میانگین بیان ژن رت‌های سالم و دیابتی تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($t_{(۸)}$=۵/۷ ،P=۰/۰۰۰). به‌عبارت دیگر، میانگین بیان ژن PPARγ رت‌های دچار دیابتی به‌طور معنی‌داری از رت‌های سالم کمتر است. همچنین، بین میانگین بیان ژن PPARα رت‌های سالم و دیابتی تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($t_{(۸)}$=۴/۶۰ ،P=۰/۰۰۲). به عبارت دیگر، میانگین بیان ژن PPARα رت‌های دیابتی به‌طور معنی‌داری از رت‌های سالم کمتر است.

جدول ۳- نتایج آزمون t - مستقل

متغیر	t	df	Sig.
PPARγ	۵/۷۲	۸	۰/۰۰۰
PPARα	۴/۶۰	۸	۰/۰۰۲

جدول ۴- نتایج تحلیل واریانس ۲ عاملی (تمرین × مکمل) برای PPARγ

منبع	SS	df	MS	F	Sig.	η^2
تمرین	۰/۰۰۹	۱	۰/۰۰۹	٤/۱۷	۰/۰۵۸	۰/۲۰۷
عصاره	۰/۰۳٦	۱	۰/۰۳٦	۱۷/٤٤	۰/۰۰۱	۰/۵۲۲
عصاره×تمرین	۰/۰۰۸	۱	۰/۰۰۸	۳/۸۷	۰/۰٦۷	۰/۱۹۵
خطا	۰/۰۳۳	۱٦	۰/۰۰۲			



نمودار ۱- میانگین اثرات تعاملی تمرین و مصرف عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه بر بیان ژن PPARγ در رت‌های دیابتی

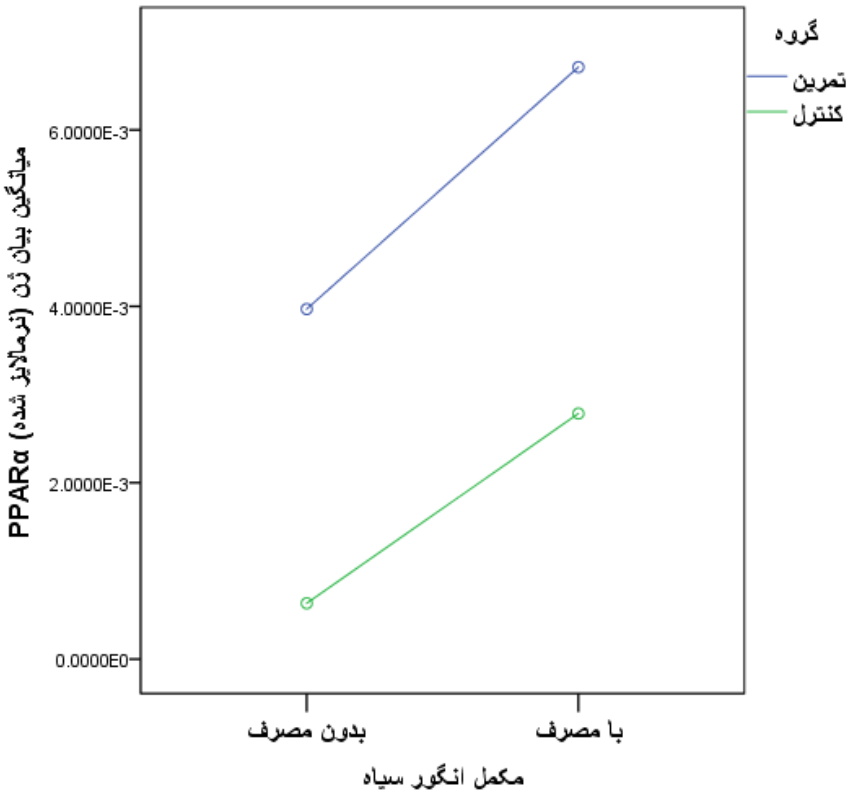
نتایج تحلیل واریانس دو عاملی(تمرین×مکمل) جدول ٤ نشان داد که اثر اصلی تمرین و اثر تعاملی تمرین و مصرف عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه بر بیان ژن PPARγ رت‌های دیابتی معنی‌دار نیست. اثر اصلی عصاره‌ی دانه انگور سیاه بر بیان ژن PPARγ رت‌های دیابتی معنی‌دار است.

همانگونه که در نمودار مشاهده می‌شود، بیان ژن PPARγ گروه تمرین (خط آبی) بالاتر از گروه کنترل (خط سبز) است. همچنین، میانگین بیان ژن PPARγ گروه تمرین از بدون مصرف تا مصرف عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه افزایش یافته است (خط آبی)، در حالی‌که میانگین بیان ژن PPARγ گروه کنترل (خط سبز) از بدون مصرف تا مصرف عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه افزایش بیشتری نسبت به گروه تمرین (خط آبی) یافته است. هرچند، این تفاوت الگوی تغییرات گروه تمرین و کنترل معنی دار نیست.

نتایج تحلیل واریانس دو عاملی (تمرین× مکمل) (جدول ۵) نشان داد که اثر اصلی تمرین و عصاره بر بیان ژن PPARα رت های دیابتی معنی‌دار است و اثر تعاملی تمرین و عصاره بر بیان ژن PPARα رت‌های دیابتی معنی‌دار نیست.

جدول ۴-۵-نتایج تحلیل واریانس ۲ عاملی (تمرین × مکمل) برای PPARα

منبع	SS	df	MS	F	Sig.	η^2
تمرین	٦/٥٩	١	٦/٥٩	٢٥/٣	٠/٠٠٠	٠/٦١٣
مکمل	٢/٩٩٤	١	٢/٩٩٤	١١/٥	٠/٠٠٤	٠/٤١٩
مکمل ×تمرین	٤/٣٧٠	١	٤/٣٧٠	٠/١٦٨	٠/٦٨٧	٠/٠١٠
خطا	٤/١٥	١٦	٢/٥٩			



نمودار ۲- میانگین اثرات تعاملی تمرین و مصرف عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه بر بیان ژن PPARα در رت‌های دیابتی

همانگونه که در نمودار مشاهده می‌شود، بیان ژن PPARα گروه تمرین (خط آبی) بالاتر از گروه کنترل (خط سبز) است. همچنین، میانگین تغییرات بیان ژن PPARα گروه تمرین (خط آبی) از بدون مصرف تا مصرف عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه مشابه تغییرات میانگین بیان ژن PPARα گروه کنترل (خط سبز) است.

بحث و نتیجه گیری

بیان ژن‌های PPARγ و PPARα و دیابت

در مطالعه‌ی حاضر میزان بیان ژن PPARγ و PPARα در رت های دچار دیابتی به‌طور معنی‌داری از رت‌های سالم کمتر بود. نتایج این تحقیق با تحقیقات Kim و همکاران [۸]، Lalloyer و همکاران[۹]و Hee koh و همکاران(۲۰۰۳)[۱۰] همخوانی دارد. نتایج تحقیق اخیر نشان داد که بیان ژن‌های PPARγ و PPARα به‌طور معناداری در رت‌های دیابتی نسبت به رت‌های سالم کمتر است. بنابراین با توجه به نتایج تحقیقات همسوی بالا، افزایش این دو بیان ژن در سلول‌های بتای پانکراس رت‌های دیابتی نوع دو می‌تواند در بهبود عملکرد سلول‌های بتای پانکراس و درنتیجه بهبود عملکرد انسولین مؤثر باشد. از طرفی نتایج این تحقیق با تحقیقات Hogh و همکاران [۱۱]، Welters و همکاران [۱۲] و Tordjman و همکاران [۱۳]در تناقض است. دلیل این امر می تواند نوع رژیم غذایی و نوع محرک تأثیرگذار بر بیان ژن‌ها باشد. در مجموع می‌توان گفت لیگاندهای سنتتیک PPARα نظیر فیبرات‌ها موجب کاهش لیپوپروتئین‌های تری‌گلیسیرید در خون از طریق افزایش در بیان ژن دخیل در بتا اکسیداسیون اسید چرب می‌شود. آنها به‌طور گسترده‌ای در درمان فارماکولوژیکی هیپرتری‌گلیسریدمی استفاده می‌شوند. پس از فعال‌سازی از طریق فیبرات‌ها، گیرنده‌های PPARα با گیرنده اسید رتینویک ۹-سیس و سپس با عناصر پاسخ تکثیر شونده‌ی پروکسی زوم پیوند برقرار می‌کنند. فعالیت آنها منجر به کاهش دسترسی سیستمیک اسیدهای چرب و کاهش جذب اسید چرب در عضله می‌شود. آنها همچنین موجب افزایش حساسیت انسولین و کاهش سطوح گلوکز پلاسما می‌شوند [۱٤]. همچنین نشان داده شده است که آگونیست‌های PPAR γ علاوه بر اثرات شناخته شده آنها بر بافت‌های حساس به انسولین، ممکن است مزایای مکمل در سلول بتا داشته باشند. PPAR γ به‌طور مستقیم ژن‌های کلیدی سلول β دخیل در حساسیت به گلوکز، ترشح انسولین و رونویسی انسولین از جمله GLUT2، pdx-1 و گلوکوکیناز را تنظیم می‌کند. این عملکرد مکمل و اثرات بقای فعال‌سازی PPAR γ به حفظ عملکرد و توده‌ی سلول β در دیابت نوع دو کمک می‌کند [۱]. سلول بتا تنها سلول بدن است که مسؤول ترشح انسولین فیزیولوژیک است، در نتیجه یک مکمل از دستگاه های بسیار تخصصی سلولی برای انجام وظایف کلیدی برای سنجش گلوکز و انتشار انسولین دارد. ترشح انسولین در سلول بتای پانکراس به‌طور کلاسیک به سازوکار وابسته به کانال وابسته به پتاسیم حساسATP(KATP) بستگی است. در این مدل، گلوکز به داخل سلول بتا از طریق گیرنده گلوکز GLUT گرفته می‌شود. در جوندگان، GLUT2 ایزوفرم غالب است. با این حال، در سلول‌های بتای انسانی،GLUT1 به‌نظر می‌رسد نقش برجسته ای ایفا کند. پس از ورود به سلول بتا، گلوکز توسط گلوکوکیناز به گلوکز ٦-فسفات تبدیل می‌شود. گلوکوکیناز، در مقایسه با سایر ایزوفرم‌های هگزوکیناز در سایر انواع بافت، کمبود میل(Km بالا) برای گلوکز دارد، همکاری عمل با گلوکز را نشان می‌دهد و به‌عنوان محدود کننده‌ی سرعت برای جذب گلوکز عمل می‌کند. گلوکز ٦-فسفات پس از آن به مسیر پیروات در مسیر گلیکولیت تبدیل می‌شود و سپس به استیل کوآنزیم A (CoA) تبدیل می‌شود و وارد چرخه‌ی تری کاربوکی اسید (TCA) می‌شود. چرخه‌ی TCA باعث کاهش معادلات و ATP می‌شود که منجر به افزایش نسبت ATP/ADP در جزیره می شود. این افزایش در نسبت ATP/ADP سبب بسته شدن کانال های KATP می‌شود که منجر به قطب‌دهی غشاء و فعال‌سازی پس از کانال‌های Ca2+ با ولتاژ و همچنین نفوذ Ca2 به علاوه از فضای خارج سلولی و ER می‌شود. این افزایش در Ca2+ سیتوزول در نهایت در خدمت فعال کردن اتصال گرانول انسولین و آزاد شدن از یک محیط آزاد به راحتی از کیسه‌های کوچک ترشح می‌شود. GSIS تنها از طریق این سازوکار وابسته به KATP رخ نمی‌دهد. چند راه متابولیک جایگزین وجود دارد که به ترشح انسولین کمک می‌کند. این فرآیندها در جاهای دیگر

مورد بررسی قرار گرفته و شامل واکنش‌های آناپلوروزی متشکل از پیروات کربوکسیلاز، شاتل‌های NADH و تولید گلوتامات از گلوتامات دهیدروژناز است. علاوه بر این، هورمون‌های تزریقی مشتق شده از روده، پپتید۱ (Glp-1-g) مشابه گلوکاگون (GLP) و پلی‌پپتید مهارکننده‌ی معده (GIP)، ترشح انسولین وابسته به گلوکز را از طریق فعال‌سازی گیرنده‌های شناخته شده خود و سیگنالینگ پایین‌تر از آن، آدنوزین مونوفسفره(cAMP) و فعال سازی پروتئین کیناز A و فاکتورهای گنوین نوکلئوتیدی را جابجا می‌کنند. نشان داده شده است که عملکرد TZD برای افزایش حساسیت گلوکز و ترشح انسولین از جوندگان دیابتی و سلول های بتای انسانی است. با توجه به تنظیم PPAR γ این فرآیندهای مستقلKATP، Jitrapakdee و همکاران[۱۵] نشان دادند کهγ PPAR یک تنظیم کننده‌ی رونویسی مستقیم پیرووات کربوکسیلاز در بافت‌های سفید و قهوه‌ای هستند. با اینحال، این ارتباط مستقیماً در سلول بتا مورد مطالعه قرار نگرفته است. علاوه بر این، Gupta و همکاران [۱] اخیراً PPRE را در ژن گیرنده GIP نشان دادند و اظهار داشتند که این ژن یک هدف مستقیم PPAR γ است. همچنین PPAR γ نیز برای تنظیم اجزای مسیر GSIS وابسته به KATP کلاسیک شناخته شده است. پروتئین های GLUT2 و گلوکوکیناز گزارش شده‌اند PPRE عملکردی است که پیوستگیγ PPAR/ RXR هترودیمر و فعال‌سازی PPAR γ منجر به تنظیم رونویسی از این ژن‌ها در سلول بتا شد. علاوه بر این، بیان ژن‌ها در مدل‌های مبتلا به دیابت دچار اختلال می‌شود. با اینحال، در مورد تنظیم GLUT1 توسط PPAR γ *در سلول بتای انسان شناخته شده است. نشان داده شده است که* TZD *افزایش سطح بیان و فعالیت حمل کننده* GLUT1 *در عضلات اسکلتی و آدیپوسیت‌ها را نشان می‌دهد. ترشح و رونویسی انسولین در سلول بتای پانکراس رابطه‌ای بسیار نزدیک است و بیان ژن انسولین با دقت از طریق شبکه‌ای از عوامل رونویسی تعاملی تنظیم می‌شود.*

تمرین تناوبی شدید و بیان ژن‌های PPARα و PPARγ

در مطالعه‌ی حاضر اثر اصلی تمرین HIIT *بر بیان ژن* PPARγ *رت‌های دیابتی معنی‌دار نبود. به‌عبارت دیگر، بین میانگین بیان ژن* PPARγ *رت‌های گروه تمرین و کنترل تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. با توجه به جمع‌آوری نتایج تحقیقات پیشین، نتایج همسویی در رابطه با بدون تغییر بودن بیان ژن* PPARγ *رت‌های گروه تمرین در بافت پانکراس رت‌های مبتلا به دیابت نوع دوم وجود نداشت. به‌عبارت دیگر، نتایج این تحقیق با تحقیقات شعبانی و همکاران* [۱۶]، Kim *و همکاران* [۸]، Thomas *و همکاران* [۱۷] Fatone *و همکاران* [۱۸] *و* Petridoua *و همکاران* [۱۹] *تناقض دارد. دلیل ناهمسو بودن این نتایج با یافته‌های تحقیق می‌تواند به‌علت نوع پروتکل تمرینی (شدت و طول مدت ورزش) در نمونه‌های دیابتی باشد. برخلاف معنادار نبودن اثر تمرین بر* PPARγ *اثر اصلی تمرین* HIIT *بر بیان ژن* PPARα *رت‌های دیابتی معنی‌دار بود. یعنی بین میانگین بیان ژن* PPARα *رت‌های گروه تمرین و کنترل تفاوت معنی‌داری وجود داشت. به‌عبارت دیگر هشت هفته تمرینات تناوبی شدید* HIIT *منجر به افزایش معنی‌دار میانگین بیان ژن* PPARα *در بافت پانکراس رت‌های مبتلا به‌دیابت نوع دوم شد. با توجه به جمع‌آوری نتایج تحقیقات پیشین، نتایج ناهمسویی در رابطه با افزایش بیان ژن* PPARα *رت‌های گروه تمرین در بافت پانکراس رت‌های مبتلا به دیابت نوع دوم وجود نداشت. به‌عبارت دیگر نتایج تحقیقات* Kim *و همکاران* [۸]، Mosti [۱۹]، Fatone *و همکاران* [۱۶] *و* Horowitz *و همکاران* [۲۰] *با نتایج تحقیق پیش رو همسو است. مطالعات نشان داده است که به‌طور خاص،* PPARα *آنزیم‌هایی را که در اکسیداسیون اسید چرب نقش دارند، القا می‌کند. درحالی‌که* PPARγ *نقش‌های مهمی در آدیپوژنز و حساسیت به انسولین* دارد. نتایج نشان داد تمرین ورزشی بر PPARها در بیان PPARα، PPARγ و PPARδ در عضله اسکلتی تأثیر داشته و محتوای PPARα و پیوند DNA در PPARα در قلب نیز افزایش یافته است. همچنین عدم هیچ تغییری در PPARγ بافت چربی گزارش شده است [۲۱]. گیرنده‌ی فعال شده‌ی تکثیر کننده‌ی پراکسیزم گاما یک عامل بسیار کلیدی در درمان مقاومت به انسولین است، زیرا لیگاندهای این گیرنده به‌عنوان افزایش دهنده‌ی حساسیت به انسولین، مورد استفاده در درمان دیابت نوع دو است [۲۲]. به‌دلیل اهمیت بالینی ایمنی دیابت نوع دو و

شرایط مرتبط با آن، روش‌های جایگزین القاء ژنومیک وابسته PPARγ، می‌توانند اثرات مفیدی در این زمینه داشته باشند. ورزش ممکن است چنین جایگزینی را ارائه دهد. مطالعات نشان دادند که مشارکت در برنامه‌های ورزشی می‌تواند اثرات سیگنالینگ واسطه‌ی PPARγ به‌منظور فواید آنتی‌آتروژنیک حاصل کند و عملکرد قلبی عروقی را بهبود بخشد [۱۷]. به‌عنوان مثال، شرکت کنندگان در یک برنامه‌ی ورزشی با شدت پایین (پیاده‌روی با ۱۰۰۰۰ گام، ۳ بار در هر هفته به‌مدت ۸ هفته) افزایش فعالیت پیوند DNA در مونوسیت PPARγ و افزایش بیان درون CD36 ژن‌های هدف PPARγ مونوسیت، سازنده‌ی α-1 از (PGC-1 α) PPARγ و گیرنده‌ی X α کبد(LXR- α) و در نتیجه تنظیم بالای ژن‌های هدف LXR- α را نشان دادند. در این افراد، تغییرات مفیدی در پروفایل لیپید سرم (افزایش HDL کلسترول و کاهش کلسترول کل، lDL کلسترول و تری‌گلیسیرید) به همراه افزایش HDL کلسترول مرتبط با بیان ژن هدف PPARγ مشاهده شد که نشان می‌دهد که ورزش انتقال کلسترول معکوس را از طریق اثرات میانجی PPARγ درون مونوسیت افزایش می‌دهد [۱۷]. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که علاوه بر تمرینات طولانی مدت هوازی که باعث بهبود عوامل خطر بیماری‌های قلبی عروقی و کاهش وزن می‌شوند، تمرینات تناوبی با شدت بالا نیز که مدت زمان کمتری برای اجرای آنها مورد نیاز است، می‌توانند در کاهش توده‌ی چربی بدن مؤثر بوده و مورد استفاده قرار گیرند. فعالیت ورزشی منظم تأثیرات مفیدی بر سلامت بدنی افراد دارد و نقش فعالیت ورزشی در درمان و پیشگیری از بیماری‌های متابولیک مانند چاقی و دیابت نوع دو به‌خوبی شناخته شده است. تمرین ورزشی، هموستاز گلوکز کل بدن را بهبود بخشیده و حساسیت به انسولین را افزایش می‌دهد، که این تأثیرات را مربوط به سازگاری‌های عضله‌ی اسکلتی، بافت چربی و... می‌دانند.

مکمل عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه و بیان ژن‌های PPARα و PPARγ

در مطالعه‌ی حاضر اثر اصلی مصرف عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه بر بیان ژن PPARα و PPARγ رت‌های دیابتی معنی‌دار است. یعنی بین میانگین بیان ژن PPARα و PPARγ رت‌های گروه مصرف کننده‌ی عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه و کنترل تفاوت معنی داری وجود دارد. به‌عبارت دیگر مصرف عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه منجر به افزایش معنی‌دار میانگین بیان ژن PPARα و PPARγ در بافت پانکراس رت‌های مبتلا به دیابت نوع دوم شد. با توجه به پیشینه‌ی تحقیقات داخلی، اثرات مکمل‌های دیگر مثل بتایین، ویتامین D و عصاره‌ی بنه بر بافت چربی، بافت کبد و سلول‌های بتای پانکراس انجام شده است، اما هیچ مطالعه‌ای در ایران اثر مصرف عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه را بر بیان ژن‌های PPARα و PPARγ در بافت پانکراس رت‌های مبتلا به دیابت نوع دو یا بر روی بافت‌های دیگر بررسی نکرده است. اما با توجه به پژوهش دوستار و همکاران [۵] وقوع استرس اکسیداتیو را در دیابت مورد تأیید قرار داده و اثرات آنتی اکسیدانی عصاره‌ی دانه‌ی انگور را نشان داد. Ding و همکاران [۲۲]، Yogalakshmi و همکاران [۲۳] در مطالعات خود به اثرات مؤثر GSP بر بهبود عملکرد سلول بتای پانکراس و افزایش بیان ژن PPARα در موش‌های هایپرلیپیدمیک و دیابتی اشاره کردند که همسو با یافته‌های تحقیق است. درمان باGSP ، محتوای انسولین طبیعی را افزایش و تعداد سلول‌های آپوپتوتیک را در جزایر دیابتی کاهش داد. این یافته‌ها حاکی از آن بودند که GSPها ممکن است پتانسیل درمانی بالقوه‌ای برای اختلال عملکرد و مرگ سلول بتای پانکراس در دیابت نوع دو داشته باشند. استفاده از عوامل آنتی اکسیدانی نقش به‌سزایی در کاهش عواقب ناشی از بیماری دیابت خواهد داشت و در این بین استفاده از ترکیبات با منشاء گیاهی که معمولاً با عوارض جانبی کمتری همراه است، اهمیت خاص خود را دارد. به‌نظر می‌رسد که عصاره‌ی هسته‌ی انگور به‌علت داشتن خواص آنتی اکسیدانی در درمان بیماری دیابت حائز اهمیت باشد، چرا که نقش آن در کاهش قند خون و همچنین کاهش استرس اکسیداتیو حاصل از روند التهاب، به اثبات رسیده است [۵]. اثرات هیپوگلیسمیک پروآنتوسیانیدین دانه‌ی انگور در موش‌های دیابتی شده با STZ نشان داده شده است. مطالعات گذشته نشان دادند که GSPE می‌تواند افزایش بیان VCAM-1 را در سلول‌های اندوتلیال در معرض AGE به‌وسیله سرکوب تولید گونه‌های اکسیژن واکنشی(ROS) مهار کند. آخرین تحقیقات نشان دادند که GSPE به‌طور معناداری

بیان پروتئین و Mrna را در RAGE و p65 NF-Kb در هیپوکامپوس موش‌های دیابتی کاهش می‌دهد. بنابراین GSPE می‌تواند به‌عنوان یک مداخله‌گر مؤثر در عوارض دیابت مزمن مورد استفاده قرار بگیرد [۲٤]

تمرین تناوبی شدید همراه با مصرف عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه و بیان ژن‌های PPARγ و PPARα

در مطالعه‌ی حاضر اثر تعاملی تمرین و مصرف عصاره‌ی انگور سیاه بر بیان ژن PPARγ و PPARα رت‌های دیابتی معنی‌دار نیست. یعنی اثر مصرف دانه‌ی انگور سیاه بر بیان ژن PPARγ و PPARα رت‌های گروه تمرین و کنترل مشابه است. به زبان ساده‌تر مصرف عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه همراه تمرین بر بیان ژن PPARγ و PPARα رت‌ها تفاوتی با مصرف فقط عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه (بدون تمرین) نداشت. براساس تحقیق حاضر هیچ‌گونه مطالعه‌ای در ایران در زمینه‌ی تأثیر تمرین تناوبی شدید همراه با مصرف عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه بر بیان ژن‌های PPARα و PPARγ بر بافت پانکراس نمونه‌های دیابتی صورت نگرفته است، اما اثر تعاملی تمرین ورزشی به همراه مصرف ویتامین D با دوزهای مختلف بر چربی احشایی، مقاومت به انسولین، پروفایل لیپیدی و بیان ژن PPARγ در بافت کبد موش‌های مبتلا به سندرم متابولیک توسط حسینی [۲۵] مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌ها نشان داد در گروه اوارکتومی شده تمرین هوازی + مکمل‌دهی ویتامین D با دوز بالا افزایش معنی‌داری در بیان ژن PPARγ نسبت به گروه اوارکتومی شده تمرین هوازی + مکمل دهی ویتامین D با دوز پایین و کاهش معنی داری در گروه اوارکتومی شده + مکمل دهی ویتامین D با دوز پایین نسبت به گروه اوارکتومی شده + مکمل‌دهی ویتامین D با دوز بالا مشاهده شد. نتایج نشان داد که تمرین هوازی همراه با ویتامین D با دوز بالا و متوسط مؤثرترین راه برای بهبود سندرم متابولیک است. تناقض این نتایج با یافته‌های این تحقیق می‌تواند به‌علت نوع مکمل، نوع و شدت تمرین (پروتکل تمرینی) و تفاوت در بافت مورد نظر باشد. براساس تحقیق حاضر هیچ‌گونه مطالعه‌ی خارجی که صرفاً بر روی تأثیر نوع تمرین HIIT به همراه مکمل عصاره‌ی هسته‌ی انگور سیاه بر بیان ژن PPARα و PPARγ در نمونه‌های دیابتی باشد انجام نگرفته است. تنها مطالعه‌ی Zhang و همکاران [۲٦]، یافت شد که به بررسی درمان موش‌های دیابتی با ترکیبی از رژیم کتوژنیک و دیابتی شده با استرپتوزوتوسین (STZ) به همراه تمرین هوازی پرداخته‌اند. در این مطالعه مشاهده شد که رژیم کتوژنیک در ترکیب با ورزش، PPAR و ژن‌های لیپید مصنوعی را کاهش داده و همچنین PPAR و برنامه‌ی ژن اکسیداسیون بتای لیپید را در کبد در مقایسه با گروه رژیم کتوژنیک بدون ورزش افزایش می‌دهد. در مجموع نتایج نشان داد که ترکیبی از رژیم غذایی کتوژنیک و مداخله‌ی تمرین هوازی با شدت متوسط، حساسیت به انسولین را در موش‌های دیابتی بهبود می‌بخشد، با توجه به اینکه اجتناب از کبد چرب یک راهبرد جدید برای مبارزه با دیابت ارائه می‌دهد، تناقض این نتایج با یافته‌های این تحقیق می‌تواند به‌علت نوع رژیم غذایی یا نوع مکمل، نوع و شدت تمرین و تفاوت در بررسی بافت مورد نظر باشد. در مجموع براساس مطالعات پیشین می‌توان گفت که اثرات پروآنتی‌سیانیدین هسته‌ی انگور بر عملکرد سلول بتای پانکراس، بهبود آسیب پانکراس و کاهش تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در جزایر دیابتی در موش‌های دیابتی چاق مشاهده شده است. از طرفی تحقیقات نشان داده‌اند که تمرین تناوبی شدید اثرات سودمندی بر سلامت قلبی عروقی و کاهش چربی در بیماران دیابت نوع دو ایجاد می‌کند. وقتی فعالیت های پرشدت با فواصل استراحتی مناسب تکرار می‌شوند، منجر به تجمع بیشتر یون‌های هیدروژن شده و تجمع یون‌های هیدروژن ظرفیت خنثی‌سازی درون عضلانی را افزایش می‌دهد. نشان داده شده است که بهبود در ظرفیت خنثی سازی بعد از تمرینات پرشدت، شروع خستگی عضلانی را به تأخیر انداخته و توان هوازی اوج و کل کار انجام شده را افزایش می‌دهد [۲۷]. علاوه بر این، نشان داده شده است که میزان بیان ژن‌های PPARα و PPARγ باعث تنظیم و حفظ عملکرد سلول‌های بتای پانکراس به‌خصوص در نمونه‌های دیابتی می‌شود که نوع پروتکل تمرینی به همراه استفاده از مکمل‌های تغذیه ای با دوز مناسب می‌تواند اثرات مؤثری را بر این سازوکار داشته باشد.

نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر تأثیر تمرین HIIT بر بیان ژن PPARγ معنادار نبود، ولی تمرین HIIT تأثیر معناداری را بر بیان ژن PPARα بر بافت پانکراس رت‌های دیابتی نوع دو داشت که نشان می‌دهد تمرینات

HIIT می‌تواند جایگزین مناسبی برای تمرینات طولانی‌مدت و خسته کننده باشد. یافته دیگر این تحقیق این بود که مصرف عصاره‌ی هسته‌ی انگور سیاه افزایش معناداری را در بیان هر دو ژن PPARγ و PPARα بر بافت پانکراس رت‌های دیابتی نوع دو داشته است. مطالعات پیشین وقوع استرس اکسیداتیو را در دیابت مورد تأئید قرار داده و اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی دانه‌ی انگور را نشان دادند. از این‌رو، افزایش بیان ژن PPARγ وPPARα توسط عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه می‌تواند یک راهکار مؤثر به‌منظور بهبود دیابت نوع دو و تنظیم عملکرد سلول‌های بتای پانکراس در بیماران دیابتی باشد. علاوه بر این، در مطالعه‌ی حاضر اثر تمرین همراه با مصرف عصاره‌ی انگور سیاه بر بیان ژن PPARγ و PPARα رت‌های دیابتی معنادار نبود. به زبان ساده‌تر، مصرف عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه همراه تمرین بر بیان ژن PPARγ و PPARα رت‌ها، تفاوتی با مصرف فقط عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه (بدون تمرین) نداشت. به‌طور کلی می‌توان گفت با توجه به تأثیر جداگانه عصاره‌ی دانه‌ی انگور سیاه بر بیان ژن‌های PPARγ و PPARα و همچنین تأثیر جداگانه تمرین HIIT بر بیان ژن PPARα بر بافت پانکراس رت‌های مبتلا به دیابت نوع دو، به‌نظر می رسد میزان بیان ژن‌های PPARα و PPARγ باعث تنظیم و حفظ عملکرد سلول‌های بتای پانکراس به‌خصوص در نمونه‌های دیابتی می‌شود. دلیل معنادار نبودن تأثیر هم‌زمان تمرین و مصرف مکمل شاید نوع پروتکل تمرینی (شدت و طول مدت تمرین ورزشی) و مقدار دوز مصرفی مکمل است که احتمال دارد اثرات مؤثرتری را بر این سازوکار بگذارد، زیرا اثرات ضد دیابتی ورزش و مصرف عصاره‌ی هسته‌ی انگور در پژوهش‌های مختلف ثابت شده است.

مآخذ

٦. فیاضی، زهره. فعالیت بدنی و کنترل دیابت. *مجله‌ی نشاط ورزش* ۱۳۷۸؛ سال پنجم (شماره دهم): ٤٧-٥٦.

٧. حق شناس، روح الله؛ جمشیدی، زهرا؛ دعائی، سعید؛ غلامعلی‌زاده، مریم. تأثیر٦ هفته تمرین تمرینات اینتروال با شدت بالا بر سطح ویتامینD پلاسما و شاخص‌های آنترپومتریک نوجوانان پسر دارای اضافه وزن. *مجله علوم پزشکی خراسان شمالی* ١٣٩٦؛ دوره ٩ (شماره ٤): ٢٠-٢٦.

8. Kim Kwang- Won, Lee Moon-Kyu. PPAR-γ Activation Increases Insulin Secretion through the Up-regulation of the Free Fatty Acid Receptor GPR40 in Pancreatic β-Cells. *Plos* 2013; 8(1):1-12.
9. Lalloyer Fanny, Vandewalle Brigitte, Percevault Fre´de´ ric, Torpier Ge´rard, Kerr-Conte Julie, Oosterveer Maaike, et al. Peroxisome Proliferator–Activated Receptor α Improves Pancreatic Adaptation to Insulin Resistance in Obese Mice and Reduces Lipotoxicity in Human Islets. *Diabetes* 2006; 55:1605-1613.
10. Hee Koh Eun, Kim Min-Seon, Park Joong-Yeol, Kim Hyun Sik, Youn Ji-Young Park, Hye-Sun, Youn Jang Hyun and Lee Ki-Up. (2003). Peroxisome Proliferator–Activated Receptor (PPAR)-α Activation Prevents Diabetes in OLETF

1. Gupta D, Kono T, Evans-Molina C. The role of peroxisome proliferator-activated receptor γ in pancreatic β cell function and survival: therapeutic implications for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab* 2013; 12(12): 1036–1047.
2. Muralidaran Shalini, Roy Anitha. The Role of PPAR Agonists in Diabetes Mellitus. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 2016; 8(8): 864-866.
3. 3-Kim Ha-il, Ahn Yong-ho. Role of Peroxisome Proliferator–Activated Receptor-γ in the Glucose-Sensing Apparatus of Liver and β –Cells. *Diabetes* 2004; 53: 60-65.

٤. موسوی، طهورا؛ رفیعی، علیرضا؛ امجدی سورکی، ام‌البنین؛ یوسف‌پور، محمد؛ زکوی، علی‌اصغر. خواص طبی تغذیه ای انگور در منابع اسلامی، طب سنتی و طب جدید. *مجله‌ی دانشگاه علوم پزشکی مازندران* ١٣٩٤؛ دوره ٢٥ (شماره ١٣٠): ١٦٩-١٩٠.

٥. دوستار، یوسف؛ مهاجری، داریوش. اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی دانه‌ی انگور در موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین. *مجله‌ی تحقیقات علوم پزشکی زاهدان* ۱۳۸۸؛ دوره ۱۲ (شماره ۱): ۹-١٤.

Rats Comparison with PPAR-γ Activation, DIABETES, VOL 52, 2331-2337.

11. Hogh, KN, Craig MN, Uy CE, Nygren H, Asadi A and et al. Overexpression of PPARγ specifically in pancreatic β-cells exacerbates obesity-induced glucose intolerance, reduces β-cell mass, and alters islet lipid metabolism in male mice. *Endocrinology* 2014; 155(10): 3843–3852.
12. Welters Hannah J. McBain Stuart C. Tadayyon Moh. Scarpello John HB. Expression and functional activity of PPAR gamma in pancreatic beta cells. *British Journal of Pharmacology* 2004;142(7): 1162-70.
13. Tordjman K, Standley KN, Bernal-Mizrachi C, Leone TC, Coleman T, Kelly DP, et al. PPARalpha suppresses insulin secretion and induces UCP2 in insulinoma cells. *Journal of Lipid Research* 2002; 43:936-943.
14. Górniak B.G. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands,nutritional and clinical implications: a review. *Nutrition Journal* 2014; 13(17): 1-10.
15. Jitrapakdee Sarawut, Slawik Marc, Medina-Gomez Gema, Campbell Mark, Wallace John C., Sethi Jaswin K., O'Rahilly ta al. The Peroxisome Proliferator-activated Receptor-γ Regulates Murine Pyruvate Carboxylase Gene Expression in Vivo and in Vitro. *J Biol Chem*. 2005 July 22;280(29): 27466 -27476.

۱۶. شعبانی، مریم؛ ثالثی، محسن؛ دریانوش، فرهاد. تأثیر تمرین تناوبی با شدت بالا روی محتوای پروتئین¬های گیرنده فعال شده تکثیرکننده پراکسیزم گاما و دامنه PR حاوی ۱۶ در بافت چربی موش‌های صحرایی نر اسپراگوداولی مبتلا به دیابت نوع ۲ دارای اضافه وزن. *مجله علوم پزشکی پارس* ۱۳۹۷؛، دوره ۱۶ (شماره ٤): ۱-۹.

17. Thomas A. W, Davies, N. A, Moir H, Watkeys L, Ruffino J. S, Isa S. A, et al. Exercise-associated generation of PPARγ ligands activates PPARγ signaling events and upregulates genes related to lipid metabolism. *J Appl Physiol* 2012; 112: 806–815.
18. Fatone C, Guescini M, Balducci S, Battistoni S, Settequattrini A, Pippi R. Two weekly sessions of combined aerobic and resistance exercise are sufficient to provide beneficial effects in subjects with Type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome. *Journal of endocrinological investigation* 2010; 33(7): 489-495.
19. Petridoua Anatoli, Tsalouhidoua Sofia, Tsalisa George, Schulzb Thorsten, Michnab Horst, Mougiosa, et al. Long-term exercise increases the DNA binding activity of peroxisome proliferator–activated receptor γ in rat adipose tissue. *Metabolism Clinical and Experimental* 2007; 56:1029–1036.
20. Mosti PM. *The effect of maximal strength training and peroxisome proliferator-activated receptor agonists on bone and muscle: Studies in humans and rats*. Doctoral thesis OF Institutt for klinisk og molekylær medisin 2013.
21. Horowitz JF, Leone TC, Feng W, Kelly DP, Klein S. Effect of endurance training on lipid metabolism in women: a potential role for PPARa in the metabolic response to training. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279: 348–355.
22. Ding Y, Zhang Z, Dai X, Jiang Y, Bao L, Li Y, Li Y. Grape seed proanthocyanidins ameliorate pancreatic beta-cell dysfunction and death in low-dose streptozotocin- and high-carbohydrate/ high-fat diet-induced diabetic rats partially by regulating endoplasmic reticulum stress. *Nutrition & Metabolism* 2013; 10(51): 1-12.
23. Yogalakshmi Baskaran, Rajagopalan Geetha S Sreeja, Krishnamoorthy Radika Mutlur, Venkatraman Anuradha Carani. Grape Seed Proanthocyanidin Rescues Rats from Steatosis: A Comparative and Combination Study with Metformin. *Hindawi Publishing Corporation Journal of Lipids* 2013; 10(1115): 1-11.
24. Lu Mei, Xu Ling, Li Baoying, Zhang Weidong, Zhang Chengmei, Feng Hong, et al. Protective Effects of Grape Seed Proanthocyanidin Extracts on Cerbal Cortex of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats through Modulating AGEs/RAGE/NF-Kb Pathway. *J Nutr Vitaminol* 2010; 56:87-97.

۲۵. حسینی، رستگار. تأثیر تمرین هوازی و مکمل‌دهی ویتامین D برگیرنده فعال کننده تکثیر پراکسی زوم گاما، مقاومت به انسولین، پروفایل لیپیدی و چربی احشایی در موش¬های صحرایی اوارکتومی شده مبتلا به سندرم متابولیک. *پایان‌نامه دکترای تخصصی دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه گیلان* ۱۳۹٤.

26. Zhang Q, Xu L, Xia J, Wang D, Qian M, Ding S. Treatment of Diabetic Mice with a Combination of Ketogenic Diet and Aerobic Exercise via Modulations of PPARs Gene Programs. *Hindawi PPAR Research* 2018; Article ID 4827643:1-13.

۲۷. قلی‌زاده، مهدی؛ کردی، محمدرضا؛ اکبرنژاد، علی. مقایسه تأثیر دو برنامه تمرین تناوبی با شدت بالا به مدت دوهفته بر اکسیداسیون چربی، درصد چربی بدن و VO2maxدر مردان جوان دارای اضافه وزن. *مجله آموزش و سلامت جامعه* ۱۳۹۵. دوره ۳ (شماره ۲): ۵ -٤۷.

THE EFFECT OF INTENSE PERIODIC TRAINING AND CONSUMPTION OF BLACK GRAPE SEED EXTRACT ON PPARA AND PPARΓ GENE EXPRESSION IN PANCREATIC TISSUE OF MALE RATS WITH TYPE 2 DIABETES

Bahareh Ghani*[1], Mahsa Mohsenzadeh[1], Fouad Faiz Elahi[1]

1. *Department of Physical Education and Sports Sciences, Islamic Azad University, Karaj Branch, Alborz, Iran*

ABSTRACT

Backgrond: Although some studies have studied the mechanism of action of beta cells in animal models and more or less in human populations, but so far the role of exercise therapy or exercise exercise HIIT along with black grape supplementation on the expression of involved genes Less has been studied in pancreatic beta cells, so the aim of the present study was to investigate the effect of eight weeks of intense intermittent exercise with black grape supplementation on the expression of PPARα and PPARγ gene in pancreatic tissue of male rats with type 2 diabetes.

Methods: The study was conducted in the form of an experimental design. The subjects of this project were 40 8-month-old male rats with an average weight of 250 grams. After familiarizing the subjects with exercise and induction of diabetes by STZ, the subjects were randomly divided into 5 groups including exercise, supplement, exercise and supplement, diabetic control and basic control. After 8 weeks of training, 5 sessions per week for 8 weeks with 90% Vo2max activity and supplementation of black grape seed extract, PPARα and PPARγ genes were measured after RNA extraction from pancreas and cDNA synthesis. PPARα and PPARγ genes were measured by Time-Real PCR. Data were analyzed using independent t-test and two-factor analysis of variance at a significance level of 0.05 by SPSS software version 24.

Results: The effect of exercise with consumption of black grape seed extract on the expression of PPARγ and PPARα genes in the pancreas of diabetic rats was not significant, but exercise alone significantly increased the expression of PPARα gene in the pancreatic tissue of diabetic specimens. Consumption of black grape seed extract alone significantly increased the expression of PPARγ and PPARα genes.

Conclusion: It seems that regulating the expression of PPARα and PPARγ genes through exercise and consumption of black grape seed extract may lead to the improvement and maintenance of pancreatic beta cell function in diabetic rats.

Keywords: Diabetes, Intense Interval Exercise (HIIT), Black Grape Seed Extract, PPARα Protein, PPARγ Protein, Pancreas

* Imam Ali Complex, Moazen Blvd, Karaj, Alborz, Iran. Tel: 02634259571, Postal code: 3149968111, Fax: 34418156, Email: bahar1986.gh@gmail.com