

تعدیل کاهش بیان ژن‌های اینترلوکین یک بتا ($IL-1\beta$)، فاکتور نکروز دهنده‌ی تومور آلفا ($TNF-\alpha$) و اینترلوکین ۱۰ ($IL-10$) متعاقب تمرین هم‌زمان (مقاومتی-استقامتی) در زنان دیابتی نوع دو

زهرة فتح الهیان^۱، امیرعباس منظمی^{۱*}، وحید تادیبی^۱، علی مصطفایی^۲

چکیده

مقدمه: هدف از تحقیق حاضر تعیین آثار تمرین هم‌زمان (مقاومتی-استقامتی) بر بیان ژن سایتوکاین‌های پیش التهابی و ضد التهابی در زنان دیابتی نوع دو بود.

روش‌ها: ۱۸ نفر از زنان دیابتی با محدوده‌ی سنی ۳۸-۳۰ سال به‌صورت تصادفی انتخاب و در سه گروه تمرین هم‌زمان (سالم ۶ نفر)، تمرین هم‌زمان (دیابتی ۶ نفر) و کنترل (۶ نفر) قرار گرفتند. پروتکل تمرینی هم‌زمان شامل اجرای تمرین مقاومتی به روش درون‌گرا سه ست ۸ تکراری با ۸۰ درصد یک تکرار بیشینه ($3\frac{80}{8}$) و سپس تمرین استقامتی دویدن بر روی تردمیل به مدت سی دقیقه (سه ست ۱۰ دقیقه‌ای) با شدت ۸۰-۷۰ درصد حداکثر ضربان قلب بود. میزان بیان ژن $mRNA$ ($IL-1\beta$, $IL-10$ and $TNF-\alpha$) از طریق تکنیک Real time-PCR و بیان کمی ژن‌ها با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه گردید. از آزمون آماری (permutation t-test) و آنوای یک راهه مستقل جهت تعیین تفاوت متغیرها استفاده گردید.

یافته‌ها: یافته‌های تحقیق نشان داد میزان بیان ژن اینترلوکین یک بتا و عامل نکروزدهنده‌ی تومور آلفا در زنان دیابتی نوع دو و گروه سالم یک ساعت بعد از فعالیت نسبت به گروه کنترل کاهش پیدا کرده است و این کاهش معنادار بوده است ($P<0.05$). علاوه بر این، نتایج تحقیق نشان داد که ژن اینترلوکین ۱۰ در لکوسیت زنان دیابتی نوع دو و گروه سالم یک ساعت بعد از تمرین بیان نشده است ($P>0.05$).

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از پژوهش حاضر بیانگر آن است که تمرین هم‌زمان موجب تعدیل بیان فاکتورهای پیش التهابی در زنان دیابتی می‌شود اما تغییری در عوامل ضدالتهابی ایجاد نکرده است. به‌نظر می‌رسد این نوع تمرینات هم‌زمان حاد بیشتر بر کاهش بیان عوامل پیش التهابی اثر دارند تا عوامل ضد التهابی.

واژگان کلیدی: دیابت نوع دو، تمرینات هم‌زمان، اینترلوکین یک بتا، فاکتور نکروزدهنده‌ی تومور آلفا و اینترلوکین ۱۰

۱- گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی علوم ورزشی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

۲- مرکز تحقیقات بیولوژیک دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

* نشانی: کرمانشاه، باغ ابریشم، دانشگاه رازی، دانشکده‌ی تربیت بدنی و علوم ورزشی، کد پستی: ۶۷۱۴۴۱۴۹۷۱، تلفن: ۰۸۳۳۴۲۷۳۲۷۲، نمابر:

۰۸۳۳۴۲۷۴۵۸۵، پست الکترونیک: monazzami.amirabbas@gmail.com

مقدمه

چاقی وضعیتی است که در اثر عدم تحرک، ژنتیک و مصرف غذای پرچرب به وجود می آید و اخیراً با التهاب خفیف شناخته شده که می تواند موجب مقاومت به انسولین شود و پیامد آن ایجاد بیماری های متابولیکی مانند دیابت نوع دو و بیماری های قلبی عروقی است [۱].

با افزایش سلول های چربی تولید آدیپوکاین از جمله سایتوکاین های التهابی از سلول های چربی افزایش می یابد و از طرف دیگر سایتوکاین ها و کموکاین های ضدالتهابی کاهش می یابد که در نهایت منجر به حالت التهاب سیستمیک خفیف می شود [۲]. در حال حاضر تصور می شود که وضعیت التهابی می تواند باعث پیشرفت مقاومت به انسولین شود [۳]. سایتوکاین هایی مثل TNF α ، IL-12 و IL1 β

در (Interleukine-12, Tumor necrosis factor α , Interleukine 1 β) ایجاد پاسخ های التهابی حاد و مزمن دخالت دارند. سایتوکاین ها بر سطح سلول های هدف به پذیرنده های اختصاصی خود متصل شده و مسیرهای انتقال پیام را آغاز کرده که در نهایت بیان ژن ها را در این سلول ها تغییر می دهند [۴]. سایتوکاین های پیش التهابی در ایجاد و پیشرفت التهاب دخیل هستند، IL-8، IL-1 β و IL-12 (Interleukine-12, Interleukine-1 β , Interleukine-8) مهم ترین سایتوکاین های پیش التهابی هستند [۵]. سایتوکاین های ضدالتهابی در پاسخ به التهاب ترشح می شوند و عامل محدودکننده و معکوس کننده فرآیند پیشرونده التهاب هستند [۶]. IL-10، IL-4 و IL1 (Interleukine-1, Interleukine-4, Interleukine-10) در این دسته از سایتوکاین ها قرار دارند. تولید سایتوکاین ها تحت تأثیر مجموعه ای محرک ها از جمله استرس هورمونی، استرس اکسیداتیو و فعالیت بدنی قرار می گیرند [۷]. همچنین IL1 β به عنوان آگونیست اصلی در از دست رفتن توده سلول های بتا در دیابت نوع دو مشخص شده است. در این بیماران مشخص شده است عدم تعادلی که در میزان آگونیست IL1 β در مقابل گیرنده آنتاگونیست IL1R α وجود دارد، موجب التهاب می شود [۸]. در دیابت نوع دو می توان با سرکوب التهاب و کاهش فعالیت IL1 β باعث کاهش مقاومت در برابر انسولین شد. نشان داده شده است که با انجام فعالیت ورزشی ستنز IL1 β کاهش می یابد [۹]. TNF α یکی دیگر از

سایتوکاین های پیش التهابی مورد بررسی است که سبب کاهش GLUT4 (glucose transporter-4) و مهار پیام رسانی و فعالیت گیرنده ی انسولین می شود. میزان TNF α در گردش و نیز میزان آن در بافت چربی افراد مقاوم به انسولین افزایش می یابد [۹، ۱۰]. در ابتدا منبع این سایتوکاین پیش التهابی سلول چربی فرض می شد. اما اخیراً ماکروفاژها به عنوان منشا TNF α شناخته می شوند. در سلول های چربی و ماهیچه ی اسکلتی TNF α فسفریلاسون IRS-1 (Insulin receptor substrate-1) را مهار کرده به طوری که پیام رسانی انسولین را کاهش می دهد. مطالعات invitro پیشنهاد کرده اند که IL10 از مقاومت به انسولین وابسته به TNF در سلول های چربی محافظت می کند. سازوکار مطرح این اثر هنوز مشخص نشده است. در ماکروفاژها IL10 پیام رسانی التهابی TNF α را به واسطه فعال سازی فاکتور رونویسی STAT3 و تغییر میزان رونویسی ژن التهابی تضعیف می کند [۱۱]. چگونگی تنظیم پاسخ های التهابی در پروتکل های ورزشی در افراد مختلف متفاوت است و تحقیقات موجود نشان می دهد فعالیت ورزشی براساس شدت و مدت انجام گرفته می تواند لکوسیت ها را فعال سازد [۱۲، ۱۳]. یک نوبت تمرین حاد و شدید با فعال سازی لکوسیت ها ممکن است منجر به آسیب پاسخ های دستگاه ایمنی شده و سرانجام به افزایش آسیب پذیری فرد، التهاب حاد و مزمن بیانجامد [۱۴] ورزش شدید با تغییرات ایمنی شناختی که شامل رهاسازی میانجی های التهابی، فعالیت انواع زیر واحدهای سلول های سفید خونی، فعالیت پروتئین های فاز حاد، افزایش فعالیت سایتوکاین های پیش التهابی و سرکوب سایتوکاین های ضدالتهابی و تغییراتی در شاخص های آسیب عضلانی است، همراه است [۱۵]. در مطالعه ای که توسط Louis و همکاران (۲۰۰۷) بر روی بیان ژن IL1 β ورزشکاران انجام گرفت، نشان داده شد که کاهش معنی داری در بیان ژن IL1 β متعاقب تمرین هوازی منظم در ورزشکاران به وجود می آید [۱۶]. در تحقیق دیگری که توسط Teixeira و همکاران (۲۰۱۱) انجام گرفت، نشان داده شد که فعالیت ورزشی هوازی و به صورت منظم در مونسیت ها باعث افزایش بیان ژن سایتوکاین های ضد التهابی IL10 و کاهش سایتوکاین های التهابی IL1، IL12، IL1 می گردد [۱۷]. همچنین در مورد تأثیر تمرینات مقاومتی بر کاهش مقاومت در برابر انسولین با تغییر بیان ژن و سطح سایتوکاین های دخیل در فرآیند التهاب در

سازوکارهای مسؤول تنظیم سایتوکاین را در هر دو شرایط تعیین گردد.

روش‌ها

این مطالعه از نوع نیمه‌تجربی با سه گروه که شامل گروه تمرینات هم‌زمان دیابتی (۶ نفر)، گروه تمرینات هم‌زمان سالم (۶ نفر) و گروه کنترل (۶ نفر) انجام شد. گروه‌های دیابتی از بین تعداد ۲۰ نفر زن دیابتی نوع دو ساکن شهرستان کرمانشاه با سابقه‌ی حداقل شش سال بیماری دیابت در محدوده‌ی سنی ۳۰-۳۸ سال و با شاخص گلاسمیک ۱۳۰-۲۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر ۱۲ نفر به‌صورت تصادفی انتخاب شدند. ۶ نفر گروه سالم نیز با دامنه‌ی سنی ۳۰-۳۸ سال و داشتن معیارهای ورود به تحقیق به‌طور تصادفی از بین ۲۰ نفر انتخاب شدند. معیارهای ورود به تحقیق شامل نداشتن سابقه‌ی ابتلا به بیماری‌های قلبی- عروقی، فشارخون، دخانیات، فعالیت ورزشی و مصرف داروهای metformin, sulfonylurea and glitazone بود. بدیهی است آزمودنی‌هایی که این شرایط را نداشتند و یا در حین اجرای مراحل تحقیق در تمرین یا اندازه‌گیری متغیرها شرکت نمی‌کردند و یا آسیب می‌دیدند از روند تحقیق حذف می‌شدند. این پژوهش براساس استانداردهای کارآزمایی بالینی (هلسنینکی) انجام پذیرفت و توسط کمیته‌ی اخلاق در دانشکده‌ی تربیت بدنی به تصویب رسید. همچنین اندازه‌گیرهای قد، وزن و نمایه‌ی توده‌ی بدنی افراد دیابتی به وسیله دستگاه ترکیب بدن مدل ZEUS 9.9 اندازه‌گیری شد (جدول ۱).

بیماران دیابتی نوع دو شواهدی وجود دارد اما در زمینه‌ی اثر تمرینات مقاومتی و پاسخ حاد مارکرهای التهابی به این نوع فعالیت‌ها مطالعات محدودی وجود دارد [۱۸]. به‌عنوان مثال Phillips و همکاران (۲۰۱۰) در تحقیقی دیگر، افزایش بیان ژن‌های IL6 و IL1 را پس از فعالیت مقاومتی با شدت‌های مختلفی در مردان سالم گزارش کردند. آنها همچنین گزارش کردند که ۶ ساعت پس از فعالیت میزان بیان ژن این سایتوکاین‌ها به سطوح استراحتی بازگشته است. همچنین در رابطه با تغییرات IL10 در پاسخ به فعالیت مقاومتی، این محققین نشان دادند که پاسخ به یک جلسه فعالیت مقاومتی که تنها شامل سه حرکت اسکات، پرس پا و بازکردن زانو بود، سطح سرمی سایتوکاین‌ها از جمله IL10 و IL6 تغییر معنی‌داری نداشته است در حالی که بیان ژن IL1β پس از انجام پروتکل تمرینی افزایش یافته بود [۱۹]. انجام تمرین ترکیبی در افراد دیابتی نوع دو نسبت به تمرین هوازی یا مقاومتی به تنهایی در کنترل گلوکز خون مؤثرتر است زیرا تمرینات هوازی عضلات بزرگ بدن را برای مدتی به‌طور منظم و پیوسته به فعالیت وا می‌دارند و می‌توانند عمل انسولین در هر فیبر عضلانی را بدون افزایش اندازه آن، تعدیل کنند [۲۰]. در مقابل، تمرینات مقاومتی ترجیحاً جذب گلوکز را با افزایش اندازه فیبر عضلانی بهبود می‌بخشند [۲۱، ۲۰]. در نتیجه به دلیل تحقیقات محدود در زمینه‌ی اثر تمرینات هم‌زمان بر بیان ژن سایتوکاین‌ها در لکوسیت خون بیماران دیابتی نوع دو، محقق بر آن است که مشخص نماید که آیا تمرینات هم‌زمان (مقاومتی و استقامتی) تأثیری بر روی میزان بیان ژن سایتوکاین در لکوسیت افراد سالم و دیابتی نوع دو دارد؟، تا از این طریق برخی

جدول ۱- مشخصات آنتروپومتریک و متابولیک آزمودنی‌های تحقیق

متغیرها	سالم (میانگین و انحراف معیار)	دیابتی (میانگین و انحراف معیار)
سن (سال)	۳۵/۶۶±۰/۷	۳۶/۶۶±۲/۶۵
وزن (کیلوگرم)	۶۳/۷۵±۲/۷	۶۶/۱±۳/۱
درصد چربی (درصد)	۱۹/۸۸±۰/۴۲	۲۷±۲/۴۶
BMI (کیلوگرم بر متر مربع)	۲۴/۰۱±۱/۲	۳۰/۹±۲/۵۴
گلوکز (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	۹۲/۶ ±۹/۰۲	۱۷۰±۴۸/۷۴

پروتکل تمرینی

برنامه‌ی تمرینی شامل یک وهله تمرین ترکیبی (مقاومتی-استقامتی) بود که در نوبت صبح اجرا شد. جلسه‌ی تمرینی شامل ۱۰ دقیقه گرم کردن، برنامه‌ی اصلی به مدت ۷۰ دقیقه و ۱۰ دقیقه سرد کردن بود. تمرین اصلی شامل: تمرینات مقاومتی که شامل چهار حرکت پرس سینه، زیربغل، اسکات و اکستنشن زانو بود. حرکات در ۳ ست ۸ تکراری، با شدت ۸۰ درصد یک تکرار بیشینه (1RM) One repetition maximum انجام گرفت. زمان برای تمرینات مقاومتی ۴۰ دقیقه و کل زمان استراحت تمرین مقاومتی ۱۲ دقیقه بود. آزمودنی پس از انجام تمرین مقاومتی بلافاصله فعالیت استقامتی خود را بر روی تردمیل اجرا می‌کردند. فعالیت استقامتی شامل ۳۰ دقیقه دویدن روی تردمیل مدل hp-cosmos با شدت ۷۵-۷۰ درصد HRmax (Maximum heart rate) به صورت ۳ ست ۱۰ دقیقه‌ای بود که آزمودنی‌ها بعد از پنج دقیقه از پایان تمرین مقاومتی آن را شروع می‌کردند [۱۰].

تکنیک Real time-PCR

نمونه‌ی خونی آزمودنی‌ها از ورید سفالیک بازو در ساعت ۸ صبح در حالت ناشتا و پیش از آزمون به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر گرفته شد. خون تازه در لوله‌های حاوی EDTA به منظور جلوگیری از لخته شدن خون نگهداری شد و به سرعت با قرار دادن روی یخ به آزمایشگاه انتقال داده شد. نمونه‌گیری دوم خون ۶۰ دقیقه پس از پایان پروتکل تمرینی به مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر صورت گرفت و به آزمایشگاه منتقل شد. استخراج RNA نمونه‌های خونی با استفاده از کیت (RNA Blood Kit, L3r8t4, Bio Basic Canada, Inc) با توجه به پروتکل کشور سازنده استخراج شد.

به منظور رونویسی RNA و تبدیل به cDNA از کیت (cDNA kit, Takara Bio Inc, Japan, Rr8201) استفاده شد. به تیوپ RNA بافرهای primer Script - Random 6 Mers و آنزیم Primer Script Rt Enzyme (آنزیم دارای فعالیت DNA پلیمراز وابسته به RNA برای سنتز cDNA و فعالیت RNaseH برای جدایی RNA از هیبرید RNA-DNA است) اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در دستگاه برای رونویسی معکوس و به مدت ۵ دقیقه برای غیرفعال شدن رونویسی با حرارت معکوس قرار داده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از کیت (Prime Script RT Reagent Kit, Takara Bio Inc, Japan, Rr037q) انجام شد. بیان mRNA ژن‌های اینترلوکین ۱-بتا، اینترلوکین ۱۰ و TNF- α با تشخیص زمان واقعی اندازه‌گیری شد. PCR با استفاده از سایبر (مخلوطی از Dntp, Mgcl₂, آنزیم Taq DNA Polymerase) و در دستگاه Real Time-PCR (MyGo Pro, England) اندازه‌گیری شد. سطح بیان ژن‌های اینترلوکین ۱-بتا، اینترلوکین ۱۰ و TNF- α با سطح بیان ژن گلیسر آلدهید ۳- فسفات دهیدروژناز (GAPDH) نرمال شد. داده‌ها به صورت نسبت mRNA سایتوکاین‌های مورد پژوهش به میزان بیان GAPDH بیان شدند. پرایمر ژن‌های مورد بررسی با استفاده از نرم‌افزار Oligo طراحی شده و در جدول ۲ [۲۸] آورده شده است. (برنامه‌ی مورد استفاده در Real Time شامل ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه (دناچوره شدن)، ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه (باز شدن)، ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه (جفت شدن) و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه (تکثیر) (تکرار ۴۰ سیکل) بود سپس میزان بیان ژن سایتوکاین‌ها با استفاده از روش 2^{-AACT} محاسبه گردید [۲۲] (جدول ۳).

جدول ۲- توالی پرایمرهای ژن‌های مورد بررسی

ژن	توالی زوج پرایمر	طول تکثیر
TNF- α F	CCCAGGCAGTCATCTTC	85 (bp)
TNF- α R	AGCTGCCCCCTCAGCTTGA	
IL-1 β F	TGATGGCTTATTACAGTGGCAATG	140 (bp)
IL-1 β R	GTAGTGGTGGTCCGGAGATTCCG	
IL-10 F	GCCTAACATGCTTCGAGATC	137 (bp)
IL-10 R	TGATGTGTCTGGGTCTTGGTTC	
GAPDH F	ATCGTGCGTGACTIONAAG	87 (bp)
GAPDH R	GTCATCACCATTGGCAAT	

جدول ۳- اجزای PCR جهت تکثیر ژن

Product	Syber mix (μ l)	primers (μ l)	Taq polymerase (μ l)	cDNA (μ l)	ddH ₂ O (μ l)
TNF- α	12.5	0.5	0.15	2	9
IL-1 β	12.5	0.5	0.15	2	9
IL-10	12.5	0.5	0.15	2	9
GAPDH	12.5	0.5	0.15	2	9

روش آماری

جهت بررسی آماری داده‌ها، شامل مشخصات بیماران و محاسبه‌ی میزان نسبی بیان ژن و بررسی شدت بیان در زنان سالم و دیابتی نوع دو از نرم‌افزار REST و از روش آماری (t-test permutation) و آنوای یک راهه استفاده شد. برای تمام محاسبات آماری انجام شده، p -value کمتر از ۰/۰۵ به‌عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از برنامه‌ی تمرینی هم‌زمان در این مطالعه‌ی کاربردی نشان داد که سطوح بیان ژن فاکتور نکروز دهنده‌ی تومور-آلفا در لکوسیت خون زنان دیابتی نوع دو بعد از تمرین نسبت گروه کنترل کاهش معناداری پیدا کرد ($P=0.02$) (شکل ۱). میزان بیان این ژن در مقایسه با گروه کنترل ۰/۳۸۰ گزارش

شده است (جدول ۴). همچنین میزان بیان این ژن در گروه سالم ۰/۲۱۶ گزارش شد (شکل ۱) که این مقدار در مقایسه با گروه کنترل معنادار بود ($P=0.01$) (جدول ۴). از طرفی نتایج آنالیز داده‌ها با استفاده از تکنیک Real time-PCR نشان داد که سطوح بیان ژن اینترلوکین ۱-بتا در لکوسیت زنان دیابتی نسبت به گروه کنترل تغییر کرده است ($P=0.01$) (شکل ۲). میزان بیان این ژن در گروه دیابتی ۰/۵۴۳ گزارش شد (جدول ۴). همچنین میزان بیان ژن اینترلوکین ۱-بتا در گروه سالم ۰/۳۲۰ بود که در مقایسه با گروه کنترل معنادار بود ($P=0.01$) (جدول ۴).

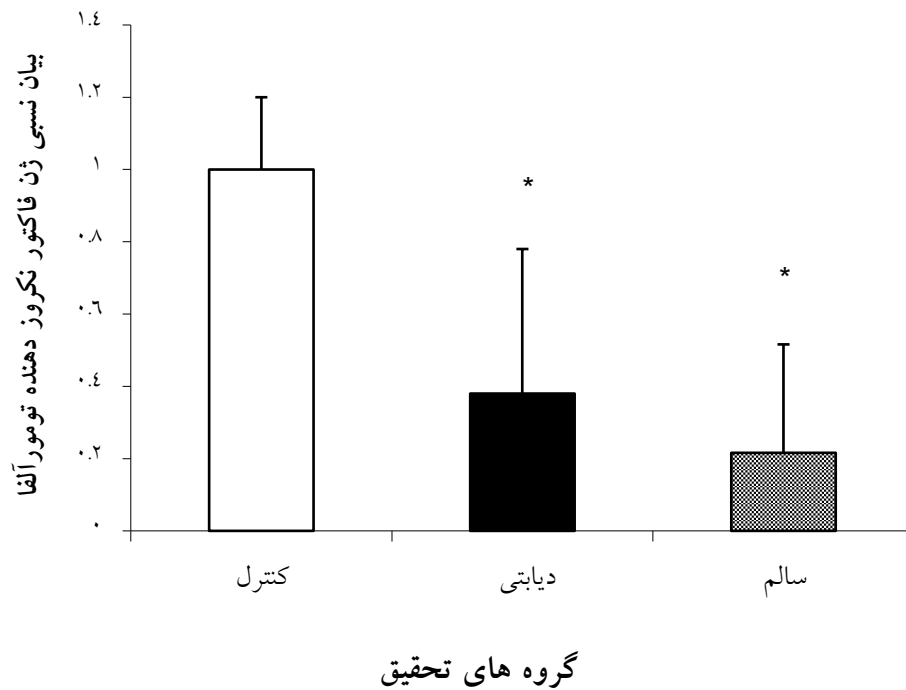
همچنین نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که بیان ژن اینترلوکین-۱۰ تحت تأثیر تمرین ترکیبی قرار نگرفت و اینترلوکین-۱۰ در لکوسیت خون افراد دیابتی نوع دو و سالم بیان نشد (جدول ۴).

جدول ۴- آثار تمرین همزمان (مقاومتی- استقامتی) بر بیان ژن های فاکتور نکروز دهنده ی تومور آلفا، اینترلوکین ۱- بتا و

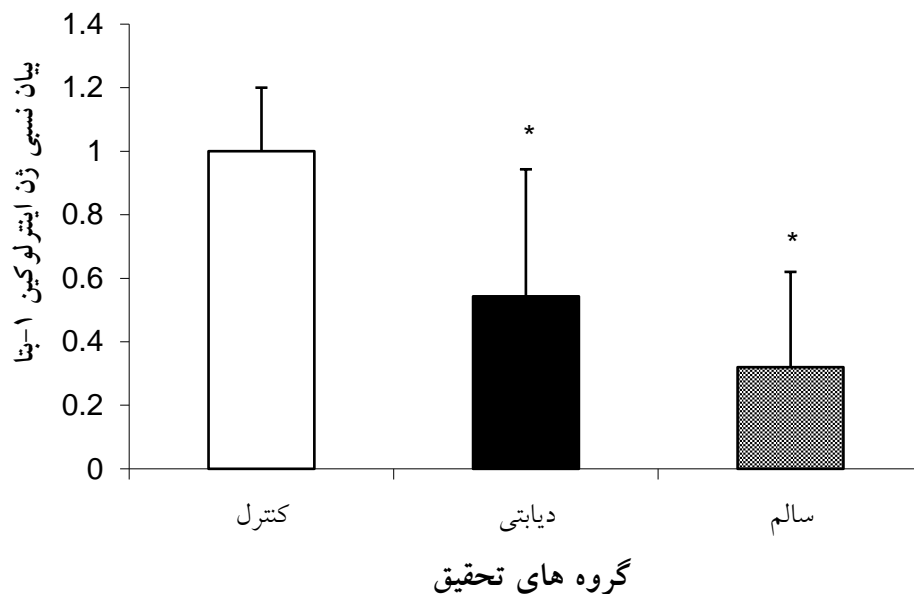
اینترلوکین ۱۰ در لکوسیت زنان سالم و دیابتی نوع دو پس از ۶۰ دقیقه ریکاوری

ژن	نوع ژن	بازده واکنش	بیان در گروه دیابتی	بیان در گروه سالم
گلیسر آلدهید فسفات دهیدروژناز (GAPDH)	مرجع	۱/۰	۱/۰	۱/۰
فاکتور نکروز دهنده ی تومور آلفا (TNF-α)	هدف	۱/۰	۰/۳۸۰ ↓*	۰/۲۱۶ ↓*
اینترلوکین ۱- بتا (IL-1β)	هدف	۱/۰	۰/۵۴۳ ↓*	۰/۳۲۰ ↓*
اینترلوکین ۱۸ (IL-10)	هدف	۱/۰	بیان نشد	بیان نشد

* تغییرات معنادار نسبت به گروه کنترل، ↓کاهش، ↑افزایش



شکل ۱- میزان بیان ژن $TNF-\alpha$ در لکوسیت گروه های مختلف با استفاده از روش **Real time- PCR** پس از تمرین همزمان *تفاوت با گروه کنترل



شکل ۲- میزان بیان ژن IL1-β در لکوسیت گروه‌های مختلف با استفاده از روش Real time-PCR پس از تمرین هم‌زمان
*تفاوت با گروه کنترل

را مهار می‌کند و در ایجاد دیابت نوع دو مؤثر است. مطالعات نشان می‌دهند با انجام فعالیت ورزشی و بروز علائم التهاب ژنوم CXCL5 در گردش خون فعال می‌شود. فعال شدن این ژن بر روی لکوسیت به صورت فیدبک منفی عمل می‌کند و باعث توقف در تولید TNF-α و IL-1β می‌شود که در این حالت میزان بیان TNF-α و IL-1β در خون ناچیز می‌شود [۲۳]. در مطالعه ای که توسط Büttner و همکاران (۲۰۰۷) انجام شد بیان ژن های پیش التهابی پس از فعالیت ورزشی حاد مورد ارزیابی قرار گرفت. پروتکل تمرینی شامل دویدن بر روی تردید میل با ۸۰ درصد VO2max بود. نتایج تحقیق نشان داد که پس از دو ساعت فعالیت حاد میزان بیان ژن های TNF-α و IL-1β کاهش یافته است که با نتایج تحقیق ما هم راستاست [۲۴]. Connolly و همکاران در تحقیقی دیگر نشان دادند که ۳۰ دقیقه فعالیت ورزشی با شدت ۸۰ درصد VO2max موجب کاهش بیان ژن های TNF-α و IL-1β می‌شود. این محققین علت کاهش بیان mRNA ژن های TNF-α و IL-1β را به افزایش خانواده‌ی DUSP (Dual-specificity phosphatase) نسبت می‌دهند که فعالیت بدنی منجر به تنظیم مثبت این خانواده می‌گردد. این

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعه‌ی حاضر از نوع نیمه تجربی و با هدف اثر تمرین هم‌زمان بر بیان ژن سایتوکاین‌های فاکتور نکروز دهنده‌ی تومور آلفا، اینترلوکین ۱-بتا و اینترلوکین ۱۰ در لکوسیت خون زنان سالم و دیابتی نوع دو بود. در این مطالعه به منظور بیان ژن سایتوکاین‌ها، سعی شد از ساده‌ترین، کارآمدترین و مطمئن‌ترین روش ممکن یعنی Real-time-PCR استفاده شود.

در مطالعه‌ی حاضر، پس از انجام یک جلسه تمرین هم‌زمان میزان بیان سایتوکاین‌های پیش التهابی فاکتور نکروز تومور آلفا و اینترلوکین ۱-بتا در لکوسیت خون زنان سالم و دیابتی نوع دو کاهش معناری پیدا کرد ($P < 0.05$). مطالعات مختلفی که بر روی بیماران دیابتی انجام گرفته است نشان داده‌اند که فعالیت سایتوکاین‌های پیش التهابی مانند TNF-α پس از فعالیت ورزشی با شدت متوسط کاهش می‌یابد و دلایل این کاهش را به فعال شدن ژن (CXCL5 (Motif Chemokine Ligand 5) نسبت دادند. ژن CXCL5 که توسط سایتوکاین‌های پیش التهابی فعال می‌شود، در بروز مقاومت سلول‌ها به انسولین نقش دارد که با فعال کردن مسیر JAK2/STAT5/SOCS2 سیگنال‌دهی انسولین

خانواده مسؤل دفسفوریلایسیون فسفوتیروزین و فسفوتیروئین که باقی مانده های مهم در کینازهای فعال میتوزن MAPK (mitogen activated protein kinase) شده هستند و منجر به غیرفعال شدن MAPK می گردند. MAPKs نقش مهمی در تحریک عوامل پیش التهابی TNF- α و IL-1 β بازی می کنند. DUSP در غیرفعال کردن مسیرهای تنشی فعال پروتئین کینازها فعال است. از سوی دیگر مسیرهای استرسی فعال پروتئین کیناز نقش کلیدی در پاسخ سلولی به سایتوکین های پیش التهابی بازی می کنند. بنابراین فعال شدن ژن DUSP در سلول های خونی در طی فعالیت ورزشی موجب مهار واسطه های پیش التهابی می شود. این کاهش بیان ژن در لکوسیت های افراد سالم و دیابتی دلالت بر این دارد که میزان بیان ژن TNF- α و IL-1 β تحت تأثیر پروتکل تمرینی قرار گرفته است [۲۵]. برخی پژوهشگران سایتوکین های پیش التهابی را عامل القاء کننده ی ترشح انسولین می دانند از طرفی (Suppressors of cytokine signaling) SOCS نقطه ی مشترک سیگنالینگ مقاومت به انسولین، سایتوکین و انسولین است. اینترلوکین ۱-بتا موجب بیان در بافت چربی می شود و بیان این ژن موجب فسفوریله شدن باقیمانده سرین در گیرنده های IRs و غیر فعال شدن این گیرنده شده و از جذب گلوکز به بافت چربی جلوگیری به عمل می آید در نتیجه کاهش تولید IL-1 β موجب بهبود حساسیت به انسولین می گردد. در حمایت از این یافته ها Hopps و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند بر اثر انجام فعالیت بدنی با شدت بالا بیان ژن های TNF- α و IL-1 β که از عوامل پیش ساز التهابی هستند، مهار می شوند و در نتیجه به بهبود حساسیت به انسولین در بیماران دیابتی نوع دو کمک می کند [۲۶].

از طرفی در مطالعه ی حاضر نتایج نشان داد که تمرین هم زمان نمی تواند بیان ژن اینترلوکین ۱۰ را تحت تأثیر قرار دهد و این سایتوکاین پس از فعالیت بیان نشد. تحقیقات زیادی در حمایت از یافته های تحقیق ما وجود دارند که نتایج حاکی از کاهش بیان یا عدم بیان این سایتوکاین پس از فعالیت ورزشی است. در تحقیقی Donges و همکاران تأثیر تمرینات هم زمان مقاومتی و استقامتی را بر بیان ژن سایتوکاین های ضد التهابی در افراد میانسال کم تحرک مورد بررسی قرار دادند نتایج تحقیق نشان

داد که بیان ژن های تغییر معناداری نداشته است که با یافته های ما همسو است [۲۷]. در تحقیق دیگر Natelson و همکاران نشان دادند که پس از یک وهله فعالیت بدنی وامانده ساز در مردان سالم میزان بیان ژن اینترلوکین ۱۰ تغییر نکرده است. این محققین بیان کردند که اینترلوکین ۱۰ از طریق تنظیم بیان ژن سلول های T و fox3 و همچنین فعال کردن سلول های TH17 از طریق سلول های CD4+ در سیستم ایمنی نقش مهمی را ایفا می کند. اینترلوکین ۱۰ بسیاری از فرآیندهای متابولیکی را از طریق فعال کردن AMPK و PI 3-AKT رهبری می کند. آبشار سیگنالی اینترلوکین ۱۰ در داخل سلول پس از اتصال آنتی ژن به گیرنده مشابه به آبشار داخل سلولی لپتین است که به فعال شدن مسیر JAK-STAT آغاز می شود. فسفوریله شدن JAK موجب فعال شدن SH2 می گردد که به دنبال آن دامنه ای از سیگنال ها تحریک می شوند. SH2 حاوی پروتئینی به نام تیروزین فسفات است که این پروتئین منجر به فعال شدن سیگنالینگ RAS/ERK1/2 خواهد شد که با فعال شدن RAS/ERK1/2 بیان TH1 کاهش می یابد و با کاهش TH1 تولید سایتوکاین های پیش التهابی کاهش یا متوقف می گردد. از طرفی به نظر می رسد این سایتوکین ضد التهابی از فعال شدن لنفوسیت ها و مونوسیت های مشتق شده از فاگوسیت ها جلوگیری می کند ولی به دنبال فعالیت ورزشی و افزایش غلظت لنفوسیت ها تمام زیر رده های لنفوسیتی به خون فراخوانی می شوند. بنابراین به دنبال فعالیت ورزشی تعداد سلول های CD4+، T، CD8+، B، CD19، CD56، NK، افزایش می یابند و افزایش این سلول ها با تنظیم فیدبک منفی تولید سایتوکین های ضد التهابی را مهار می کند [۲۸]. در حمایت از این یافته ها Buford و همکاران نشان دادند که پس از یک جلسه فعالیت مقاومتی بیان ژن اینترلوکین ۱۰ تغییری نکرده است و دلایل این عدم تغییر به شدت و حجم تمرین نسبت داده اند و بیان کرده اند که شدت و حجم فعالیت مقاومتی به اندازه ای نبوده است که بتواند محرکی برای بیان این سایتوکاین باشد [۲۹]. از دلایل عدم بیان شدن اینترلوکین ۱۰ را می توان به عدم تقارن بین بیان ژن و پروتئین، نیمه عمر پایین این سایتوکین، غلظت پایین آن در بافت لکوسیت، ملاحظات تکنیکی و پوشیده ماندن فعالیت بیولوژیکی آن توسط مهار کننده های داخلی، حامل

خانواده مسؤل دفسفوریلایسیون فسفوتیروزین و فسفوتیروئین که باقی مانده های مهم در کینازهای فعال میتوزن MAPK (mitogen activated protein kinase) شده هستند و منجر به غیرفعال شدن MAPK می گردند. MAPKs نقش مهمی در تحریک عوامل پیش التهابی TNF- α و IL-1 β بازی می کنند. DUSP در غیرفعال کردن مسیرهای تنشی فعال پروتئین کینازها فعال است. از سوی دیگر مسیرهای استرسی فعال پروتئین کیناز نقش کلیدی در پاسخ سلولی به سایتوکین های پیش التهابی بازی می کنند. بنابراین فعال شدن ژن DUSP در سلول های خونی در طی فعالیت ورزشی موجب مهار واسطه های پیش التهابی می شود. این کاهش بیان ژن در لکوسیت های افراد سالم و دیابتی دلالت بر این دارد که میزان بیان ژن TNF- α و IL-1 β تحت تأثیر پروتکل تمرینی قرار گرفته است [۲۵]. برخی پژوهشگران سایتوکین های پیش التهابی را عامل القاء کننده ی ترشح انسولین می دانند از طرفی (Suppressors of cytokine signaling) SOCS نقطه ی مشترک سیگنالینگ مقاومت به انسولین، سایتوکین و انسولین است. اینترلوکین ۱-بتا موجب بیان در بافت چربی می شود و بیان این ژن موجب فسفوریله شدن باقیمانده سرین در گیرنده های IRs و غیر فعال شدن این گیرنده شده و از جذب گلوکز به بافت چربی جلوگیری به عمل می آید در نتیجه کاهش تولید IL-1 β موجب بهبود حساسیت به انسولین می گردد. در حمایت از این یافته ها Hopps و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند بر اثر انجام فعالیت بدنی با شدت بالا بیان ژن های TNF- α و IL-1 β که از عوامل پیش ساز التهابی هستند، مهار می شوند و در نتیجه به بهبود حساسیت به انسولین در بیماران دیابتی نوع دو کمک می کند [۲۶].

از طرفی در مطالعه ی حاضر نتایج نشان داد که تمرین هم زمان نمی تواند بیان ژن اینترلوکین ۱۰ را تحت تأثیر قرار دهد و این سایتوکاین پس از فعالیت بیان نشد. تحقیقات زیادی در حمایت از یافته های تحقیق ما وجود دارند که نتایج حاکی از کاهش بیان یا عدم بیان این سایتوکاین پس از فعالیت ورزشی است. در تحقیقی Donges و همکاران تأثیر تمرینات هم زمان مقاومتی و استقامتی را بر بیان ژن سایتوکاین های ضد التهابی در افراد میانسال کم تحرک مورد بررسی قرار دادند نتایج تحقیق نشان

نتایج حاصل از پژوهش حاضر بیانگر آن است که تمرین همزمان موجب تعدیل بیان فاکتورهای پیش التهابی در زنان دیابتی می شود اما تغییری در عوامل ضدالتهابی ایجاد نکرده است. به نظر می رسد این نوع تمرینات همزمان حاد بیشتر بر کاهش بیان عوامل پیش التهابی اثر دارند تا عوامل ضد التهابی.

سپاسگزاری

از کارکنان محترم پژوهشکده‌ی پزشکی استان کرمانشاه که در مراحل انجام کار کمک شایان توجهی کردند و همچنین کارکنان مرکز دیابت استان کرمانشاه که بدون چشم داشتی ما را در انجام این پروژه یاری دادند تشکر و قدردانی می نمایم.

های پروتئین یا گیرنده‌های محلول که می توانند بر نتایج اثر گذار باشند، نسبت داد [۳۰-۳۲]. از محدودیت‌های این تحقیق می توان به عواملی مانند جنس آزمودنی‌ها، مدت زمان اعمال پروتکل و عدم اندازه‌گیری همزمان پروتئین‌ها اشاره کرد هر چند اندازه‌گیری آثار مزمن این نوع تمرینات و مقایسه آن در هر دو جنس ضروری به نظر می رسد. در مجموع نتایج حاصل از تحقیق حاضر در راستای با یافته‌های علمی قبلی بوده و تمایل به کاهش بیان ژن‌های فاکتورهای پیش التهابی با توجه به شدت و مدت تمرین همزمان خصوصاً در زنان دیابتی نوع دو از مهم‌ترین یافته های این تحقیق است و این برنامه‌ی تمرینی می تواند جهت تعدیل و مدیریت سازوکارهای مرتبط با فرآیندهای شروع التهاب در بیماران دیابتی مورد توجه قرار گیرد.

مآخذ

1. Stienstra R, Joosten LA, Koenen T, van Tits B, van Diepen JA, van den Berg SA, et al. The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity. *Cell metabolism* 2010;12(6):593-605.
2. Colberg SR, Sigal RJ, Fernhall B, Regensteiner JG, Blissmer BJ, Rubin RR, et al. Exercise and type 2 diabetes: the American College of Sports Medicine and the American Diabetes Association: joint position statement. *Diabetes Care* 2010;33(12):e147-e67.
3. Kralisch S, Weise S, Sommer G, Lipfert J, Lossner U, Bluher M, et al. Interleukin-1beta induces the novel adipokine chemerin in adipocytes in vitro. *Regulatory peptides* 2009;154(1-3):102-6.
4. Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Eshes JA, Donath MY, Mandrup-Poulsen T. Sustained Effects of Interleukin-1 Receptor Antagonist Treatment in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2009;32(9):1663.
5. Luotola K, Pietilä A, Zeller T, Moilanen L, Kähönen M, Nieminen MS, et al. Associations between interleukin-1 (IL-1) gene variations or IL-1 receptor antagonist levels and the development of type 2 diabetes. *Journal of Internal Medicine* 2011;269(3):322-32.
6. Kivela R, Silvennoinen M, Lehti M, Kainulainen H, Vihko V. Effects of acute exercise, exercise training, and diabetes on the expression of lymphangiogenic growth factors and lymphatic vessels in skeletal muscle. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2007;293(4):H2573-9.
7. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annual review of physiology*. 2010;72:219-46.
8. Chacko E. A time for exercise: the exercise window. *Journal of Applied Physiology* 2017;122: 206-209.
9. Frosig C, Richter EA. Improved insulin sensitivity after exercise: focus on insulin signaling. *Obesity* (Silver Spring, Md). 2009;17 Suppl 3:S15-20.
10. Sigal RJ, Kenny GP, Boule NG, Wells GA, Prud'homme D, Fortier M, et al. Effects of aerobic training, resistance training, or both on glycemic control in type 2 diabetes: a randomized trial. *Annals of internal medicine* 2007;147(6):357-69.
11. Naufahu J, Elliott B, Markiv A, Dunning-Foreman P, McGrady M, Howard D, et al. High-Intensity Exercise Decreases IP6K1 Muscle Content and Improves Insulin Sensitivity (SI 2 *) in Glucose-Intolerant Individuals. *J Clin Endocrinol Metab* 2018, 103(4):1479-1490.
12. Frostegård J. Immune mechanisms in atherosclerosis, especially in diabetes type 2. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;4:162-.
13. Kowluru RA, Odenbach S. Role of interleukin-1beta in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *The British journal of ophthalmology* 2004;88(10):1343-7.
14. Bijeh N, Abbasian S. The effect of intensity of aerobic training and change in dietary pattern on interleukine-18 and insulin resistance indexes in inactive obese subjects. *Arak medical university journal (AMUJ)* 2013;16(7 (76)):2-10.

15. Petersen AM, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md: 1985)* 2005;98(4):1154-62.
16. Louis E, Raue U, Yang Y, Jemiolo B, Trappe S. Time course of proteolytic, cytokine, and myostatin gene expression after acute exercise in human skeletal muscle. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md: 1985)* 2007;103(5):1744-51.
17. Teixeira-Lemos E, Nunes S, Teixeira F, Reis F. Regular physical exercise training assists in preventing type 2 diabetes development: focus on its antioxidant and anti-inflammatory properties. *Cardiovascular Diabetology* 2011;10(1):12.
18. Gomes RJ, Leme JA, de Moura LP, de Araujo MB, Rogatto GP, de Moura RF, et al. Growth factors and glucose homeostasis in diabetic rats: effects of exercise training. *Cell biochemistry and function* 2009;27(4):199-204.
19. Phillips MD, Mitchell JB, Currie-Elolf LM, Yellott RC, Hubing KA. Influence of commonly employed resistance exercise protocols on circulating IL-6 and indices of insulin sensitivity. *Journal of strength and conditioning research* 2010;24(4):1091-101.
20. Peake JM, Nosaka K, Muthalib M, Suzuki K. Systemic inflammatory responses to maximal versus submaximal lengthening contractions of the elbow flexors. *Exercise immunology review* 2006;12:72-85.
21. Fischer CP. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exercise immunology review* 2006;12:6-33.
22. Monazzami Amirabbas RH, Ghrakhanlou Reza, Yari Kheyrollah, Rahimi Zohreh. Modulation of oxidative and glycolytic skeletal muscle fibers Na⁺/H⁺ exchanger1 (NHE1) and Na⁺/HCO₃⁻ co-transporter1 (NBC1) genes and proteins expression in type 2 diabetic rat (Streptozotocin + high fat diet) following long term endurance training. *Cellular and Molecular Biology* 2017;63(5):11-8.
23. Bassuk SS, Manson JE. Epidemiological evidence for the role of physical activity in reducing risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Journal of Applied Physiology* 2005;99(3):1193-204.
24. Büttner P, Mosig S, Lechtermann A, Funke H, Mooren FC. Exercise affects the gene expression profiles of human white blood cells. *Journal of Applied Physiology* 2007;102(1):26-36.
25. Connolly P, Caiozzo V, Zaldivar F, Nemet D, Larson J, Hung S-P, et al. Effects of exercise on gene expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md: 1985)* 2004;97:1461-9.
26. Hopps E, Canino B, Caimi G. Effects of exercise on inflammation markers in type 2 diabetic subjects. *Acta diabetologia* 2011;48:183-9.
27. Donges CE, Duffield R, Smith GC, Short MJ, Edge JA. Cytokine mRNA expression responses to resistance, aerobic, and concurrent exercise in sedentary middle-aged men. *Appl Physiol Nutr Metab* 2014;39(2):130-7.
28. Spinsanti G, Zannolli R, Panti C, et al. Quantitative Real-Time PCR detection of TRPV1-4 gene expression in human leukocytes from healthy and hyposensitive subjects. *Mol Pain* 2008;4:51.
29. Buford TW, Cooke MB, Shelmadine BD, Hudson GM, Redd L, Willoughby DS. Effects of eccentric treadmill exercise on inflammatory gene expression in human skeletal muscle. *Applied physiology, nutrition, and metabolism* . *Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme* 2009;34(4):745-53.
30. Santiago M, Neto AL, Gonçalves LL, Pereira B, Leite G, Richard D, Texeira C, et al. Effects of Resistance Training on Immunoinflammatory Response, TNF-Alpha Gene Expression, and Body Composition in Elderly Women. *Journal of Aging Research* 2018; 1-11.
31. Peiró C, Lorenzo Ó, Carraro R, Sánchez-Ferrer CF. IL-1β Inhibition in Cardiovascular Complications Associated to Diabetes Mellitus. *Front Pharmacol* 2017;8:363-.
32. Zhao G, Dharmadhikari G, Maedler K, Meyer-Hermann M. Possible Role of Interleukin-1β in Type 2 Diabetes Onset and Implications for Anti-inflammatory Therapy Strategies. *PLOS Computational Biology* 2014;10(8):e1003798.

MODULATION OF INTERLEUKIN-1B (IL-1B), TUMOR NECROSIS FACTOR–A (TNF-A) AND INTERLEUKIN-10 (IL-10) GENES EXPRESSION FOLLOWING CONCURRENT TRAINING IN WOMEN WITH TYPE2 DIABETES

Zoherh Fatolahian¹, Amirabbas Monazzami^{1*}, Vahid Tadibi¹, Ali Mostafaei²

1. Department of Sport Physiology ,Faculty of Sport Science,Razi University, Kermanshah, Iran

2. Medical Biology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

ABSTRACT

Background: The purpose of this study was to investigate the effect of concurrent training on pre-inflammatory (IL-1 β , TNF- α) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines gene expression in women with type2 diabetes.

Methods: 18-patients (age30-38, >130 glycemic index) were selected, randomly, and divided into control (n=6) the concurrent training(diabetes, n=6) and the concurrent training (healthy, n=6) groups. The concurrent training protocol consisted of 3 sessions resistance training per week, 8sets with 80% one maximum repetition($3 \frac{80}{8}$) and the endurance training preformed with 30- minutes running (3sets \times 10 minutes) on a treadmill with 70-80 maximum heart rate(70-80 MHR), immediately. The leukocyte's IL-1 β , TNF- α and IL-10 genes expression determined by the Real time-PCR technique. The quantitative expression of the cytokines gene was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. The between- groups differences in variables were determined by independent t-test (permutation test) through REST software and independent one-way ANOVA.

Results: The results showed that IL-1 β , TNF- α mRNA genes expression reduced significantly after the concurrent training in both the training groups in comparison to the control group (P<0.05). In addition, the results also showed that IL-10 mRNA gene expression was not expressed in leukocytes after the concurrent training in both training groups in comparison to the control group (P>0.05).

Conclusion: In conclusion, the results suggest that the concurrent training modulate IL-1 β and TNF- α mRNA genes expression significantly in diabetic women but could not change IL-10 genes expression. This type of exercise training seems to be more effective in reducing the expression of pro-inflammatory cytokines than in enhancing anti-inflammatory cytokines.

Keywords: Type2 Diabetes; Concurrent Training; IL-1 β ; TNF- α ; IL-10

* Kermanshah, Bagh Abrisham, Razi University, Faculty Sports Sciences. postal code:6714414971, Phone :08334273272, fax:08334274585,E mail: monazzami.amirabbas@gmail.com