

بررسی تأثیر ۶ هفته تمرین استقامتی بر سطوح پروتئین‌های GLUT4 و HDAC5 در عضله‌ی نعلی موش‌های صحرایی دیابتی

محمدشریف باقری^۱، وحید ولی پور دهنو^{۲*}، احمد همت‌فر^۱

چکیده

مقدمه: افزایش بیان هیستون داستیلاز ۵ (HDAC5) موجب کاهش بیان انتقال دهنده‌ی شماره ۴ گلوکز (GLUT4) در عضله‌ی کند انقباض می‌شود و این سازوکار در دیابت بررسی نشده است. بنابراین، هدف پژوهش حاضر بررسی اثر شش هفته تمرین استقامتی بر سطوح پروتئین‌های GLUT4 و HDAC5 در عضله‌ی نعلی موش‌های صحرایی دیابتی بود.

روش‌ها: به این منظور تعداد ۳۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار (وزن: $245 \pm 9/4$ گرم) به‌طور تصادفی به چهار گروه کنترل (۸ سر)، تمرین (۸ سر)، دیابت (۸ سر) و دیابت تمرین (۸ سر) تقسیم شدند. در سن ۸ هفتگی، دیابت به‌وسیله‌ی تزریق استرپتوزوتوسین (۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) ایجاد شد. پروتکل تمرین استقامتی با شدت متوسط و پیشرونده به‌مدت ۶ هفته و ۵ جلسه در هفته انجام شد. ۲۴ ساعت پس از اتمام پروتکل تمرینی، موش‌ها تشریح و بافت عضله‌ی نعلی آنها استخراج گردید. سپس محتوی GLUT4 و HDAC5 به روش الایزا اندازه‌گیری شد. برای تحلیل داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک راه در سطح معناداری $P < 0/05$ استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد بین گروه‌های کنترل و تمرین ($P = 0/008$)، تمرین و دیابت تمرین ($P = 0/004$) و تمرین و دیابت ($P = 0/0005$) تفاوت معناداری در سطوح GLUT4 وجود دارد. اما، در مورد متغیر HDAC5، نتایج نشان داد که تنها بین دو گروه کنترل و تمرین تفاوت معناداری وجود ندارد ($P = 0/99$) و بین بقیه‌ی گروه‌ها تفاوت معناداری وجود دارد ($P < 0/05$). همچنین، رابطه‌ی معکوس معناداری بین سطوح پروتئین‌های GLUT4 و HDAC5 وجود دارد ($r = -0/439$ و $P = 0/012$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد شش هفته تمرین استقامتی با شدت متوسط سطوح پروتئین GLUT4 را افزایش می‌دهد اما تمرین استقامتی، تنها می‌تواند سطوح پروتئین HDAC5 را در بیماری دیابت کاهش دهد.

واژگان کلیدی: دیابت، گلوکز، تمرین استقامتی، GLUT4، HDAC5

۱- گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، بروجرد، ایران

۲- گروه علوم ورزشی، دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

* **نشانی:** خرم‌آباد، کیلومتر ۵ جاده تهران، سازمان مرکزی دانشگاه لرستان، دانشکده ادبیات، گروه علوم ورزشی، تلفن: ۹۸۶۶۳۳۱۲۰۰۸۶

پست الکترونیک: valipour.v@lu.ac.ir

مقدمه

بیماری کاردیومتابولیکی (Cardiometabolic disease) به‌عنوان یک اپیدمی جهانی، ترکیبی از بی‌نظمی‌های متابولیکی است که به دیابت نوع دو و بیماری‌های قلبی منجر می‌شود و می‌تواند ناشی از عوامل محیطی و وراثتی باشد [۱]. از این میان، دیابت گروهی از بیماری‌های متابولیکی است که به علت هایپرگلیسمی (Hyperglycemia) ناشی از نقص در ترشح انسولین یا عملکرد انسولین به‌وجود می‌آید. به هر حال، هایپرگلیسمی مزمن با آسیب‌های بلند مدت، اختلال در عملکرد و نارسایی اندام‌های مختلف به‌ویژه چشم‌ها، کلیه‌ها، اعصاب و قلب و عروق مرتبط است [۲].

در یک مرد ۷۰ کیلوگرمی عضله‌ی اسکلتی تقریباً ۴۰ درصد کل وزن بدن را تشکیل می‌دهد و بزرگترین بافت برای مصرف حداقل ۸۰ درصد از کل گلوکز تحریک شده به‌وسیله‌ی انسولین است. با این حال، مصرف عضلانی گلوکز در بیماران دیابتی نوع ۲ دچار اختلال می‌شود [۳]. گلوکز از طریق یک سری پروتئین‌های انتقال دهنده به‌نام GLUTs (Glucose Transporters) از عرض غشاء عبور می‌کند. از بین آنها GLUT4 به‌طور عمده در سلول‌های حساس به انسولین مثل بافت چربی، عضله‌ی اسکلتی و عضله‌ی قلبی بیان می‌شود [۴]. با بررسی میزان GLUT4 در افراد مبتلا به دیابت نوع دو مشاهده شده است که بیان این پروتئین در سطح طبیعی وجود دارد اما میزان انتقال آن به سطح سلول کاهش یافته است [۵].

بیان ژن GLUT4 در حالت‌های فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی متفاوتی مثل تمرین ورزشی، روزه‌داری، مقاومت به انسولین و دیابت نوع دو تغییر می‌کند [۶]. چندین مطالعه نشان داده‌اند که تمرینات استقامتی با شدت متوسط و کم باعث افزایش محتوی GLUT4 در عضلات اسکلتی موش‌ها می‌شود. این سازگاری ناشی از تمرینات ورزشی در افزایش GLUT4 باعث افزایش انسولین تحریک شده و انتقال گلوکز به داخل عضله می‌شود [۷]. این سازگاری می‌تواند دلیلی باشد که چرا ورزش به‌طور وسیع برای جلوگیری و درمان دیابت نوع دو به‌کار می‌رود. این اطلاعات پیشنهاد می‌کنند که تنظیم بیان ژن GLUT4 از طریق ورزش ممکن است به‌عنوان یک نقطه‌ی تعاملی بالقوه برای درمان دیابت نوع دو به‌کار گرفته شود [۸].

آنزیم‌های تنظیم کننده استیل‌اسیون هیستون‌ها (HATs) و آنزیم‌های تنظیم کننده استیل‌اسیون هیستون‌ها (HATs) (acetyl transferase) و HDACs (Histone deacetylase) هستند. HATs یک گروه استیل را به انتهای پروتئین لیزین (Lysine) اضافه می‌کنند در حالی که HDACs آنها را جدا می‌کنند [۹]. خانواده HDACs که عمدتاً در هسته و سیتوپلاسم قرار دارند آنزیم‌هایی هستند که از بیان ژن GLUT4 جلوگیری می‌کنند [۱۰]. از بین HDACs، نشان داده شده که (5' AMP-activated protein kinase) AMPK نسخه‌برداری از GLUT4 را از طریق HDAC5 که مانع نسخه‌برداری می‌شود، تنظیم می‌کند [۱۰]. از سوی دیگر تحقیقات گذشته نشان داده‌اند که دو مسیر عمده‌ی پیام‌رسانی ترجمه‌ی پروتئین GLUT4 و انتقال آن به سطح سلول، مسیرهای AMPK و MEF (Myocyte enhancer factor) هستند که موجب ترجمه‌ی پروتئین GLUT4 و انتقال آن از منابع ذخیره به سطح غشای سلول می‌گردند [۱۱]. HDAC5 یکی از اعضای این خانواده است که در عضلات اسکلتی وجود دارد و نشان داده شده که HDAC5 در بسیاری از مسیرهای پیام‌رسانی ترجمه‌ی پروتئین دخالت دارد. از سوی دیگر نشان داده شده ورزش موجب افزایش بیان GLUT4 می‌شود و این سازگاری برای پیشگیری و درمان دیابت سودمند به‌نظر می‌رسد [۱۲]. مطالعات اخیراً نشان داده‌اند که بیش‌بینی HDAC5 در عضلات اسکلتی موش‌ها برای سازگاری با تمرینات ورزشی کفایت [۱۳]. نشان داده شده که به‌دنبال یک جلسه‌ی تمرین ورزشی میزان HDAC5 هسته‌ای کاهش پیدا می‌کند، بنابراین پیشنهاد شده که HDAC‌های دسته دوم و کروماتین‌ها می‌توانند تنظیم کننده‌های بحرانی سازگاری با تمرینات ورزشی باشند [۱۴]. افزایش بیان HDAC دسته دوم باعث می‌شود که بیان تارهای کند سرکوب شود [۱۳]. بنابراین HDAC دسته دوم شکل‌گیری تارهای نوع کند و اکسیداتیو را سرکوب می‌کند که این سرکوب از طریق مهار فعالیت MEF2 صورت می‌گیرد [۱۵]. خانواده‌ی HDAC دسته دوم متابولیسم اکسیداتیو و نوع فیبر عضله‌ی اسکلتی را تنظیم می‌کنند [۱۶]. مطالعات اخیر نشان داده که بیش‌بینی HDAC5 در عضلات اسکلتی موش‌ها سازگاری به تمرینات استقامتی را تضعیف می‌کنند [۱۳]. GLUT4 مثل دیگر ژن‌های وابسته به MEF2، به وسیله به‌کارگیری HDAC‌های دسته دوم و HDAC5 تنظیم می‌شود [۱۷]. شواهد متعددی از نقش HDAC‌های دسته دوم و HDAC5 در تنظیم رونویسی پیش‌برنده‌های GLUT4 در سلول

روش ایجاد دیابت

پس از یک هفته آشنایی با محیط آزمایشگاه و نوارگردان، ۱۶ سر از موش‌های صحرایی مورد القای دیابت با استرپتوزوتوسین (Streptozotocin, Sigma, USA) (۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) درون صفاقی قرار گرفتند. پس از تأیید دیابت، ۳۲ موش به روش تصادفی به ۴ گروه ۸ تایی بدین شرح تقسیم شدند: ۱- گروه دیابت تمرین ۲- گروه دیابت ۳- گروه سالم تمرین و ۴- گروه کنترل سالم. همچنین موش‌های گروه‌های تمرینی، به مدت ۶- هفته و هر هفته ۵ جلسه تمرین استقامتی انجام دادند. بدین منظور تمامی جلسات تمرین در پایان سیکل خواب حیوانات در عصر و دامنه زمانی ساعت ۱۸-۱۶ صورت پذیرفت. برای برآورد اثرات تمرین استقامتی، حیوانات ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی تشریح شدند و بافت عضله‌ی نعلی آنها استخراج گردید [۲]. لازم به ذکر است که تمامی گروه‌ها همزمان تشریح شدند و کلیه‌ی مراحل و آزمایش‌ها در تمام گروه‌ها به شکل مشابه انجام گرفت.

در سن ۸ هفتگی، پس از ۱۲ ساعت محرومیت از غذا، با تزریق درون صفاقی محلول STZ (Sigma, St. Louis, MO) ۵۰ mg/Kg حل شده در بافر سیترات تازه (۰/۵ mol/L، pH: ۴/۵) دیابت القاء گردید [۱۹]. به موش‌های غیر دیابتی نیز معادل حجمی بافر سیترات تزریق گردید. ۴۸ ساعت پس از تزریق، با ایجاد یک جراحت کوچک توسط لانسیت بر روی ورید دم، یک قطره خون بر روی نوار گلوکومتری قرار گرفت و نوار توسط دستگاه گلوکومتر (Roche Diagnostics K.K., Tokyo, Japan) اندازه‌گیری و موش‌هایی که قند خون آن‌ها بالاتر از ۳۰۰ mg/dL بود، به‌عنوان دیابتی در نظر گرفته شدند. با توجه به این که قند خون تمامی موش‌های صحرایی مورد تزریق قرار گرفته بالاتر از این مقدار بود، القاء دیابت در تمام ۱۶ موش صحرایی گروه‌های دیابتی تأیید شد. برای اطمینان از عدم بازگشت قند خون در خلال دوره تمرینی، قند خون موش‌ها هر ۱۴ روز یکبار به‌طور منظم اندازه‌گیری می‌شد [۲۰].

پروتکل تمرینی

در پژوهش حاضر از تمرین استقامتی با شدت متوسط (۵۵-۵۰ حداکثر اکسیژن مصرفی) (Percentage of maximum oxygen)

های چربی‌ها حمایت می‌کنند [۶]. همچنین، ورود HDAC5 به درون هسته در بافت قلب به‌طور معناداری بیان GLUT4 را کاهش داده است. بنابراین، افزایش در بیان GLUT4 در هنگام ورزش با کاهش بیان MEF2 و HDAC5 ارتباط دارد [۱۸]. از این‌رو در پژوهش حاضر سعی بر آن است که تأثیر ۶ هفته تمرین استقامتی بر سطوح پروتئین‌های GLUT4 و HDAC5 در تار کند انقباض عضله‌ی اسکلتی موش‌های صحرایی دیابتی بررسی شود. براساس دانش ما تا کنون پژوهشی اثر تمرینات استقامتی بر سطوح پروتئین‌های GLUT4 و HDAC5 در تار کند انقباض در حالت فیزیولوژیک و پاتولوژیک مانند بیماری دیابت را بررسی نکرده است. به‌طور کلی، هدف پژوهش حاضر یافتن پاسخ این سوال است که آیا تمرینات استقامتی، به‌عنوان یک روش غیردارویی قادر به تعدیل سطوح پروتئین‌های GLUT4 و HDAC5 در عضله‌ی کند انقباض خواهند بود؟

روش‌ها

نمونه و نوع تحقیق: پژوهش حاضر از نوع تجربی با طرح پس آزمون به همراه گروه کنترل بود و به شیوه‌ی آزمایشگاهی با کد IR.IAU.B.REC.1397.001 از کمیته‌ی اخلاق در پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد انجام شد.

۳۲ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده‌ی وزنی ۲۴۵±۹/۴ گرم و سن ۸-۱۰ هفته به‌طور تصادفی به‌عنوان نمونه انتخاب شدند. تمامی موش‌ها در اتاقی در محل نگه‌داری حیوانات مرکز تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی لرستان نگه‌داری شدند. موش‌ها در گروه‌های سه تایی در محیطی با میانگین دمای ۲۲±۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و چرخه‌ی روشنایی-تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت در قفس‌های مخصوص از جنس پلی‌کربنات نگه‌داری شدند. تمامی حیوانات به آب و غذای ویژه‌ی موش، دسترسی آزاد داشتند. غذای موش‌ها از شرکت خوراک دام پارس تهران تهیه شد. در تمام مراحل پژوهش، موش‌ها توسط یک نفر جابجا و دستکاری شدند. در پژوهش حاضر، کار با حیوانات براساس کلیه‌ی اصول اخلاقی تأیید شده توسط کمیته‌ی اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد و دستورالعمل‌های سازمان بین‌المللی مطالعه‌ی درد (International Association for the Study of Pain) انجام پذیرفت.

(هفته ششم) ثابت نگه‌داشته شدند. همچنین در این پروتکل، ۳ دقیقه برای گرم کردن و ۳ دقیقه نیز برای سرد کردن در نظر گرفته شد. در مدت زمان انجام پروتکل تمرینی، خستگی شدید در آزمودنی‌ها مشاهده نشد. لازم به ذکر است که خستگی شدید موجب بالا رفتن لاکتات خون می‌گردد و از این طریق ممکن است عوارض دیابت را افزایش دهد [۲۱]. پروتکل تمرینی در جدول شماره ۱ آورده شده است.

consumption) براساس مطالعه Coskun و همکاران استفاده شد [۱۹]؛ بدین‌صورت که گروه‌های ورزشی در معرض تمرین نوارگردان (تردمیل حیوانی مدل آذرخش، شرکت مهندسی پیشرو اندیشه صنعت، ایران) برای ۵ جلسه در هفته و به مدت ۶ هفته قرار گرفتند. سرعت و مدت تمرین نوارگردان به تدریج افزایش یافت. جهت رسیدن به سازگاری‌های به‌دست آمده در حالت یکنواخت، تمامی متغیرهای تمرینی در هفته‌ی پایانی

جدول شماره ۱- پروتکل تمرینی

هفته‌ها	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم	هفته	هفته
مدت تمرین (دقیقه)	۱۰	۲۰	۲۰	۳۰	۳۰	۳۰
سرعت نوارگردان (متر بر	۱۰	۱۰	۱۵	۱۵	۱۸	۱۸

روش‌های آزمایشگاهی

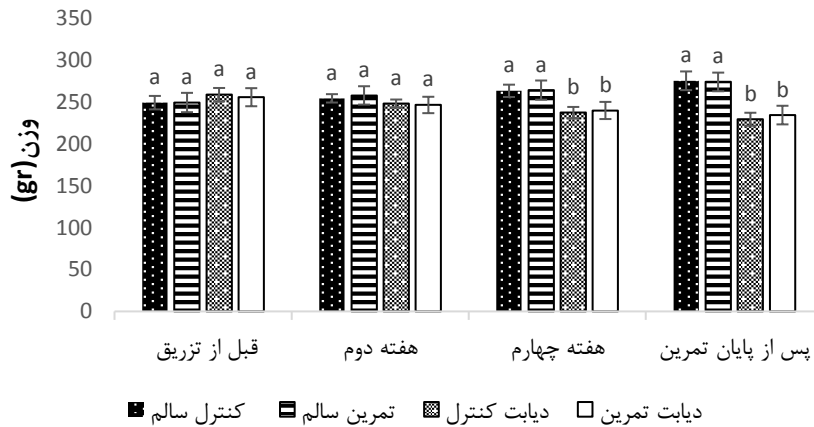
بیست و چهار ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، موش‌ها توسط تزریق درون صفاقی ترکیب کتامین (۷۵ mg/kg-1) و زایلازین (۵ mg/kg-1) بیهوش شدند و تحت شرایط استریل بافت عضله‌ی نعلی (Soleus) آنها به‌عنوان یک عضله‌ی کند انقباض، جدا شد و در داخل فریزر با دمای منفی ۷۰ درجه‌ی سانتیگراد برای تجزیه و تحلیل بعدی نگه‌داری شدند [۲۲]. به منظور سنجش سطوح پروتئین‌های GLUT4 و HDAC5 عضله‌ی نعلی از کیت‌های الایزا (GLUT4): حساسیت: ۰/۰۳۹ نانوگرم/میلی‌لیتر، دامنه تشخیص: ۱۰-۱۵۶/۰ نانوگرم/میلی‌لیتر و HDAC5: حساسیت: ۰/۱ نانوگرم/میلی‌لیتر، دامنه‌ی تشخیص: ۸-۲۵/۰ نانوگرم/میلی‌لیتر، کازابایو، ژاپن) و براساس دستورالعمل شرکت مربوطه استفاده شد. به‌طور خلاصه، ابتدا بافت با محلول بافر خنک (PBS) جهت خارج کردن خون اضافه، شستشو داده شد. سپس بافت را در یک ظرف حاوی یک میلی‌لیتر بافر لیز کننده قرار داده و ظرف در یخ قرار داده شد. (قبلاً بافت وزن شده بود) مخلوط حاصل به‌وسیله سونیکیت بخوبی هموژن شد و مخلوط هموژنه در 5000 g به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد و محلول رویی جهت سنجش، بلافاصله در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منجمد شد. سطوح گلوکز سرمی نیز با استفاده از روش بیوشیمیایی اندازه‌گیری شد.

تحلیل آماری

نتایج آزمون شاپیرو-ویلک نشان داد که داده‌ها از توزیع طبیعی برخوردارند. همچنین، برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. سطح معنی‌داری $p < 0/05$ در نظر گرفته شد. برای تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۴ استفاده شد.

یافته‌ها

موش‌های گروه‌های سالم تمرین و دیابتی تمرین به‌طور مستمر پروتکل ۶ هفته‌ای تمرین استقامتی را انجام دادند. با مشاهده نتایج آماری مشخص شد میانگین وزن موش‌ها قبل از تزریق دارای اختلاف معنی‌داری نبود ($P > 0/05$). اما در پایان پروتکل تمرینی، وزن گروه‌های دیابتی در مقایسه با گروه‌های غیردیابتی به‌طور معناداری کاهش داشت ($P < 0/05$). به‌طوری‌که وزن گروه دیابت نسبت به گروه کنترل سالم و وزن گروه دیابت تمرینی نسبت به گروه تمرینی سالم به‌طور معنی‌داری کمتر بود (به‌ترتیب $P = 0/003$ و $P = 0/004$). این در حالی بود که میانگین وزن گروه‌های تمرینی سالم و کنترل سالم اختلاف معنی‌داری نداشت ($P = 0/09$). همچنین، با وجود مشاهده افزایش وزن گروه دیابت تمرینی نسبت به گروه دیابت پس از شش هفته تمرین، این افزایش معنادار نبود ($P = 0/08$) (نمودار ۱).

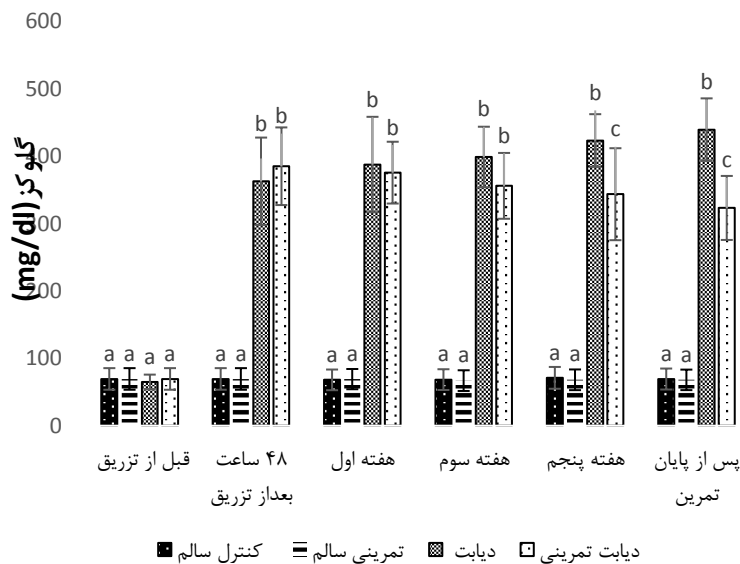


نمودار ۱- تغییرات وزن (Mean±SEM) در گروه‌های مختلف

حروف نامتشابه بیانگر وجود اختلاف آماری معنی دار در بین گروه‌ها است (P<۰/۰۵).

گروه دیابت به شکل معنی داری کمتر بود (P=۰/۰۰۱) (نمودار ۲). این نتایج نشان می‌دهد که تزریق STZ، موجب شده سطوح گلوکز خون در گروه‌های دیابتی نسبت به گروه‌های غیر دیابتی افزایش یابد. از سوی دیگر تمرین استقامتی، دارای اثرات عکس آن بوده و موجب کاهش سطوح گلوکز خون، در گروه دیابت تمرینی شد.

با اندازه‌گیری گلوکز خون، مشخص شد موش‌های دیابتی ۴۸ ساعت بعد از تزریق استرپتوزوتوسین، دچار هایپرگلیسمی شدند و پیش از شروع تمرین میزان گلوکز خون گروه دیابتی به‌طور معنی داری بالاتر از گروه سالم بود (P=۰/۰۰۱) و این اختلاف معنی دار در طول ۶ هفته پروتکل تمرین استقامتی بین گروه‌های دیابتی و غیردیابتی وجود داشت (P=۰/۰۰۱). همچنین بعد از اتمام پروتکل تمرین، غلظت گلوکز خون گروه دیابت تمرینی از



نمودار ۲- سطح سرمی گلوکز ناشتا (Mean±SEM) در گروه‌های مختلف

حروف نامتشابه بیانگر وجود اختلاف آماری معنی دار در بین گروه‌ها است.

برای بررسی برابری واریانس‌ها و نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه در جدول ۳ آورده شده است.

نتایج توصیفی سطوح برای پروتئین‌های GLUT4 و HDAC5 عضله‌ی نعلی در جدول ۲ آورده شده است. نتایج آزمون لون

جدول ۲- میانگین و انحراف استاندارد تغییرات سطوح پروتئین‌های GLUT4 و HDAC5 عضله‌ی Soleus در گروه‌های مختلف (میانگین \pm انحراف استاندارد)

متغیرها	کنترل	دیابت	تمرین	دیابت تمرین
GLUT4 (ng/ml)	۰/۶۵ \pm ۰/۰۸	۰/۵۴ \pm ۰/۰۶	۰/۸۰ \pm ۰/۱۱	۰/۶۳ \pm ۰/۰۹
HDAC5 (ng/ml)	۱/۱۸ \pm ۰/۰۹	۱/۵۳ \pm ۰/۱۱	۱/۱۷ \pm ۰/۱۴	۱/۳۷ \pm ۰/۱۲

جدول ۳- نتایج آزمون‌های لون و تحلیل واریانس یک‌طرفه

متغیرها	مقدار **F	مقدار ***F
GLUT4	۰/۷۷۶	۱۲/۰۶۷*
HDAC5	۰/۷۰۹	۱۷/۱۶۸*

*: تفاوت معنادار بین گروه‌ها، حجم نمونه=۳۲
آزمون لون، * آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه

تفاوت معناداری بین سایر گروه‌ها وجود نداشت به این معنا که دیابت کاهش غیرمعناداری را ایجاد کرد و تمرین در گروه دیابتی افزایش غیرمعناداری را موجب شد.

Yaspelkis و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند موش‌هایی که تمرینات هوازی را ۳ روز در هفته برای ۱۲ هفته انجام داده بودند در مقایسه با گروه کنترل میزان ترشح انسولین و مصرف گلوکز بیشتری را در عضله‌ی نعلی و فیبرهای گلیکولیتیکی و اکسیداتیو نشان دادند [۲۳] که بیانگر این واقعیت است که تمرین در گروه دیابتی باعث افزایش بیان GLUT4 و مصرف گلوکز بیشتر شده است.

همچنین، Hussey و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که شبیه آزمودنی‌های کنترل سالم، تمرینات استقامتی ظرفیت اکسیداتیو و محتوی GLUT4 عضله‌ی افراد مبتلا به دیابت نوع دو را افزایش می‌دهد که با نتایج تحقیق حاضر ناهمسو است [۲۴]. این نتیجه متناقض شاید به علت تفاوت‌ها در شدت، مدت و حجم تمرین باشد.

تمرینات استقامتی باعث تغییر در مسیرهای متابولیکی همچنین منجر به نسخه‌برداری از GLUT4 می‌شوند. در پژوهشی Neuffer

با توجه به نتایج جدول ۳، مشخص می‌شود که تفاوت معناداری بین حداقل دو گروه در متغیرهای مورد بررسی وجود دارد. در ادامه برای بررسی اینکه کدام گروه‌ها با هم اختلاف معنادار دارند از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد که نتایج نشان داد بین گروه‌های کنترل و ورزش ($P=۰/۰۰۸$)، ورزش و دیابت و ورزش و دیابت و ورزش ($P=۰/۰۰۰۵$) تفاوت معناداری در سطوح GLUT4 وجود دارد. اما، در مورد متغیر HDAC5، نتایج نشان داد که تنها بین دو گروه کنترل و ورزش تفاوت معناداری وجود ندارد ($P=۰/۹۹$) و بین بقیه گروه‌ها تفاوت معناداری وجود دارد ($P<۰/۰۵$). همچنین، رابطه‌ی معکوس معناداری بین سطوح پروتئین‌های GLUT4 و HDAC5 در عضله‌ی نعلی وجود دارد ($P=۰/۰۱۲$ و $r=-۰/۴۳۹$).

بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش تأثیر ۶ هفته تمرین استقامتی بر سطوح پروتئین‌های HDAC5 و GLUT4 عضله‌ی نعلی موش‌های صحرايي دیابتی بررسی شد. نتایج نشان داد که محتوای GLUT4 در گروه تمرین نسبت به سایر گروه‌ها به‌طور معناداری افزایش یافت و

در داخل سلول عضله با هم مرتبط هستند، اما به نظر می‌رسد که به‌طور مستقل تنظیم می‌شوند. نشان داده شده که افراد دارای مقاومت به انسولین یا دیابت نوع دو دارای فنوتیپ عضلانی متمایز با کاهش فیبرهای عضلانی کند انقباض اکسیداتیو، کاهش بیان GLUT4 در فیبرهای عضلانی کند انقباض و اختلال عملکرد میتوکندری عضله اسکلتی هستند [۲۹].

همچنین، نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که سطوح پروتئین HDAC5 تنها بین دو گروه تمرین و کنترل معنادار نبود به این معنا که تمرین در گروه سالم کاهش غیرمعناداری ایجاد کرده است، اما در سایر گروه‌ها تفاوت معناداری در سطوح پروتئین HDAC5 مشاهده شد به این معنا که دیابت افزایش معناداری را ایجاد کرد و تمرین در گروه دیابت نیز نسبت به گروه دیابت کاهش معناداری را ایجاد کرد. این نتایج بیانگر این است که در مورد پروتئین HDAC5 ورزش در گروه سالم تأثیر معناداری ندارد اما در گروه دیابت تأثیر معنادار داشته است. MCGee و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که HDAC5 ژن GLUT4 را سرکوب می‌کند.

با این حال، تاکنون هیچ مطالعه‌ای این موضوع را در بیماری دیابت بررسی نکرده که آیا اعضای HDAC کلاس دوم متابولیسم گلوکز را در سلول‌های عضلانی اسکلتی تنظیم می‌کند یا خیر. حذف HDAC5 باعث افزایش جذب گلوکز در سلول‌های عضلانی انسان و موش شده که با افزایش فعالیت پیش‌ساز GLUT4 در دو نوع سلول مورد بررسی همراه بوده است. این که آیا افزایش جذب گلوکز با حذف HDAC5 تنها به دلیل افزایش بیان GLUT4 است، مشخص نیست. با این حال Czubyrt و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که HDAC5 تعدادی از ژن‌های دخیل در متابولیسم گلوکز از جمله هگزوکیناز II و گلیکوژن فسفوریلاز را سرکوب می‌کند. با این وجود، سازوکارهایی که HDAC5 میزان جذب گلوکز و عملکرد انسولین را تنظیم می‌کند، مهم هستند، زیرا این فرایندها در بیماری‌های متابولیکی مانند چاقی و دیابت نوع دو تنظیم می‌شوند. بنابراین، مطالعه HDAC کلاس دو در عضلات می‌تواند یک راهبرد درمانی مؤثر برای عادی‌سازی این نقص‌ها در حالت بیماری متابولیک باشد. نشان داده شده است که فسفوریلاسیون HDAC5 به‌وسیله‌ی AMPK و در نتیجه خروج آن از هسته، بیان ژن GLUT4 (SLC2A4) را افزایش می‌دهد. این نشان می‌

و همکاران (۱۹۹۲) با مطالعه بر روی موش‌های ویستار که تمرین استقامتی را برای یک روز، یک هفته و شش هفته انجام داده بودند، با نمونه‌برداری از عضله‌ی نعلی و پهن جانبی و مقایسه با گروه کنترل، تفاوت معنی‌داری در میزان GLUT4 در حیواناتی که یک روز و یک هفته تمرین استقامتی کرده بودند، مشاهده نکردند. اما نتایج تمرینات استقامتی برای شش هفته نشان داد که محتوای GLUT4 در غشاء عضله‌ی نعلی افزایش پیدا کرده است که ناهمسو با نتایج پژوهش حاضر است [۲۵]. در تحقیقی دیگر Luciano و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند که بیان GLUT4 و مصرف گلوکز در عضله‌ی دو قلو موش‌های ویستار بعد از ۶ هفته شنا کردن افزایش داشته که این تغییرات همراه با افزایش ترشح انسولین بوده است [۲۶]. در تحقیق حاضر نشان داده شد که سطح پروتئین GLUT4 در گروه دیابت تمرین نسبت به گروه دیابت افزایش غیرمعناداری داشته است. Zhaosheng و همکاران (۲۰۰۵) در مطالعه‌ی خود روی موش‌های دیابتی نشان دادند که میزان بیان پروتئین GLUT4 در عضله‌ی اسکلتی موش‌های دیابتی نسبت به گروه کنترل تا حدود ۳۰ درصد پائین‌تر بود. Hussey و همکاران (۲۰۱۱) در آزمودنی‌های انسانی گزارش کردند بیان پروتئین GLUT4 بافت چربی ۴۳ درصد در بیماران دیابتی در مقایسه با گروه کنترل پائین‌تر بود.

انسولین در تنظیم بسیاری از عملکردهای بدن نقش دارد که یکی از آنها بیان ژن GLUT4 است. قرارگیری این پروتئین در بافت عضلانی و چربی نقش حیاتی را در تنظیم گلوکز خون ایفا می‌کند [۲۷].

گزارش شده که در بیماران با مقاومت انسولینی، این فرآیند متابولیک در بافت عضلانی و بافت چربی دچار اختلال می‌شود و این بافت‌ها توانایی خود را در پاسخ فیزیولوژیک به انسولین از دست می‌دهند [۲۸]. بنابراین تمرین استقامتی می‌تواند به عنوان یک عامل پیشگیری‌کننده مهم برای جلوگیری از عوارض بیماری دیابت در افراد دیابتی مد نظر قرار گیرد. در پاسخ به تمرینات ورزشی بیان پروتئین GLUT4 در انواع فیبرهای عضلانی کند انقباض و میتوکندری افزایش می‌یابد و جذب گلوکز به درون عضله‌ی تمرین کرده را تسهیل می‌کند. پروتئین GLUT4 در انواع فیبر کند انقباض به بالاترین حد بیان می‌شود. بنابراین، نوع فیبر عضلانی، میزان میتوکندری و فراوانی GLUT4

بیماران متابولیکی مانند دیابت نوع دو و چاقی تنظیم منفی شده است [۲۷]. McGee و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند که در طی تمرینات استقامتی HDAC5 از هسته‌ی عضلات اسکلتی انسان خارج می‌شود. Potthoff و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که بیش بیانی HDAC5 در عضلات اسکلتی موش‌ها سازگاری به تمرینات استقامتی را تضعیف می‌کند. پیشنهاد شده HDAC های کلاس ۲ می‌توانند به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های بحرانی سازگاری به تمرینات استقامتی در نظر گرفته شوند. همچنین، نشان داده شده که HDAC ها می‌توانند به‌عنوان یک روش مؤثر برای بیان ژن متابولیکی و متابولیسم در شرایطی مثل مقاومت انسولینی باشند. نسخه‌برداری و بیان GLUT4 برای مصرف گلوکز مهم هستند. بیش بیانی GLUT4 مصرف گلوکز تحریک شده به‌وسیله انسولین در موش‌ها را افزایش می‌دهد. نسخه‌برداری از GLUT4 به‌طور عمده به‌وسیله GEF (GLUT4 enhancer) متصل می‌شوند. از طریق مجموعه‌ی GEF و MEF2 (myocyte enhancer factor-2) تنظیم می‌شود که هر دو به اجزای نسخه‌برداری در پیش‌سازهای GLUT4 متصل می‌شوند. از طریق مجموعه‌ی GEF و MEF2، HDAC5 به‌عنوان یک بازدارنده نسخه‌برداری از GLUT4 به‌وسیله‌ی هیستون داستیلاسیون عمل می‌کند که تشکیل این مجموعه بازدارنده به‌وسیله‌ی فسفوریلاسیون HDAC5 از طریق AMPK و caMK تنظیم می‌شود و باعث آزادسازی HDAC5 از مجموعه می‌شود [۳۱].

به‌نظر می‌رسد شش هفته تمرین استقامتی با شدت متوسط سطوح پروتئین GLUT4 را افزایش می‌دهد اما تمرین استقامتی، تنها می‌تواند سطوح پروتئین HDAC5 را در بیماری دیابت کاهش دهد. بنابراین، پیشنهاد می‌شود مطالعاتی با استفاده از تمرین استقامتی با شدت‌های بالاتر یا در دوره‌های طولانی‌تر بررسی شود.

دهد که علاوه بر نقش HDAC5 در سرکوب تمایز عضلات، HDAC های کلاس دو همچنین می‌توانند نقش مهمی در متابولیسم گلوکز عضلانی داشته باشند [۳۰]. به هر حال، در مطالعه‌ی حاضر تمرین باعث خروج بیشتر HDAC5 از هسته در گروه‌های دیابت و تمرین دیابت شده است که با توجه به میزان GLUT4 گروه تمرین دیابت که نسبت به گروه دیابت به‌طور غیرمعنادار بالاتر بوده است، احتمالاً باعث بیان بیشتری در گروه تمرین دیابت نسبت به گروه دیابت شده است. تمرین باعث کاهش معنادار سطوح پروتئین HDAC5 در گروه دیابت تمرین شده است.

بنابراین، افزایش بیان GLUT4 در نتیجه تمرینات استقامتی با کاهش بیان HDAC5 متناسب است. در بررسی تعامل HDAC5 و GLUT4 تحقیق حاضر نشان داد که در گروه دیابت HDAC5 افزایش یافته که باعث کاهش بیان GLUT4 شده است. HDAC5 در گروه تمرین دیابت نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است که بیانگر این است که تمرین در گروه دیابت نتوانسته سطوح GLUT4 را بیشتر از گروه کنترل افزایش دهد. چون سطح GLUT4 در گروه تمرین دیابت نسبت به کنترل کاهش غیرمعنادار داشته است، اما HDAC5 در گروه تمرین دیابت نسبت به دیابت کاهش معنادار داشته است که با افزایش غیرمعنادار محتوی GLUT4 در گروه تمرین دیابت متناسب است.

اگرچه تأثیر HDAC5 بر متابولیسم گلوکز و عمل انسولین به‌طور مستقیم نشان داده نشده است، اما حذف HDAC5 در سلول های عضلانی انسان مصرف گلوکز را افزایش می‌دهد که با افزایش بیان GLUT4 و کاهش بیان GLUT1 همراه است. به هر حال، HDAC5 در تنظیم مصرف گلوکز و عمل انسولین در بیماران متابولیکی نقش مهمی دارد به‌طوری که این فرایند در

مآخذ

1. Yiew KH, Chatterjee TK, Hui DY, Weintraub NL. Histone deacetylases and cardiometabolic diseases. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2015; 35(9): 1914-9.
2. Kurd M, Valipour Dehnou V, Tavakoli SA, Gahreman DE. Effects of endurance training on hippocampus DJ-1, cannabinoid receptor type 2 and blood glucose concentration in diabetic rats. *Journal of diabetes investigation* 2019; 10(1): 43-50.
3. DeFronzo RA, Gunnarsson R, Björkman O, Olsson M, Wahren J. Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-

- dependent (type II) diabetes mellitus. *The Journal of clinical investigation* 1985; 76(1): 149-55.
4. Iqbal T, Van Deurs B, Ai H, Cushman SW, Ralston E. Analysis of GLUT4 distribution in whole skeletal muscle fibers: identification of distinct storage compartments that are recruited by insulin and muscle contractions. *The Journal of cell biology* 1998; 142(6): 1429-46.
 5. Higashida K, Tabata I, Higuchi M, Terada S. Regulation of skeletal muscle GLUT-4 expression by exercise and nutritional stimuli. *The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine* 2013; 2(3): 355-60.
 6. Weems J, Olson AL. Class II histone deacetylases limit GLUT4 gene expression during adipocyte differentiation. *Journal of Biological Chemistry* 2011; 286(1): 460-8.
 7. Honardoost M, Sarookhani MR, Arefian E. Molecular mechanism of insulin resistance. *JQUMS* 2014; 18(5): 57-64 (In Persian).
 8. Knight JB, Eyster CA, Griesel BA, Olson AL. Regulation of the human GLUT4 gene promoter: interaction between a transcriptional activator and myocyte enhancer factor 2A. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003; 100(25): 14725-30.
 9. McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN. Control of muscle development by dueling HATs and HDACs. *Current opinion in genetics & development* 2001; 11(5): 497-504.
 10. McGee SL, Hargreaves M. Histone modifications and skeletal muscle metabolic gene expression. *Clinical and experimental pharmacology and physiology* 2010; 37(3): 392-6.
 11. Ojuka EO, Goyaram V, Smith JA. The role of CaMKII in regulating GLUT4 expression in skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2012 Apr 10;303(3):E322-31.
 12. Stanford KI, Goodyear LJ. Exercise and type 2 diabetes: molecular mechanisms regulating glucose uptake in skeletal muscle. *Advances in physiology education* 2014; 38(4):308-14.
 13. Potthoff MJ, Wu H, Arnold MA, Shelton JM, Backs J, McAnally J, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. Histone deacetylase degradation and MEF2 activation promote the formation of slow-twitch myofibers. *The Journal of clinical investigation* 2007; 117(9): 2459-67.
 14. McGee SL, Hargreaves M. Exercise and myocyte enhancer factor 2 regulation in human skeletal muscle. *Diabetes* 2004; 53(5): 1208-14.
 15. Potthoff MJ, Olson EN. MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Development*. 2007; 134(23): 4131-40.
 16. McGee SL, Fairlie E, Garnham AP, Hargreaves M. Exercise-induced histone modifications in human skeletal muscle. *The Journal of physiology* 2009; 587(24): 5951-8.
 17. Sparling DP, Griesel BA, Weems J, Olson AL. GLUT4 enhancer factor (GEF) interacts with MEF2A and HDAC5 to regulate the GLUT4 promoter in adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 2008; 283(12): 7429-37.
 18. Czubryt MP, McAnally J, Fishman GI, Olson EN. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α (PGC-1 α) and mitochondrial function by MEF2 and HDAC5. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003; 100(4): 1711-6.
 19. Coskun O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and β -cell damage in rat pancreas. *Pharmacological research* 2005; 51(2): 117-23.
 20. Wei M, Ong L, Smith MT, Ross FB, Schmid K, Hoey AJ, Burstow D, Brown L. The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes. *Heart, Lung and Circulation* 2003; 12(1): 44-50
 21. Chen SR, Pan HL. Hypersensitivity of spinothalamic tract neurons associated with diabetic neuropathic pain in rats. *Journal of neurophysiology* 2002; 87(6): 2726-33.
 22. Goss G. Theory and Practice of Histological Techniques. LWW; 2009.
 23. Yaspelkis BB, Singh MK, Trevino B, Krisan AD, Collins DE. Resistance training increases glucose uptake and transport in rat skeletal muscle. *Acta Physiologica Scandinavica* 2002; 175(4): 315-23.
 24. Hussey SE, McGee SL, Garnham A, McConell GK, Hargreaves M. Exercise increases skeletal muscle GLUT4 gene expression in patients with type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2012; 14(8): 768-71.
 25. Neuffer PD, Shinebarger MH, Dohm GL. Effect of training and detraining on skeletal muscle glucose transporter (GLUT4) content in rats. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 1992; 70(9): 1286-90.
 26. Luciano E, Carneiro EM, Carvalho CR, Carnevali JB, Peres SB, Reis MA, Saad MJ, Boscherio AC, Velloso LA. Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. *European journal of endocrinology* 2002; 147(1): 149-57.
 27. Wood IS, Trayhurn P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *British journal of nutrition*. 2003 Jan;89(1):3-9.
 28. Bjornholm MZJ. Insulin signal transduction in human skeletal muscle identifying the defects in Type II diabetes. *Biochem Soc Trans* 2005;33354-7. doi.org/10.1042/BST0330354
 28. Raichur S, Hooi Teh S, Ohwaki K, Gaur V, Chau Long Y, Hargreaves M, McGee SL, Kusunoki J. Histone deacetylase 5 regulates glucose uptake and insulin action in muscle cells. *Journal of molecular endocrinology* 2012; 49(3): 203.
 29. Röckl KS, Witzak CA, Goodyear LJ. Signaling mechanisms in skeletal muscle: acute responses and chronic adaptations to exercise. *IUBMB life*. 2008 Mar;60(3):145-53.
 30. McGee SL, Van Denderen BJ, Howlett KF, Mollica J, Schertzer JD, Kemp BE, Hargreaves M. AMP-activated protein kinase regulates GLUT4

transcription by phosphorylating histone deacetylase 5. *Diabetes*. 2008 Apr 1;57(4):860-7.

31. Christensen DP, Dahllöf M, Lundh M, Rasmussen DN, Nielsen MD, Billestrup N, Grunnet LG, Mandrup-Poulsen T. Histone deacetylase (HDAC) inhibition as a novel treatment for diabetes mellitus. *Molecular medicine* 2011; 17(5): 378.

EFFECTS OF SIX WEEKS ENDURANCE TRAINING ON PROTEIN LEVELS OF GLUT4 AND HDAC5 IN SOLEUS MUSCLE IN DIABETIC RATS

Mohammad Sharif Bagheri¹, Vahid Valipour Dehnou^{2*}, Ahmad Hematfar¹

1. Department of Physical Education, Boroujerd Branch, Islamic Azad University, Boroujerd, Iran

2. Sports Sciences Department, Faculty of Literature & Human Sciences, Lorestan University, Khorramabad, Iran

ABSTRACT

Background: Increased expression of HDAC5 reduces the expression of GLUT4 in slow-twitch fibers, and this mechanism has not been studied in diabetes. Therefore, the purpose of study was to investigate the effect of six weeks endurance training on protein levels of GLUT4 and HDAC5 in soleus muscle in diabetic rats.

Methods: For this purpose, 32 male Wistar rats (weight: 245±9.4 g) were randomly divided into 4 groups: diabetic, diabetic and training, training, and control. At 8 weeks of age, diabetes was induced by streptozotocin. The endurance training was carried out five times per week for 6 weeks. 24 hours after the completion of the protocol, the mice were sacrificed and their soleus muscle was extracted. Then, the protein levels of GLUT4 and HDAC5 were measured using ELISA method. One-way ANOVA was used to analyze the data at a significant level of $P < 0.05$.

Results: Results showed significant differences between control and training ($P=0.008$), training and diabetic training ($P=0.004$), and training and diabetic ($P=0.0005$) groups in GLUT4 levels. But, in HDAC5, results showed that there is not significant differences only between control and training groups ($P=0.99$), and there are significant differences among other groups ($P < 0.05$). Also, there is a significant inverse relationship between the protein levels of GLUT4 and HDAC5 ($P=0.012$, $r = -0.439$).

Conclusion: It seems that six weeks moderate intensity endurance training increases protein levels of GLUT4. But endurance training only can decreases protein levels of HDAC5 in diabetes.

Keywords: Diabetes, Glucose, Endurance Training, GLUT4, HDAC5

*5th Kilometer of Khorramabad-Boroujerd Highway, Khorramabad, Lorestan, Iran. Postal code: 44316-68151, Tel: 98 66 3312 0086.
E-mail: valipour.v@lu.ac.ir