

تأثیر تمرین استقامتی بر میزان پروتئین‌های درگیر در تنظیم سوخت‌وساز بافت چربی در رت‌های دیابتی نوع دو

سجاد میرزائی^۱، محمد شرافتی مقدم^{۱*}، نگین دژدار^۲، مهدیه عبدی^۲

چکیده

مقدمه: پروتئین‌های mTOR و CREB دو عامل مهم در مسیرهای سلولی و تنظیم متابولیسم بافت چربی هستند. بنابراین هدف از مطالعه‌ی حاضر، تأثیر تمرین استقامتی بر میزان پروتئین‌های mTOR و CREB در بافت چربی رت‌های دیابتی نوع دو است. **روش‌ها:** در این مطالعه‌ی تجربی، ۱۸ سر رت نر ۲ ماهه از نژاد اسپراگ داوولی با میانگین وزن 270 ± 20 گرم انتخاب شدند. ۱۲ سر از رت‌ها از طریق تزریق درون صفاقی محلول‌های استرپتوزوتوسین و نیکوتین‌آمید دیابتی نوع دو شدند. این رت‌ها به روش تصادفی به ۲ گروه، تمرین دیابتی (هر گروه ۶ سر) و کنترل دیابتی تقسیم شدند؛ یک گروه کنترل سالم (۶ سر) نیز در نظر گرفته شد؛ گروه تمرینی ۴ روز در هفته مطابق با برنامه‌ی تمرینی به مدت ۶ هفته به تمرین استقامتی پرداختند. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۳ و آزمون‌های آنوای-یک‌طرفه و تعقیبی توکی استفاده شد.

یافته‌ها: محتوای پروتئین mTOR به‌دنبال ۶ هفته تمرین استقامتی، تغییر معنی‌داری را نشان داد ($P=0/0001$)؛ آزمون تعقیبی توکی نشان داد این تغییر معنی‌دار بین جفت گروه‌های تمرین دیابتی نسبت به کنترل سالم ($P=0/004$) و گروه‌های کنترل دیابتی نسبت به کنترل سالم است ($P=0/0001$). محتوای پروتئین CREB تغییر معنی‌داری را نشان داد ($P=0/0001$)؛ این تغییر معنی‌دار بین جفت گروه‌های تمرین دیابتی نسبت به کنترل دیابتی ($P=0/02$)، تمرین دیابتی نسبت به کنترل سالم ($P=0/0001$) و گروه‌های کنترل دیابتی نسبت به کنترل سالم ($P=0/0001$) بود.

نتیجه‌گیری: پروتئین‌های mTOR و CREB به‌دنبال تمرین استقامتی کاهش یافتند که می‌تواند در تنظیم سوخت‌وساز بافت چربی مؤثر باشند؛ با این وجود باید شرایط تمرینی بیشتری مد نظر قرار گیرد.

واژگان کلیدی: تمرین استقامتی، هدف مکانیکی راپامایسین در پستانداران، پروتئین اتصال عنصر پاسخگو به cAMP، بافت چربی، دیابت نوع دو

۱- گروه علوم ورزشی، مؤسسه‌ی آموزش عالی آپادانا، شیراز، ایران

۲- گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکز، تهران، ایران

***نشانی:** فارس، شیراز، میدان معلم، ایمن شمالی، ساختمان مرکزی مؤسسه‌ی آموزش عالی آپادانا، کُد پستی: ۷۱۸۷۹۸۵۴۴۳، تلفن: ۰۷۱۳۶۹۸۷،

پست الکترونیک: m.sherafati@hiau.ac.ir

مقدمه

همه‌گیرشناسی فزاینده‌ی چاقی و اضافه وزن باعث شده است که محققان به زیست‌شناسی چربی و عملکردهای تنظیمی آن علاقه‌مند باشند. بافت چربی نقش مهمی در تنظیم تعادل انرژی و متابولیسم دارد و اختلال عملکرد آن از نزدیک با بیماری‌های متابولیکی مانند چاقی، دیابت نوع دو و مقاومت به انسولین همراه است [۱]. بافت چربی یک بافت همبند تخصصی است که به سه نوع طبقه‌بندی می‌شود: بافت چربی سفید، بژ و قهوه ای [۲]. بافت سفید چربی مسئول ذخیره چربی‌های اضافی به صورت تری‌گلیسیریدها است؛ درحالی‌که بافت چربی قهوه‌ای انرژی شیمیایی را با سطوح بالا تبدیل می‌کند و مسئول تنظیم دمای بدن و اکسیداسیون اسیدهای چرب به شکل گرما است. [۳]. افزایش چربی باعث تغییرات متابولیک و التهابی می‌شود که در عملکرد انسولین و بافت‌های محیطی تداخل ایجاد می‌کند و همچنین منجر به اختلال در عملکرد سلول‌های بتا و ایجاد دیابت می‌شود [۴].

سیگنالینگ هدف مکانیکی راپامایسین (mTOR)^۱ مهم‌ترین مسیر داخل سلولی است که مواد مغذی و وضعیت انرژی سیستمیک را در سطوح سلولی هماهنگ می‌کند. اختلال در سیگنالینگ mTOR با بیماری‌های مختلفی از جمله چاقی، دیابت نوع دو، سرطان و بیماری‌های عصبی همراه است [۵]. چاقی و مصرف بیش از حد مواد غذایی باعث فعال شدن بیش از حد (مزمین) فعالیت mTOR در چندین بافت می‌شود [۶،۷]. به نوبه خود، اختلال در تنظیم سیگنالینگ mTOR ممکن است توسعه‌ی دیابت نوع دو یا مقاومت به انسولین را تسهیل کند [۷]. پژوهش‌های اخیر نشان داده‌اند که مسیر سیگنالینگ mTOR نقش مهمی در تنظیم عملکرد بافت چربی، از جمله آدیپوژنز، متابولیسم چربی، ترموژنز و سنتز و/یا ترشح چربی دارد [۸]. همچنین پروتئین دیگری به‌عنوان پروتئین اتصال عنصر پاسخگو به CAMP (CREB)^۲ در سلول‌های چربی تحت شرایط چاقی فعال می‌شود. این فرآیند منجر به کاهش حساسیت به انسولین، افزایش مقاومت به انسولین و اختلال در

حامل گلوکز ۴ (GLUT4)^۳ می‌شود [۹]. بنابراین، مهار فعال‌شدن CREB می‌تواند یک راهبرد جایگزین برای درمان دیابت است [۱۰].

فعالیت‌های ورزشی منظم یک عامل بسیار مهم برای غلبه بر چاقی، همراه با کنترل رژیم غذایی و تغییرات شیوه‌ی زندگی است [۱۱]. فعالیت ورزشی در افزایش متابولیسم انرژی مؤثر است؛ درحالی‌که لیپیدها و کربوهیدرات‌ها به‌عنوان دو سوخت اصلی برای حفظ متابولیسم اکسیداتیو خدمت می‌کنند. گزارش شده است که کاهش اکسیداسیون چربی با مقاومت به انسولین و بیماری‌های متابولیک همراه است [۱۳، ۱۲]. فعال‌سازی متابولیسم لیپیدها برای درمان چاقی استفاده می‌شود و منجر به بهبود لیپیدهای خون، تنظیم تعادل انرژی از طریق هورمون‌ها، نگهداری و کاهش وزن، کاهش چربی بدن، بهبود عملکرد قلبی-عروقی و جلوگیری از آسیب اکسیداتیو به بافت‌ها می‌شود [۱۴].

در این راستا در تحقیقی Bae و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که تمرین ورزشی و تغییر در رژیم غذایی منجر به بهبود چاقی و مقاومت به انسولین از طریق مسیر mTOR می‌شود [۱۵]. در تحقیقی دیگر Popov و همکاران (۲۰۱۹) به بررسی محتوای پروتئین CREB به‌دنبال فعالیت ورزشی استقامتی حاد در عضله‌ی اسکلتی انسان پرداختند. فعالیت ورزشی به مدت ۲ ماه تمرین هوازی (۵ روز در هفته، ۱ ساعت در روز) انجام شد. محتوای پروتئین CREB به‌دنبال تمرین استقامتی افزایش یافت [۱۶].

با توجه به بیماری‌های همه‌گیر چاقی در سراسر جهان و اختلالات متابولیکی مرتبط با آن مانند دیابت نوع دو و عوارض مقاومت به انسولین، هدف قرار دادن این کینازها، پروتئین‌ها و عوامل سلولی مهم ممکن است یک رویکرد بالقوه برای کاهش چربی و بهبود بیماری‌های مرتبط با چاقی باشد. در این تحقیق، ما به بررسی تأثیر دو سازکار سلولی مهم در تنظیم سوخت‌وساز بافت چربی از طریق پروتئین‌های mTOR و CREB در آزمودنی‌های دیابتی نوع ۲ که مستعد چاقی و

¹ Mammalian Target of Rapamycin

² cAMP Response Element-Binding Protein

³ Glucose Transporter Type 4

گروه کنترل سالم (۶ سر) نیز در نظر گرفته شد.

تمرین استقامتی

رت‌های گروه تمرین برای آشنایی با تردمیل به مدت یک هفته با سرعت ۵ تا ۱۰ متر بر دقیقه، روی نوارگردان دویدند. برنامه‌ی گروه تمرینی به مدت ۶ هفته و هر جلسه بود. رت‌ها در شروع هر جلسه با سرعتی حدود ۱۰ تا ۱۲ متر بر دقیقه گرم (به مدت ۶ دقیقه) کردند. سپس برنامه‌ی تمرینی اصلی شامل ۳۲ دقیقه تمرین استقامتی با شدتی حدود ۵۰ تا ۷۰ درصد حداکثر سرعت انجام شد. در پایان هر جلسه نیز رت‌ها با سرعتی حدود ۱۰ تا ۱۲ متر بر دقیقه (به مدت ۶ دقیقه) سرد کردند. کل مدت زمان دویدن رت‌ها در هر جلسه بر روی نوارگردان ۴۴ دقیقه بود. شیب نوارگردان صفر درجه و در ۶ هفته تغییری نداشت [۱۸].

آزمون اندازه‌گیری حداکثر سرعت

آزمون اندازه‌گیری حداکثر سرعت با سرعت ۵ متر در دقیقه شروع و هر ۳ دقیقه سرعت تردمیل ۵ متر در دقیقه افزایش یافت تا موش‌های صحرائی به خستگی (چسبیدن موش‌ها به انتهای تردمیل) برسند. سرعتی که در آن موش‌های صحرائی به خستگی رسیدند، به‌عنوان حداکثر سرعت در نظر گرفته شد [۱۹].

روش بافت برداری

در مدت انجام برنامه‌ی تمرین استقامتی، گروه کنترل هیچ‌گونه برنامه‌ی تمرینی نداشتند. همچنین موش‌های صحرائی هیچ‌گونه درمانی با انسولین را در طول دوره‌ی پژوهش نداشتند. برای از بین بردن آثار حاد تمرین و متغیرهای غیرقابل کنترل استرس آزمودنی‌ها در زمان اجرای برنامه‌ی تمرینی، بعد از ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، موش‌ها با رعایت اصول اخلاقی و با تزریق درون صفاقی ترکیبی از کتامین (۳۰ تا ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۳ تا ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، بی‌هوش شدند. سپس بافت چربی زیرجلدی از بدن حیوان برداشته شد و در سرم

افزایش وزن هستند، می‌پردازیم. همچنین نقش تمرین استقامتی را در تأثیرگذاری بر روی این پروتئین‌های مهم بررسی می‌کنیم. بنابراین هدف از تحقیق حاضر، تأثیر تمرین استقامتی بر میزان پروتئین‌های mTOR و CREB در بافت چربی رت‌های دیابتی نوع دو است.

روش‌ها

نمونه و نوع تحقیق

در تحقیق تجربی-بنیادی حاضر، ۱۸ سر موش صحرائی نر ۲ ماهه از نژاد اسپراگ‌داولی با میانگین وزنی 270 ± 20 گرم انتخاب شدند. رت‌ها در آزمایشگاه مخصوص حیوانات با دمای 22 ± 2 درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت ۴۰-۵۰ درصد و چرخه‌ی تاریکی-روشنایی ۱۲-۱۲، در قفسه‌های پلی‌کربنات با دسترسی آزاد به غذا و آب نگهداری شدند. اصول اخلاقی (کد اخلاقی IR.SUMS.REC.1396.S1062) مطالعه مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب دانشگاه علوم پزشکی شیراز مورد توجه قرار گرفت.

روش القاء دیابت

برای ایجاد دیابت نوع دو در رت‌ها (۱۲ سر)، در مرحله‌ی اول محلول نیکوتین‌آمید با دوز ۱۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن تزریق گردید و سپس، بعد از ۱۵ دقیقه، محلول استرپتوزوتوسین (STZ)^۱ (حل شده در بافر سیترات ۰/۱ مولار با $PH=4/5$) به‌صورت درون صفاقی و فقط یک مرتبه با دوز ۶۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن تزریق شد. جهت اطمینان از دیابتی شدن رت‌ها، قند خون ۳ روز پس از تزریق توسط دستگاه قند خون (نمونه‌ی خونی از سیاهرگ دمی رت‌ها گرفته شد) اندازه‌گیری شد. قند خون در دامنه‌ی ۱۲۶ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر تا ۲۶۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر به‌عنوان شاخص دیابتی شدن نوع دو در نظر گرفته شد [۱۷]. پس از القای دیابت رت‌ها (۱۲ سر) به روش تصادفی به ۲ گروه: گروه تمرین دیابتی (۶ سر) و کنترل دیابتی (۶ سر) تقسیم شدند؛ یک

¹ Streptozotocin

فیزیولوژیک شستشو داده و سپس بلافاصله با استفاده از مایع ازت منجمد و برای سنجش‌های بعدی با دمای ۸۰- فریزر شد [۲۰].

روش آزمایشگاهی وسترن بلات

با استفاده از روش آزمایشگاهی وسترن-بلات متغیرهای پژوهش اندازه‌گیری شد. در این روش ابتدا مخلوط بافت چربی زیرجلدی در لیز کننده‌ی RIPA حاوی آنتی پروتئاز کوکتیل (sigma) تهیه شد. سپس نمونه‌ها در سانتیفریوژ (مدل اپندروف 5415 R) در دمای چهار درجه‌ی سانتی‌گراد و با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتیفریوژ شدند. از طریق روش بردفورد غلظت پروتئین تعیین شد. از BSA به‌عنوان پروتئین استاندارد برای اندازه‌گیری میزان پروتئین استفاده شد. نمونه‌های پروتئینی تهیه شده قبل از ریخته شدن در چاهک هم‌غلظت شده و با بافر نمونه مخلوط و به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در آب ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد جوشانده شدند. سپس ژل SDS page از پلیمرآکریل آمید ساخته و بیس آکریل آمید این پلیمر به‌صورت عرضی به هم مرتبط شد. مواد لازم برای تهیه‌ی محلول‌های استوک آکریل آمید، بافر ژل پایین، بافر ژل بالا و بافر ژل تانک الکتروفوز انجام شد. سپس الکتروفوز بر ژل SDS page انجام شد. بعد از اتمام الکتروفوز ژل به آرامی از شیشه‌ها جدا شده و در بافر انتقال قرار داده شد. سپس کاغذ PVDF به اندازه‌ی ژل بریده و برای فعال شدن به مدت ۱ دقیقه در متانول شیک و با آب مقطر شسته شد و درون بافر انتقال قرار گرفت. انتقال پروتئین از ژل به کاغذ در دستگاه وسترن بلات صورت گرفت. در مرحله بلاکینگ، محلول Blocking به‌منظور پوشاندن کاغذ برای جلوگیری از واکنش غیر اختصاصی آنتی بادی اولیه به‌کار رفت. برای ساختن این محلول ۲ درصد شیر خشک بدون چربی در بافر TBS-T اضافه شد. پس از اتمام انتقال پروتئین‌ها بر سطح کاغذ PVDF کاغذ به مدت یک ساعت و ۱۵ دقیقه در دمای اتاق با محلول بلاکینگ شیک می‌شود. سپس مرحله‌ی انکوبه کردن با آنتی بادی اولیه انجام شد. پس از پایان یافتن زمان بلاکینگ کاغذ با آنتی‌بادی اولیه‌ای که با محلول

بلاکینگ به مقدار معین آنتی‌بادی اولیه مخلوط و رقیق شده است، به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت انکوبه شد. بعد از آن مرحله‌ی انکوبه کردن با آنتی‌بادی ثانویه صورت گرفت. پس از اتمام مرحله‌ی قبل کاغذ ۳ بار و هر بار به مدت ۱۵ دقیقه با بافر TBS-T شست‌وشو داده شد. سپس کاغذ با آنتی‌بادی ثانویه Anti Rabbit با غلظت (1:1000) برای تمام آنتی‌بادی‌های اولیه به مدت یک ساعت و ۱۵ دقیقه در دمای اتاق شیک شد. در پایان این مرحله نیز کاغذ سه بار و هر بار به مدت ۱۵ دقیقه با بافر TBS-T شست‌وشو داده شد. سپس دقیق‌ترین و حساس‌ترین تکنیک‌های آشکارسازی باند پروتئینی مورد نظر انجام گرفت. برای مشاهده‌ی باند پروتئینی مورد نظر فیلم عکاسی را بر کاغذ دارای پوشش نایلونی گذاشته و در کاست را بستیم. پس از خارج کردن فیلم از کاست آن را ابتدا در تشتک حاوی محلول ظهور به مدت ۲۰ ثانیه قرار دادیم تا باندها ظاهر شوند. سپس در تشتک آب فیلم را به مدت ۲۰ ثانیه شستیم و بعد از آن به مدت ۲۰ ثانیه در محلول ثبوت تکان دادیم. سپس مجدداً فیلم را با آب جاری شسته و با گیره آویزان کردیم تا خشک شود [۲۱].

روش‌های آماری

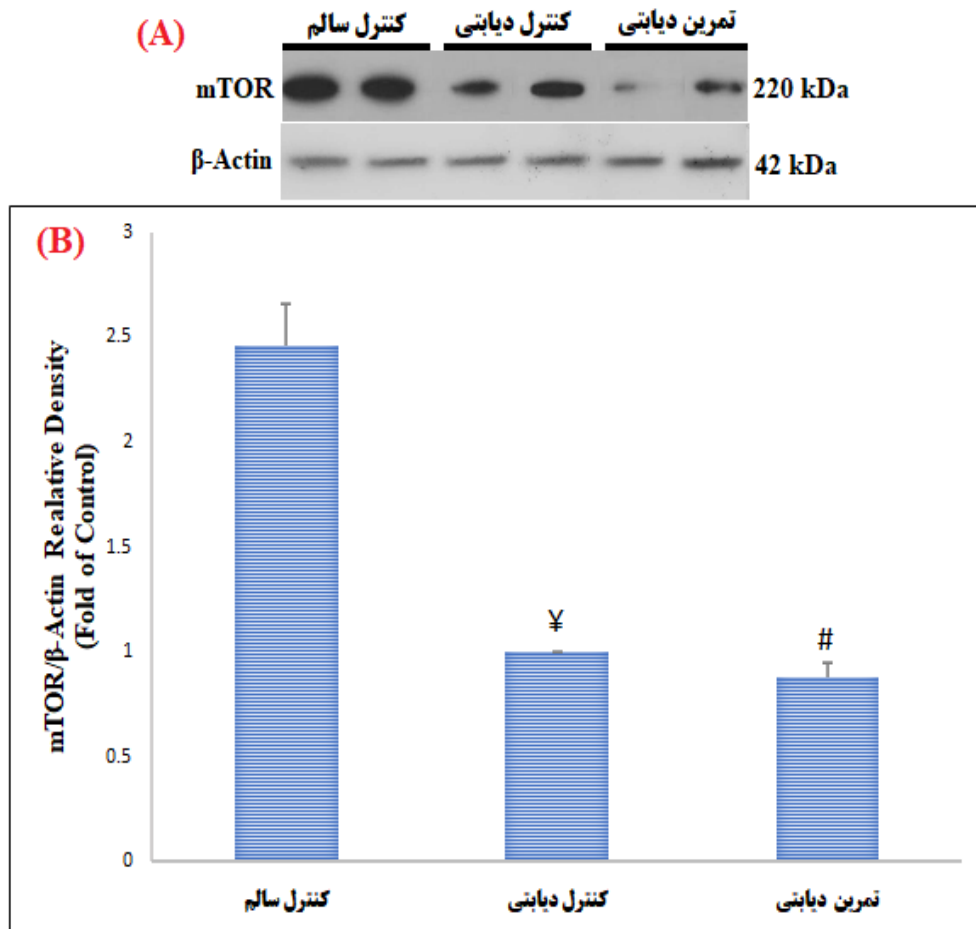
ابتدا از آزمون کالموگروف-اسمیرنوف برای تعیین نرمالیتی توزیع داده‌های تحقیق حاضر استفاده شد. با توجه به نرمال بودن توزیع داده‌ها در متغیرها، جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون‌های آنوای یک‌طرفه و تعقیبی توکی استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۳ انجام گرفت و سطح معنی‌داری تجزیه و تحلیل آماری تحقیق حاضر، $P \leq 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌ها براساس آزمون آنوای یک‌راهه نشان داد، محتوای درون سلولی پروتئین mTOR به‌دنبال ۶ هفته تمرین استقامتی، در بین گروه تمرین دیابتی، کنترل دیابتی و کنترل سالم در بافت چربی زیرجلدی تغییر معنی‌داری را

تمرین استقامتی، در بین گروه تمرین دیابتی، کنترل دیابتی و کنترل سالم در بافت چربی زیرجلدی تغییر معنی داری را نشان داد ($P=0/0001$) (شکل ۲، A و B). آزمون تعقیبی توکی نشان داد این تغییر معنی دار بین جفت گروه‌های تمرین دیابتی و کنترل دیابتی ($P=0/02$)، بین جفت گروه‌های تمرین دیابتی و کنترل سالم ($P=0/0001$) و همچنین جفت گروه‌های کنترل دیابتی و کنترل سالم است ($P=0/0001$) (شکل ۲، A و B).

نشان داد ($P=0/0001$) (شکل ۱، A و B). آزمون تعقیبی توکی نشان داد این تغییر معنی دار بین جفت گروه‌های تمرین دیابتی و کنترل سالم ($P=0/0001$) و همچنین بین جفت گروه‌های کنترل دیابتی و کنترل سالم ($P=0/0001$) است. بین جفت گروه‌های تمرین دیابتی و کنترل دیابتی تغییر معنی داری مشاهده نشد ($P=0/45$) (شکل ۱، A و B). همچنین محتوای درون سلولی پروتئین CREB به دنبال ۶ هفته



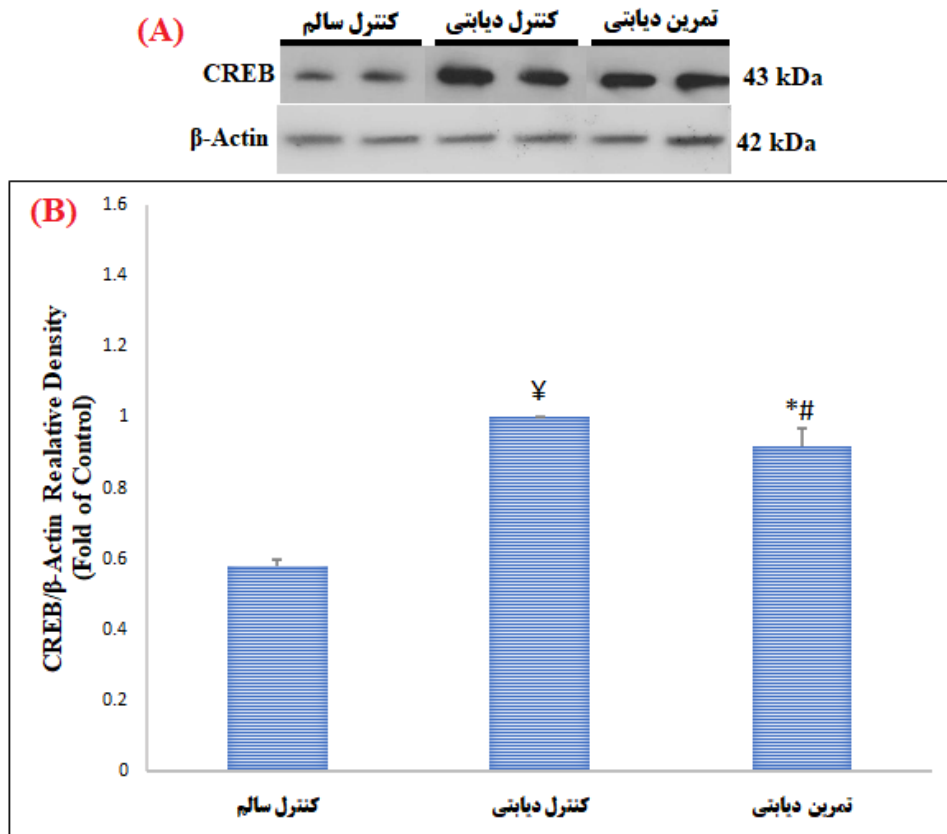
شکل ۱- مقایسه‌ی محتوای پروتئین mTOR در گروه‌های مورد مطالعه

(A): تصاویر وسترن بلات محتوای پروتئین mTOR و بتا-اکتین (β -Actin) به‌عنوان کنترل داخلی در بافت چربی زیرجلدی

(B): نمودار ستونی نشان دهنده‌ی مقادیر کمی شده باندهای محتوای پروتئین mTOR در مقابل کنترل داخلی

(# اختلاف معنی داری بین گروه تمرین دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم)

(¥ اختلاف معنی داری بین گروه کنترل دیابتی نسبت به گروه کنترل)



شکل ۲- مقایسه‌ی محتوای پروتئین CREB در گروه‌های مورد مطالعه

(A): تصاویر وسترن بلات محتوای پروتئین CREB و بتا-اکتین (β -Actin) به‌عنوان کنترل داخلی در بافت چربی زیرجلدی

(B): نمودار ستونی نشان دهنده‌ی مقادیر کمی شده باندهای محتوای پروتئین CREB در مقابل کنترل داخلی

(*#) اختلاف معنی‌داری بین گروه تمرین دیابتی نسبت به گروه کنترل دیابتی)

(#) اختلاف معنی‌داری بین گروه تمرین دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم)

(†) اختلاف معنی‌داری بین گروه کنترل دیابتی نسبت به گروه کنترل

بحث

محتوای پروتئین mTOR به‌دنبال ۶ هفته تمرین استقامتی، تغییر معنی‌داری را نشان داد؛ آزمون تعقیبی توکی نشان داد این تغییر معنی‌دار بین جفت گروه‌های تمرین دیابتی نسبت به کنترل سالم (کاهش) و گروه‌های کنترل دیابتی نسبت به کنترل سالم (کاهش) است. محتوای پروتئین CREB تغییر معنی‌داری را نشان داد؛ این تغییر معنی‌دار بین جفت گروه‌های تمرین دیابتی نسبت به کنترل دیابتی (کاهش)، تمرین دیابتی نسبت به کنترل سالم (افزایش) و گروه‌های کنترل دیابتی نسبت به کنترل سالم (افزایش) بود.

فعالیت‌های ورزشی منظم برای سلامت جسمی مهم هستند و منجر به تنظیم پیامدهای اپی‌ژنتیکی [۲۲]، کنترل پیری [۲۳]، بهبود کنترل گلیسمی در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو و افزایش حساسیت و کاهش مقاومت به انسولین [۲۴، ۲۵]، پیشگیری از بیماری‌های قلبی-عروقی و کنترل دیگر بیماری‌ها یا کاهش عوارض آنها می‌شوند [۲۶].

پروتئین mTOR نقش کلیدی در تنظیم سطوح سلول‌های بافت چربی و همچنین سلول‌های چربی در اندام‌های بدن مانند عضله اسکلتی، قلب، بافت چربی و... دارد. در این راستا در تحقیقی Symonds و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که تمرین ورزشی منجر به افزایش محتوای پروتئین mTOR در بافت چربی موش‌های باردار می‌شود [۲۷]. در تحقیقی دیگر Bae و

همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که تمرین ورزشی و تغییر در رژیم غذایی منجر به بهبود چاقی و مقاومت به انسولین از طریق مسیر mTOR می‌شود [۱۵]. در تحقیق حاضر میزان پروتئین mTOR به دنبال انجام تمرین هوازی (استقامتی) در گروه تمرین دیابتی تغییری را نسبت به گروه کنترل دیابتی نشان نداد. این می‌تواند به دلیل مدت زمان تمرین هوازی باشد که ۶ هفته بود. معمولاً تمرین‌های با مدت زمان پایین نمی‌توانند تأثیر به‌سزایی بر روی بافت چربی بگذارد؛ محتوای پروتئین mTOR در افراد سالم نسبت به افراد بیمار (دیابتی) همان‌طور که در نتایج تحقیق حاضر نشان داد بالاتر است و این به دلیل فعال بودن این مسیر و نقش آن در سنتز پروتئین و دیگر سازکارهای سلولی دارد. باید خاطر نشان کرد که مسیر mTOR یکی از مسیرهای کلیدی در تنظیم (آدیپوژنز/لیپوژنز) است و این عمل را از طریق فعال کردن پروتئین‌های پایین دست مانند پروتئین‌های لیپین-۱ و SREBP1 انجام می‌دهد [۲۸]. بنابراین فعال نشدن یا کاهش پروتئین و مسیر mTOR از طریق تمرین ورزشی هوازی می‌تواند یک سازکار کلیدی در آدیپوژنز/لیپوژنز در افراد دیابتی نوع دو که مستعد چاقی هستند، باشد.

در کل پروتئین mTOR هسته‌ی مرکزی دو کمپلکس (mTORC1 و mTORC2) است و mTORC1 در تنظیم بافت چربی نقش مهم‌تری دارد [۲۹]. فعال‌سازی mTORC1 توسط فاکتورهای رشدی مانند انسولین و IGF-1 نقش‌های کلیدی کنترل چربی سفید و قهوه‌ای دارد. mTORC1 نقش مهمی در تنظیم سلول‌های بنیادی مزانشیمی به چربی سفید و همچنین آدیپوژنز/لیپوژنز دارد. همچنین کنترل mTOR برای تمایز مناسب چربی قهوه‌ای لازم است. فعال‌سازی اولیه مسیر سیگنالینگ mTOR و به دنبال آن، تنظیم مجدد این مسیر توسط یک سازکار وابسته به AMPK یک نیاز مطلق برای رسیدن به یک فنوتیپ قهوه‌ای کاملاً متمایز است [۳۰]. در مقابل به نظر می‌رسد پیامدهای mTORC2 در کنترل لیپوژنز/آدیپوژنز در پستانداران محدود است [۳۱].

در دیگر Bruno و همکاران (۲۰۱۴) به بررسی محتوای پروتئین CREB بر پاسخ آنابولیک و افزایش کارایی عضله‌ی

اسکلتی پرداختند. تمرین ورزشی استقامتی با شدت بالا به مدت ۸ هفته و جلسه‌ای ۳۰ دقیقه انجام شد. تمرین ورزشی استقامتی با شدت بالا منجر به افزایش سطوح فرم فسفریله CREB شد [۳۲]. در این راستا در تحقیق Popov و همکاران (۲۰۱۹) به بررسی محتوای پروتئین CREB به دنبال فعالیت ورزشی استقامتی حاد در عضله‌ی اسکلتی انسان پرداختند. فعالیت ورزشی به مدت ۲ ماه تمرین هوازی (۵ روز در هفته، ۱ ساعت در روز) انجام شد. محتوای پروتئین CREB به دنبال تمرین استقامتی افزایش یافت [۱۶]. همچنین در تحقیق دیگر Egan و همکاران (۲۰۱۰) به بررسی محتوای پروتئین CREB به دنبال فعالیت ورزشی هوازی با شدت پایین (۴۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی) و شدت زیاد (۸۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی) در عضله‌ی اسکلتی مردان پرداختند. محتوای پروتئین CREB در زمان‌های صفر و ۳ ساعت پس از فعالیت‌های ورزشی در گروه شدت پایین نسبت به شدت زیاد افزایش معنی‌داری داشت. اما در ۱۹ ساعت پس از فعالیت ورزشی محتوای پروتئین CREB در گروه تمرین با شدت زیاد نسبت به تمرین با شدت پایین بیشتر بود [۳۳]. در هر سه تحقیق Bruno و همکاران، Popov و همکاران و Egan و همکاران ما شاهد افزایش محتوای پروتئین CREB به دنبال انجام تمرین هوازی هستیم. در مقابل نتایج تحقیق حاضر نشان داد تمرین استقامتی محتوای پروتئین CREB را در گروه تمرین دیابتی نسبت به کنترل دیابتی کاهش می‌دهد، اما در گروه تمرین دیابتی نسبت به کنترل سالم افزایش را نشان داد. رفتار پیچیده‌ی مولکول‌ها در مسیرهای سیگنالینگ مختلف به دنبال تمرین‌های ورزشی به نوع، شدت، مدت و دیگر عوامل ورزش مرتبط است. همچنین شرایط آزمودنی‌ها (سالم یا بیمار) نیز باید مد نظر قرار گیرد. روش‌های آزمایشگاهی سنجش محتوا یا بیان ژن به دنبال مکان‌های اندازه‌گیری می‌تواند از عوامل مهم دیگر باشد. اندازه‌گیری‌های محتوای پروتئین‌های mTOR و CREB به تنهایی نمی‌تواند فرایند پیچیده‌ی تنظیم متابولیسم بافت چربی را پوشش دهد و باید علاوه بر پروتئین‌های دیگر مربوط به پروتئین‌های mTOR و CREB، مسیرهای دیگری نیز بررسی شوند.

نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر ما شاهد کاهش محتوای پروتئین‌های mTOR و CREB در گروه تمرین استقامتی نسبت به گروه کنترل دیابتی بودیم. کاهش محتوای این پروتئین‌ها در بافت چربی آزمودنی‌های دیابتی نوع دو می‌تواند در تنظیم سطوح بافت چربی و همچنین افزایش سوخت‌وساز این بافت به دنبال تمرین استقامتی جهت درمان چاقی مهم باشد. با این وجود در تجویز برنامه‌های تمرینی برای آزمودنی‌های دیابتی نوع دو که چاق یا مستعد چاقی هستند، باید شدت، مدت و نوع تمرین‌های ورزشی را بررسی کرد تا بهترین تأثیر را داشته باشند.

مآخذ

سپاسگزاری

نتایج گزارش شده حاصل تلاش نویسندگان این مقاله است که در دانشگاه شیراز و علوم پزشکی شیراز انجام شده است. از همه‌ی افرادی که در انجام و جمع‌آوری این پژوهش ما را یاری کردند، کمال تشکر را داریم.

تضاد منافع

این مطالعه هیچ‌گونه تضاد منفعی برای نویسندگان نداشته است.

- Singh R, Chandel S, Dey D, Ghosh A, Roy S, Ravichandiran V, et al. Epigenetic modification and therapeutic targets of diabetes mellitus. *Bioscience Reports*, 2020; 40(9):BSR20202160.
- Ràfols ME. Adipose tissue: cell heterogeneity and functional diversity. *Endocrinología y Nutrición*, 2014; 61(2):100-12.
- Delgado-Velázquez J, Mendivil-Alvarado H, Coronado-Alvarado CD, Astiazaran-Garcia H. Extracellular Vesicles from Adipose Tissue Could Promote Metabolic Adaptation through PI3K/Akt/mTOR. *Cells*, 2022; 11(11):1831.
- Qi L, Saberi M, Zmuda E, Wang Y, Altarejos J, Zhang X, et al. Adipocyte CREB promotes insulin resistance in obesity. *Cell Metabolism*, 2009; 9(3):277-86.
- Saxton RA, Sabatini DM. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell*, 2017; 168(6):960-76.
- Yuan T, Rafizadeh S, Gorrepati KD, Lupse B, Oberholzer J, Maedler K, et al. Reciprocal regulation of mTOR complexes in pancreatic islets from humans with type 2 diabetes. *Diabetologia*, 2017; 60(4):668-78.
- Mao Z, Zhang W. Role of mTOR in glucose and lipid metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018; 19(7):2043.
- Cai H, Dong LQ, Liu F. Recent advances in adipose mTOR signaling and function: therapeutic prospects. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2016; 37(4):303-17.
- Yoon YS, Liu W, Van de Velde S, Matsumura S, Wiater E, Huang L, et al. Activation of the adipocyte CREB/CRTC pathway in obesity. *Communications Biology*, 2021; 4(1):1-5.
- Benchoula K, Parhar IS, Madhavan P, Hwa WE. CREB nuclear transcription activity as a targeting factor in the treatment of diabetes and diabetes complications. *Biochemical Pharmacology*, 2021; 188:114531.
- Jung WS, Park HY, Kim SW, Kim J, Hwang H, Lim K. Prediction of non-exercise activity thermogenesis (NEAT) using multiple linear regression in healthy Korean adults: a preliminary study. *Physical Activity and Nutrition*, 2021; 25(1):23.
- Petridou A, Siopi A, Mougios V. Exercise in the management of obesity. *Metabolism*, 2019; 92:163-9.
- Khodaveisi M, Azizpour B, Jadidi A, Mohammadi Y. Education based on the health belief model to improve the level of physical activity. *Physical Activity and Nutrition*, 2021; 25(4):10-17.
- Dorling J, Broom DR, Burns SF, Clayton DJ, Deighton K, James LJ, et al. Acute and chronic effects of exercise on appetite, energy intake, and appetite-related hormones: the modulating effect of adiposity, sex, and habitual physical activity. *Nutrients*, 2018; 10(9):1140.
- Bae JY, Shin KO, Woo J, Woo SH, Jang KS, Lee YH, et al. Exercise and dietary change ameliorate high fat diet induced obesity and insulin resistance via mTOR signaling pathway. *Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry*, 2016; 20(2):28-33.
- Popov DV, Makhnovskii PA, Shagimardanova EI, Gazizova GR, Lysenko EA, Gusev OA, et al. Contractile activity-specific transcriptome response to acute endurance exercise and training in human skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2019; 316(4):E605-14.
- Ghodratnama A, Shabani M, Sherafati Moghadam M. The Effect of Endurance and High-Intensity Interval Training on the Content MSTN and Follistatin Proteins in the Left Ventricular Tissue of

- The Heart of Type 1 and 2 Diabetic Rats. *Iranian Journal of Diabetes and Metabolism*, 2022; 21(5):287-297
18. Aghaei Bahmanbeglou N, Sherafati Moghadam M, Amirahmadi M. The effect of ampk and p53 proteins on tor pathway following endurance training in the left ventricle of the heart of diabetic rats by streptozotocin and nicotinamide. *Iranian Journal of Diabetes and Metabolism*, 2021; 21(1):13-23
 19. Jokar M, Sherafati Moghadam M, Salesi M. The effect of endurance exercise on the content of ampk and pgc-1 α proteins in the left ventricular heart tissue of rats with type 2 diabetes. *Iranian Journal of Diabetes and Metabolism*, 2020; 19 (5) :252-260
 20. Shabani M, Sherafati Moghadam M, Moghaddami K. The effect of endurance training on protein kinase-b and mechanical target of rapamycin in the left ventricle of the heart of diabetic rats induced by streptozotocin and nicotinamide. *Iranian Journal of Diabetes and Metabolism*, 2020; 19(6): 309-317
 21. Jokar M, Sherafati Moghadam M. High intensity interval training inhibits autophagy in the heart tissue of type 2 diabetic rats by decreasing the content of foxo3a and beclin-1 proteins. *Iranian Journal of Diabetes and Metabolism*, 2019; 18(6):292-299
 22. Soci UP, Melo SF, Gomes JL, Silveira AC, Nóbrega C, Oliveira EM. Exercise training and epigenetic regulation: multilevel modification and regulation of gene expression. *Exercise for Cardiovascular Disease Prevention and Treatment*, 2017; 281-322.
 23. V Mendonca G, Pazarat-Correia P, R Vaz J, Silva L, D Almeida I, S Heffernan K. Impact of exercise training on physiological measures of physical fitness in the elderly. *Current Aging Science*, 2016; 9(4):240-59.
 24. Hansen D, De Strijcker D, Calders P. Impact of endurance exercise training in the fasted state on muscle biochemistry and metabolism in healthy subjects: can these effects be of particular clinical benefit to type 2 diabetes mellitus and insulin-resistant patients? *Sports Medicine*, 2017; 47(3):415-28.
 25. Bhati P, Shenoy S, Hussain ME. Exercise training and cardiac autonomic function in type 2 diabetes mellitus: a systematic review. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 2018; 12(1):69-78.
 26. Muscella A, Stefàno E, Lunetti P, Capobianco L, Marsigliante S. The regulation of fat metabolism during aerobic exercise. *Biomolecules*, 2020; 10(12):1699.
 27. Symonds M, Bloor I, Galvez F, Domfeh E, Maicas B, Poston L, Taylor P. Effect of a dietary and exercise intervention during pregnancy and lactation on white adipose tissue gene profiles and adiposity with maternal obesity. *The FASEB Journal*, 2016; 30:1214-3.
 28. Lewis CA, Griffiths B, Santos CR, Pende M, Schulze A. Regulation of the SREBP transcription factors by mTORC1. *Biochemical Society Transactions*, 2011; 495-499.
 29. Caron A, Richard D, Laplante M. The roles of mTOR complexes in lipid metabolism. *Annu Rev Nutr*, 2015; 35(321):321-348.
 30. Fernández- Veledo S, Vázquez- Carballo A, Vila- Bedmar R, Ceperuelo- Mallafre V, Vendrell J. Role of energy- and nutrient- sensing kinases AMP- activated Protein Kinase (AMPK) and Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) in Adipocyte Differentiation. *IUBMB Life*, 2013; 65(7):572-83.
 31. Mao Z, Zhang W. Role of mTOR in glucose and lipid metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018; 19(7):2043.
 32. Bruno NE, Kelly KA, Hawkins R, Bramah Lawani M, Amelio AL, Nwachukwu JC, et al. Creb coactivators direct anabolic responses and enhance performance of skeletal muscle. *The EMBO journal*, 2014; 33(9):1027-43.
 33. Egan B, Carson BP, Garcia- Roves PM, Chibalin AV, Sarsfield FM, Barron N, et al. Exercise intensity- dependent regulation of peroxisome proliferator- activated receptor γ coactivator- 1 α mRNA abundance is associated with differential activation of upstream signalling kinases in human skeletal muscle. *The Journal of physiology*, 2010; 588(10):1779-90.

The Effect of Endurance Training On the Amount of Proteins Involved In the Regulation of Adipose Tissue Metabolism in Type 2 Diabetic Rats

Sajad Mirzaei¹, Mohammad Sherafati Moghadam^{*1}, Negin Dejdari², Mahdiah Abdi²

1. Department of Sport Sciences, Apadana Institute of Higher Education, Shiraz, Iran

2. Department of Sport Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

ABSTRACT

Background: mTOR and CREB proteins are two important factors in cellular pathways and regulating fat tissue metabolism. Therefore, the aim of this research is the effect of endurance training on the amount of mTOR and CREB proteins in the adipose tissue of type 2 diabetic rats.

Methods: In this experimental study, 18 rats 2-month-old male Sprague-Dawley rats with a mean weight of 270 ± 20 g were selected. 12 rats became type 2 diabetic by intraperitoneal injection of Streptozotocin solutions. These rats were randomly divided into 2 groups: diabetic training and diabetic control (6 heads per group); A healthy control group (6 heads) was also considered. The training group practiced endurance training 4 days a week for 6 weeks. Data were analyzed using SPSS software version 23 and one-way ANOVA and Tukey post hoc tests.

Results: mTOR protein content showed a significant change after 6 weeks of endurance training ($P=0.0001$); Tukey's post hoc test showed that this change was significant between the pairs of diabetic training groups to healthy controls ($P=0.004$) and diabetic control groups to healthy controls ($P=0.0001$). CREB protein content showed a significant change ($P=0.0001$); this change was significant between the pairs of diabetic training to diabetic control groups ($P=0.02$), diabetic training to healthy control ($P=0.0001$), and diabetic control to healthy control groups ($P=0.0001$).

Conclusion: mTOR and CREB proteins decreased after Endurance Training, which can be effective in regulating adipose tissue metabolism; however, more training conditions should be considered.

Keywords: Endurance Training, Mammalian Target of Rapamycin, cAMP Response Element-Binding Protein, Fat Tissue, Type 2 Diabetes

* Fars Province-Shiraz-Moallem Square, North Iman, the Central Building of Apadana Institute of Higher Education, Postal Code: 7187985443, TEL: 071 36987, Email: m.sherafati@hiau.ac.ir

