

تاثیر تمرین تداومی و تناوبی بر نکرپتوزیس و آپوتوز پروتئین های شبکه اندوپلاسمیک قلب رت های ویستار دیابتی

مجید جهانی عنصرودی^۱، حسن متین همایی^{۲*}، پروین فرزانی^۲

(۱) گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکز، تهران، ایران
(۲) گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکز، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۱۷

چکیده

مقدمه: دیابت شایع ترین بیماری اندوکراین است. آپوتوز و نکرپتوزیس نقش عمده ای در فرآیند بیماری های قلبی ناشی از دیابت دارند، اما اثرات تمرین تداومی و تناوبی بر آپوتوز و نکرپتوزی سلول های قلب افراد دیابتی مشخص نیست. هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر شدت های مختلف تمرین هوازی بر آپوتوز و نکرپتوزیس در بافت قلبی موش های دیابتی بود.

مواد و روش ها: بدین منظور، ۳۲ سر موش صحرایی نر بالغ سفید نژاد ویستار (سن 12 ± 2 هفته، وزن 175 ± 15 گرم) به طور تصادفی به ۴ گروه همگن ۸ سری شامل: گروه کنترل سالم (C)، گروه کنترل دیابتی (D)، گروه دیابتی به همراه تمرین تداومی با شدت متوسط روزانه ۵۵ دقیقه ۲۶ متر در دقیقه (D+MICT) و گروه دیابتی به همراه تمرین تناوبی (D+HIIT) با شدت ۸۵ تا ۹۰ درصد سرعت بیشینه ۵ روز در هفته به مدت ۸ هفته تقسیم شدند، البته قبل از شروع پروتکل تمرینی سرعت دویدن برای به دست آوردن حداکثر اکسیژن مصرفی محاسبه شد. برای بررسی تغییرات در بیان پروتئین های مرتبط با مسیر مرگ آپوتوتیک و نکرپتوتیک در میکارد عضله قلبی دیابتی شده از روش مبتنی بر روش وسترن بلات استفاده شد. از تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) برای بررسی تفاوت بین گروه ها استفاده شد و سطح معنی داری ($P \leq 0.05$) تعیین شد.

یافته های پژوهش: نتایج نشان داد القای دیابت نوع ۲ سبب افزایش مرگ سلولی آپوتوتیک و نکرپتوتیک می گردد ($P=0.001$). در حالی که، هر دو نوع تمرین هوازی تداومی و تناوبی شدید موجب تعدیل مرگ سلولی آپوتوتیک می شود ($P \leq 0.05$). اما تاثیر تمرین تناوبی از تمرین تداومی بیشتر بود. با این حال فقط تمرین تناوبی بر مرگ نکرپتوزیس تاثیر کاهشی معنی داری داشت ($P \leq 0.05$).

بحث و نتیجه گیری: به نظر می رسد که، انجام تمرینات تداومی و تناوبی بر مرگ آپوتوتیک تاثیر دارند. ولی تمرینات تناوبی شدید بر مرگ نکرپتوتیک موثر می باشد.

واژه های کلیدی: شبکه اندوپلاسمیک، تمرین هوازی، آپوتوز، نکرپتوز، دیابت نوع ۲

* نویسنده مسئول: گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکز، تهران، ایران

Email: hassan.mhomaie@gmail.com

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

شیوع دیابت در سراسر جهان به شدت در حال افزایش است (۱). این در حالی است که افراد مبتلا به دیابت همواره در معرض بیماری های قلبی و عروقی قرار دارند. بنا بر این، عوارض قلبی-عروقی علت اصلی مرگ و میر ناشی از دیابت است (۲). بدون داشتن تغییرات فشارخون و بیماری عروق کرونر، وضعیتی در قلب به وجود می آید که کاردیومیوپاتی ناشی از دیابت نامیده می شود (۳). دیابت باعث توسعه آپوپتوز در سلول های قلبی می شود. با وجود این که آپوپتوز شکلی از مرگ برنامه ریزی شده سلولی بوده و تحت شرایط فیزیولوژیکی در حفظ هوموستاز بافتی مشارکت دارد اما در وضعیت های پاتولوژیکی معین مثل کبد چرب و دیابت میزان آن از حدود طبیعی فراتر می رود (۴). آپوپتوز یک فرآیند بیوشیمیایی است و به سه نوع آپوپتوز، شبه آپوپتوز و شبه نکروز (نکرپتوزیس) دسته بندی می شود. که آپوپتوز و شبه آپوپتوز مرگ برنامه ریزی شده سلول است، اما نکروز مرگ تصادفی سلول و پاسخ طبیعی سلول های بدن به استرس ها و صدمات فیزیولوژیکی است. تراکم کروماتین درون هسته، چروکیدگی سیتوپلاسم، قطعه قطعه شدن DNA را می توان از مشخصات آپوپتوز عنوان کرد. از طرفی نکروزپتوزیس در بسیاری از بیماری ها با زمینه التهابی مانند پانکراتیت، بیماری کرون و آنفارکتوس میوکارد دیده می شود. مکانیسم سیگنالینگ نکروزپتوزیس با تولید $TNF-\alpha$ شروع می شود که لیگاند گیرنده $TNF-\alpha$ (TNFR1) می باشد. زمانی که این گیرنده ها توسط لیگاندهای مربوطه تحریک شوند، سبب فعال شدن کاسپازها و القاء آپوپتوز می گردند (۵). اخیراً نشان داده شده آپوپتوز نقش عمده ای در فرآیند بیماری های قلبی-عروقی ایفا می کند. در نتیجه مهار آپوپتوز در میوکارد، استراتژی مهمی در درمان بیماری های قلبی-عروقی و عوارض ناشی از آن در افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ می باشد (۶). تمرینات ورزشی هوازی به عنوان یک عامل موثر در پیشگیری و درمان چاقی و عوارض ناشی از آن مثل بیماری های قلبی-عروقی و دیابت می باشد (۷-۹). در تمرینات تناوبی دوره های تکراری و کوتاه مدت فعالیت

با شدت بالا با وهله های استراحت غیرفعال یا فعال با شدت متوسط یا پایین انجام می گردد. در روش تداومی، فعالیتی مداوم و بدون توقف با شدت متوسط بدون وهله های استراحت انجام می گیرد (۱۰). در بیماران دیابتی با توجه به تجمع چربی، اضافه وزن، امکان ابتلا به سندرم متابولیک، بیماری های قلبی-عروقی و آترواسکلروزیس، تعیین شدت تمرین مهم است. از طرفی گزارش شده که حداقل شدت تمرینی برای تاثیرگذاری بیشتر بر لیپیدها، فعالیت بدنی با شدت ۷۵ درصد حداکثر شدت ضربان قلب است (۱۱). که البته این شدت از تمرین با چالش هایی مواجه است (۱۰). در همین راستا کاظمی و همکاران (۲۰۱۶)، با بررسی تأثیر تمرین تناوبی شدید بر سطوح عامل نکروز تومور آلفا در بافت چربی و مقاومت به انسولین در موش ها گزارش کردند که تمرین تناوبی شدید می تواند باعث کاهش سطوح عامل نکروز تومور آلفا در بافت چربی و نیز انسولین پلاسمایی شود (۱۲). در مقابل کانتر و همکاران (۲۰۱۶)، در مطالعه ای با عنوان تأثیر تمرینات با شدت کم بر آپوپتوز در بافت قلبی موش های دیابتی بیان کردند که، تمرینات با شدت کم اثرات محافظتی در برابر آپوپتوز حاصل از دیابت در بافت قلبی موش های دیابتی دارد (۱۳). با این حال کلو و همکاران (۲۰۱۵)، در تحقیقی با عنوان مقایسه اثر شدت تمرینات هوازی بر روی آپوپتوز و استرس اکسیداتیو در موش ها بیان کردند تمرینات تناوبی با شدت بالا و تمرینات تداومی با شدت متوسط هر دو اثر یکسانی را بر آپوپتوز و استرس اکسیداتیو در بافت قلب موش ها دارند (۱۴). در مقابل لیموس و همکاران (۲۰۱۱)، در یک مطالعه مروری با عنوان مقایسه اثرات تمرین شدید و متوسط بر استرس اکسیداتیو و التهاب ناشی از دیابت نوع ۲ مثل $TNF-\alpha$ در موش ها نتیجه گیری کردند که، انجام تمرینات با شدت متوسط به دلیل خاصیت ضد التهابی و ضد آنتی اکسیدانی اثرات مفیدی بر متابولیسم افراد دیابتی دارند. آن ها هم چنین عنوان کردند انجام تمرینات با شدت بالا ممکن است برای افراد دیابت مضر باشد (۱۵). بررسی مطالعات پیشین حاکی از وجود تناقض در نتایج مطالعات صورت گرفته دارد. از طرفی تاکنون مطالعه

کافی در رابطه با اثرات شدت تمرین هوازی در برابر عوارض آسیب قلبی و آپوپتوز ناشی از دیابت انجام نشده است، لذا تحقیق حاضر به منظور بررسی اثر شدت تمرین تداومی و تناوبی بر انواع مرگ های برنامه ریزی شده سلول های قلبی ناشی از دیابت در موش های صحرایی نر مبتلا به دیابت صورت گرفته است.

مواد و روش ها

تحقیق حاضر از نوع مطالعات حیوانی بالینی مداخله ای تجربی (دو متغیر مستقل) در قالب یک طرح پس آزمون دو عاملی است که با استفاده از ۴ گروه ۸ سری از موش ها براساس مقررات نحوه کار با حیوانات آزمایشگاهی در محل آزمایشگاه مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی تبریز پس از تصویب در کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری (IR.IAU.SARI.REC.1397.8) انجام شد. برای این منظور، تعداد ۳۲ سر موش های صحرایی نر سفید نژاد ویستار از مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی تبریز با سن حدود سه ماه و در محدوده وزنی ۲۲۵ الی ۳۰۰ گرمی تهیه شد. به منظور ایجاد حالت سازش با محیط، جلوگیری از استرس و تغییر شرایط فیزیولوژیکی آزمودنی ها در محیط آزمایشگاهی ویژه حیوانات با دارا بودن شرایط ذیل؛ دما 20 ± 2 درجه سانتی گراد، رطوبت نسبی 50 ± 5 درصد، با کمترین سروصدا و چرخه روشنایی- تاریکی ۱۲:۱۲ ساعته (شروع روشنایی از ساعت ۷:۰۰ صبح الی ۱۹:۰۰ عصر) به صورت ۳ تا ۵ عدد موش در هر قفس از جنس پلی کربنات شفاف با قابلیت اتوکلاو قرار داده شد (۲۲). در طی این دوره، تمامی حیوانات به صورت آزادانه به آب و غذای استاندارد حیوانی (پلت تهیه شده از شرکت خوراک سازان اصفهان) به مدت دو ماه دسترسی داشتند که این میزان غذای مصرفی به صورت دقیق اندازه گیری و ثبت گردید. مداخلات تمرینات ورزشی پس از گذشت دست کم دو هفته استقرار حیوانات و در آغاز چرخه شبانه (ساعت ۱۹:۰۰) در آزمایشگاه حیوانات انجام شد. سپس نمونه ها (به غیر از گروه های کنترل سالم و کنترل دیابتی) به مدت ۷ روز تحت برنامه آشنایی با نحوه فعالیت روی نوارگردان قرار گرفتند. طی دوره آشنایی، شیب نوارگردان صفر

درصد، سرعت ۱۵-۱۰ متر در دقیقه و مدت تمرین نیز ۵-۱۰ دقیقه در روز بود. در پایان این دوره، آزمودنی ها پس از مطابقت وزنی به طور تصادفی در یکی از ۴ گروه ۸ سری قرار گرفتند.

روش/لقاء دیابت: پس از گذشت دو هفته از شرایط سازگاری با محیط آزمایشگاه، برای القای دیابت نوع ۲، طبق روش گروه مطالعاتی ساسیدهاران و همکاران (۲۰۱۳)، دو هفته مصرف غذای پرچرب (۴۵ درصد چربی، ۲۱ درصد پروتئین و ۳۴ درصد کربوهیدرات) که توسط محققان و با همکاری شرکت خوراک سازان اصفهان تهیه گردید و سپس تزریق درون صفاقی (IP) استرپتوزوسین (شرکت سیگما آلدیج، آمریکا) در یک دوز ۳۵ میلی گرم در کیلوگرم وزن بدن حل شده در بافر سیترات ۰/۱ مولار (PH=۴/۵) بعد از ۱۲ ساعت ناشتایی به صورت تک وهله ای اعمال شد (۱۶). برای گروه کنترل سالم و دیابتی (بدون تمرین) نیز همان مقدار بافر سیترات ۰/۱ مولار برای ایجاد شرایط کاملاً یکسان با گروه های دریافت کننده STZ تزریق شد. یک هفته پس از تزریق STZ، میزان گلوکز نمونه خونی از ورید دمی حیوان و با استفاده از گلوکومتر بررسی گردید. غلظت گلوکز خون بالاتر از ۳۰۰-۲۵۰ میلی گرم در دسی لیتر دیابتی نوع ۲ وارد تحقیق شدند.

روش تمرین تناوبی: روش تمرینی (تناوبی) تحقیق حاضر برگرفته از مطالعه عسگری هزاوه و همکاران (۲۰۱۸) بود که در آن آزمودنی ها برای ۵ روز در هفته (شنبه، یکشنبه، سه شنبه، چهارشنبه و پنجشنبه) برای مدت ۸ هفته در یک برنامه تمرین تناوبی شدید (HIIT) در پایان سیکل استراحتی و شروع فعالیت حیوانات در محدوده ساعت ۱۸-۱۶ عصر بر روی نوارگردان الکترونیکی هوشمند حیوانی شرکت کردند (۱۷). قبل از اجرای پروتکل، آزمون رسیدن به واماندگی برای محاسبه بیشینه سرعت موش ها انجام شد. به طوری که، سرعت دویدن با ۱۰ متر بر دقیقه شروع و در هر دو دقیقه یک بار، سرعتی معادل با سه متر بر دقیقه به آن تا زمان رسیدن به حالت واماندگی افزوده شد. زمان رسیدن به خستگی با عدم توانایی موش ها در دویدن روی نوارگردان با وجود ایجاد شوک الکتریکی مشخص شد. روش تمرین HIIT شامل سه

مرحله گرم کردن، بدنه اصلی تمرین و سرد کردن بود. تمرینات در مرحله گرم و سرد کردن به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰ متر در دقیقه (برابر با شدت ۳۰-۴۰ درصد VO_{2max}) برای موش ها در نظر گرفته شدند. بدنه اصلی تمرین نیز برابر با شدت ۸۵-۹۰ درصد سرعت بیشینه در ۶ تا ۱۲ وهله (هر هفته یک نوبت به وهله های فعالیت حیوانات اضافه می گردد) بود. به علاوه، تناوب های یک دقیقه ای استراحت فعال که شامل دویدن های ادامه دار روی نوارگردان با سرعت ۱۰ متر در دقیقه می باشد که میان وهله های فعالیت اعمال شد. هم چنین، گروه کنترل سالم که در هیچ گونه برنامه فعالیت شرکت نکردند، برای ایجاد شرایط کاملاً یکسان با سایر گروه های تمرینی، ۵ روز در هفته به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در هر جلسه برای سازگاری با محیط بر روی نوارگردان بی حرکت قرار

داده شدند. به منظور تحریک موش ها برای دویدن از محرک الکتریکی با ولتاژ کم تعبیه شده در قسمت عقبی نوارگردان، استفاده شد. تمرین تداومی: گروه تمرین هوازی ۵ جلسه در هفته و ۸ هفته بر روی نوار گردان موتوردار دویدند. در ابتدا، موش های صحرایی به مدت ۱۰ دقیقه در جلسه و با سرعت ۱۰ متر در دقیقه و با شیب صفر درجه تمرین خود را در پایان سیکل استراحتی و شروع فعالیت حیوانات در محدوده ساعت ۱۸-۱۶ عصر بر روی نوارگردان الکترونیکی هوشمند حیوانی انجام دادند (هفته اول). سرعت و مدت تمرین به تدریج در طول ۳ هفته بعد افزایش یافت تا این که در هفته های پایانی مدت و شدت تمرین به ترتیب به ۵۵ دقیقه در روز و ۲۶ متر در دقیقه رسید (۱۲)، برنامه تمرینی کامل در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

جدول شماره ۱. پروتکل تمرین تداومی

سرعت	مدت تمرین		
۱۰ (m/min)	۱۰ (min)	روز اول	هفته اول
۱۱ (m/min)	۱۵ (min)	روز دوم	
۱۲ (m/min)	۲۰ (min)	روز سوم	
۱۳ (m/min)	۲۵ (min)	روز چهارم	
۱۴ (m/min)	۳۰ (min)	روز پنجم	
۱۶ (m/min)	۴۰ (min)	روز اول	هفته دوم
۱۷ (m/min)	۴۰ (min)	روز دوم	
۱۸ (m/min)	۴۵ (min)	روز سوم	
۱۹ (m/min)	۵۰ (min)	روز چهارم	
۲۰ (m/min)	۵۵ (min)	روز پنجم	
۲۲ (m/min)	۶۰ (min)		هفته سوم
۲۳ (m/min)	۶۰ (min)		هفته چهارم
۲۴ (m/min)	۶۰ (min)		هفته پنجم
۲۵ (m/min)	۶۰ (min)		هفته ششم
۲۶ (m/min)	۶۰ (min)		هفته هفتم
۲۷ (m/min)	۶۰ (min)		هفته هشتم

روش/ایمونو بلاتینگ: تمامی موش های صحرایی، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی (جهت از بین بردن اثرات حاد تمرین) و پس از ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتایی، با تزریق داخل صفاقی کتامین (90 mg.kg^{-1}) و زایلازین (10 mg.kg^{-1}) به روش بدون درد توسط متخصصین کارآموده بی هوش و جراحی شدند. در ادامه نیز برای ارزیابی میزان بیان برخی از پروتئین های درگیر در مسیرهای نکرپتوزیس از روش

وسترن بلات استفاده شد. ابتدا، برای تهیه هموژنه ۱۰ درصد وزنی حجمی بافت قلب از بافر ریپا (شرکت سیگما) حاوی مهارکننده پروتئاز کوکتیل (سیگما) استفاده شد. غلظت تام پروتئین با روش برآدفورد (سیگما) اندازه گیری شد. سپس پروتئین ها در ژل ۱۰ درصد دناتوره کننده پلی آکریل آمید حاوی سدیم دودسیل سولفات (SDS) با دستگاه الکتروفورز (Biorad) تفکیک شدند. بعد از تفکیک، باندهای پروتئینی بر روی

با میکروسکوپ فلورسنت (OLYMPUS) و طول موج تحریکی ۴۵۰ نانومتر در طول موج خروجی ۵۶۵ نانومتر رویت گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: بعد از جمع آوری داده ها توزیع داده ها با تست کلموگروف-اسمیرنوف تعیین و به علت توزیع نرمال داده ها میانگین با آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی توکی مقایسه گردید. نتایج به صورت میانگین و انحراف از استاندارد بیان گردید.

یافته های پژوهشی

اثر دو نوع تمرین ورزشی HIIT و MICT بر روی شاخص آپتوز: نتایج نشان داد که دیابت سطح آپتوز را در بافت قلب در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری افزایش می دهد ($P < 0.05$) (شکل شماره ۱)، هر دو نوع تمرین ورزشی تداومی و تناوبی سطح شاخص آپتوز را در مقایسه با گروه کنترل کاهش دادند ($P < 0.001$) اما اثر ورزش تناوبی در مقایسه با ورزش تداومی بیشتر بود (شکل شماره ۱).

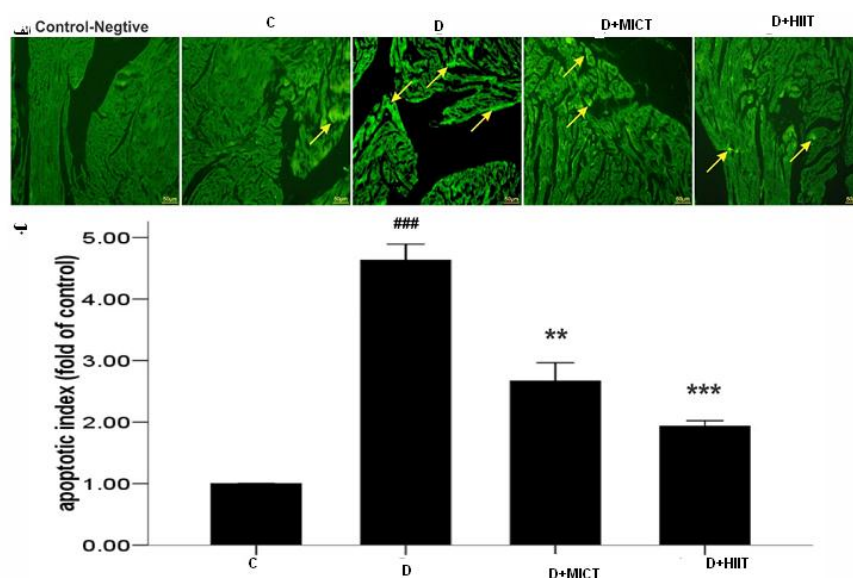
اثر دو نوع تمرین ورزشی HIIT و MICT بر روی شاخص های نکروپتوز: نتایج نشان داد که دیابت سطح نکروپتوز را نیز در بافت قلب در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری افزایش می دهد ($P < 0.05$) (شکل شماره ۲)، هم چنین نتایج تست تعقیبی توکی نشان داد که فقط ورزش تناوبی بر مرگ نکروپتوزیس تاثیر معنی داری دارد و ورزش تداومی بر مرگ نکروپتوزیس تاثیر محسوسی نشان نداد (شکل شماره ۲ و جدول شماره ۲).

غشاء پلی وینیلیدین دی فلوراید (PVDF) سیگما منتقل شدند. بعد از استفاده از بافر بلاکینگ برای پوشش دادن نواحی خالی از پروتئین غشاء از بابت بلوکه کننده حاوی سرم آلبومین گاوی ۳ درصد استفاده شد. سپس غشاء با آنتی بادی های اولیه موشی ضد ۳ sc B2) MLkL(293201, TNF α (4E1) sc 130349، با رقت ۱ به ۲۰۰ (در طول شب) استفاده شد. غشاها پس از چهار بار شستشو هر بار به مدت ۵ دقیقه با بافر فسفات نمکی حاوی ۰/۰۵ درصد توین ۲۰، در معرض آنتی بادی ثانویه ضد موشی کونژوگ با HRP به مدت یک ساعت قرار گرفتند. پس از شستشوی مجدد با روش قبلی این بار به صورت سه تکرار از کیت (BioRad, ECL) که برای آشکارسازی مجموعه های ایمنی تشکیل شده استفاده گردید. غشاها در معرض فیلم رادیوگرافی قرار گرفته و دانسیته باندها توسط نرم افزار Image J اندازه گیری شده و دانسیته باندهای پروتئین هدف در مقابل لودینگ کنترل بتا-اکتین نرمالیزه شد. در انتها نیز نتایج به صورت دانسیته نسبی (نسبت به گروه کنترل) ارائه شده است (۲۴).

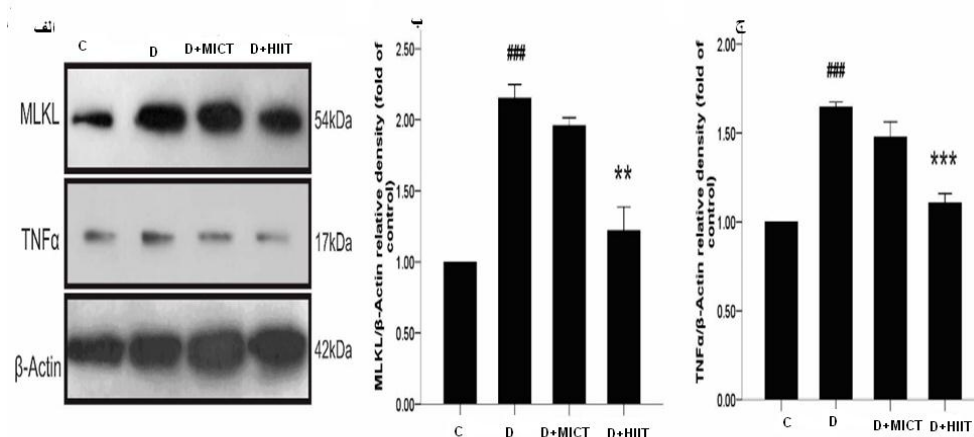
روش TUNEL: برای بررسی آپتوز از کیت تانل (Roche-11684795910) استفاده شد. رنگ آمیزی مطابق دستور العمل کیت به طور خلاصه به ترتیب زیر عمل شد. ابتدا برش های بافت پارافین قلب تهیه و بعد از دیپارافینه و آبدی شدن در بافر سیترات و به مدت ۱۵ دقیقه در مایکروویو ۶۰۰ وات قرار داده شدند. بعد از ظاهر شدن آنتی ژن ها بعد از شستشوی لام ها در PBS مخلوط واکنش تانل به نمونه ها اضافه شد. به مدت ۶۰ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه شد. مجدداً اسلایدها با PBS شسته شده و لام ها مونته گردیدند.

جدول شماره ۲. اثر تمرین ورزشی HIIT و MICT بر روی شاخص های نکروپتوزی

گروه	سالم بی تمرین SD \pm Mean	دیابتی بی تمرین SD \pm Mean	دیابتی تداومی SD \pm Mean	دیابتی تناوبی SD \pm Mean	F	P
MLKL	۲ \pm ۱۲/۲	۵ \pm ۱۶/۶	۳ \pm ۱۸/۸	۳ \pm ۱۴/۴	۰/۸۲۹	۰/۰۰۲
TNF α	۳ \pm ۱۸/۱	۴ \pm ۲۱/۳	۵ \pm ۲۲/۳	۴ \pm ۲۳/۳	۰/۶۷۸	۰/۰۰۱



شکل شماره ۱. مقایسه میانگین آپوپتوز در گروه های مختلف مورد مطالعه
الف- تصاویر برش های بافتی بطن قلب رنگ آمیزی شده با روش تانل قسمت های فلورسانس سبز
نشان دهنده سلول های دچار مرگ آپوپتوتیک هستند (پیکان های زرد) ب) مقادیر کمی شده تصاویر تانل با
نرم افزار image تعداد در هر گروه N=8 ($P>0.01$) در مقایسه با گروه کنترل ($P>0.01$)
در مقایسه با گروه دیابت ($P>0.01$)



شکل شماره ۲. مقایسه میانگین MLKL, TNFα در گروه های مختلف مورد مطالعه
در مقایسه با گروه کنترل
** ($P>0.01$) در مقایسه با گروه دیابت+کنترل
*** ($P>0.001$) در مقایسه با گروه دیابت+کنترل

استروپتوزوتوسین با دوز ۳۵ میلی گرم در کیلوگرم وزن بدن دیابت نوع ۲ القاء شده و هر دو نوع مرگ سلولی آپوپتوتیک و نکروز اتفاق می افتد. هم چنین هر دو نوع تمرین هوازی تداومی با شدت متوسط و تناوبی شدید بر مرگ آپوپتوتیک تأثیر دارد. اما تأثیر ورزش تناوبی

بحث و نتیجه گیری

هدف پژوهش حاضر تعیین اثر شدت تمرین تداومی و تناوبی بر آپوپتوز و نکروپتوزیس در سلول های قلب موش های دیابتی شده با استروپتوزوتوسین بود. نتایج نشان داد که با تزریق

قوی تر از ورزش تداومی با شدت متوسط می باشد. هم چنین فقط ورزش تناوبی بر مرگ نکروپتوزیس تاثیر معنی داری داشت. چنان چه القاء دیابت توسط استرپتوزوتوسین در مطالعات قبلی نیز دیده شده است. نتایج حاضر نیز دور از انتظار نبود (۱۸). آپوپتوز به عنوان یکی از آسیب های دیابت بر میوکارد توسط فعال سازی اجزای مسیر آپوپتوز و فعالیت کاسپاز نشان داده شده و مرگ سلول های میوکاردی به عنوان یک اتفاق مهم در پیشرفت آسیب قلبی ناشی از دیابت شناخته شده است (۱۹). نشان داده شده که افزایش استرس اکسیداتیو متعاقب بیماری دیابت باعث افزایش میزان گونه های فعال اکسیژنی و کاهش ظرفیت دفاع آنتی اکسیدانی شده و در نتیجه مرگ برنامه ریزی شده سلول های قلبی یا الگوی آپوپتوز رخ می دهد. تحقیقات گزارش کرده اند که علت وقوع آپوپتوز سلول های قلبی در اثر دیابت علاوه بر افزایش استرس های اکسیداتیو، وقوع فرآیند التهابی می باشد (۲۰،۴). در مطالعه حاضر از تست تانل برای بررسی آپوپتوز استفاده شده که، القای آپوپتوز در گروه های دیابتی را در مقایسه با گروه کنترل تایید کرد (شکل شماره ۱).

به نظر می رسد که در دیابت نوع ۲ هر دو نوع مرگ سلولی (نکروز و آپوپتوز) اتفاق می افتد. که این نتایج در مطالعات قبلی نیز نشان داده شده اند (۲۰، ۱۵). نکروز پاسخ طبیعی سلول به صدمه های فیزیولوژیکی است که با برهم خوردگی توانایی سلول برای نگهداری هموئوستازی شروع می شود، با نفوذ آب و یون های خارج سلولی تمام اندامک های درون سلولی به خصوص میتوکندری متورم می شود و سپس با از هم پاشیدگی غشای سلولی و لیز سلولی تخریب صورت می گیرد و اجزای سیتوپلاسمی نظیر آنزیم های لیزوزومی در مایع خارج سلولی رها می شوند. بنا بر این به علت پاسخ های التهابی، مرگ سلولی از طریق نکروز با تخریب گسترده بافتی همراه است. مکانیسم سیگنالینگ نکروپتوزیس با تولید $TNF-\alpha$ شروع می شود که لیگاند گیرنده $TNFR1$ ($TNF-\alpha$) می باشد. زمانی که این گیرنده ها توسط لیگاندهای مربوطه تحریک شوند، سبب فعال شدن کاسپازها و القا

آپوپتوز می گردند (۵). در این مطالعه مقایسه اثر شدت های مختلف ورزش نشان داد که هر دو نوع تمرین هوازی تداومی با شدت متوسط و تناوبی شدید بر مرگ آپوپتوتیک تاثیر دارد. اما تاثیر ورزش تناوبی قوی تر از ورزش تداومی می باشد. هم چنین فقط ورزش تناوبی بر مرگ نکروپتوزیس تاثیر معنی داری داشت.

اثر تمرینات ورزشی روی آپوپتوز در مطالعات قبلی به وضوح دیده شده است (۲۱، ۱۳). در همین ارتباط، صالحی و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعه ای بیان داشتند که، افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانتی و کاهش سطح پروکسیداسیون لیپیدی که به دنبال فعالیت ورزشی پدید می آید، دارای تاثیرات مهمی در جلوگیری از عوارض آپوپتوز ناشی از دیابت و آسیب های بافتی ایجاد شده ناشی از استرس اکسیداتیو است (۲۲). هم چنین نشان داده شده است که تمرین ورزشی قبل از وقوع ایسکمی موجب کاهش نسبت بین پروتئین های پیش آپوپتوز و پروتئین های ضد آپوپتوز مانند Bcl-2 و کاهش سیگنالینگ فعال سازی کاسپاز-۳ (کاسپاز نهایی مسیر آپوپتوز) می شود (۲۳). در همین رابطه، میک میلان و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که شش هفته تمرین روی نوارگردان باعث افزایش Bcl-2 و کاهش Bax و نسبت Bax به Bcl-2 در موش های صحرایی می شود. از طرفی، یافته های تحقیق ما نشان داد که هر دو نوع شدت تمرینی بر مرگ آپوپتوتیک تاثیر دارد ولی اثر ورزش تناوبی قوی تر از اثر ورزش تداومی است. هم چنین نتایج مشابهی در تحقیقات قبلی به دست آمده است (۲۴، ۲۵). مکانیسم های متعددی در القاء آپوپتوز متعاقب بیماری دیابت در میوسیت های بافت قلبی دخیل می باشند که از آن جمله می توان به نقش استرس های اکسیداتیو در بافت عضلانی و قلبی موش های دیابتیک اشاره نمود. رادیکال های آزاد اکسیژن حاصله از استرس های اکسیداتیو و غیرفعال شدن آنزیم کینازی ERK1/2 و فعال شدن آنزیم کینازی دیگری به نام C-JUN/C-JUN/AP-1 می تواند بیانگر وقوع آپوپتوز در پی استرس های اکسیداتیو باشند (۲۹). آن چه که مسلم است مابقی

مسیر مرگ سلولی از طریق آنزیم کاسپاز ۳ و پلی‌آدنوزین دی فسفات ریبوز پلیمراز (PARP) خواهد بود. نقش مهمی آنزیم $GSK-3\beta$ در راه اندازی آپوپتوز از مسیر $TNF-\alpha$ به واسطه تجمع بیش از اندازه گلیکوژن در سلول‌های عضلانی از بین می‌رود و با فسفوریلاسیون P65 و بیان ژن NF.kB سلول عضلانی دچار آپوپتوز می‌گردد (۲۱). بنا بر این، سه عامل مهم در القاء آپوپتوز را نباید فراموش کرد؛ ۱- افزایش میزان هموگلوبین گلیکوزیله ۲- استرس‌های اکسیداتیو ۳- تجمع بیش از اندازه گلیکوژن در سلول‌های عضلانی. پژوهشگران بر این موضوع اتفاق نظر دارند که ورزش با کاهش استرس اکسیداتیو از عوامل بسیار مهم در کاهش روند آسیب‌های القائی توسط بیماری دیابت می‌باشد. به این صورت که، متعاقب فعالیت‌های ورزشی میزان بیان ژن مربوط به IGF-I یا فاکتور رشد شبه انسولینی در بافت عضلانی و قلبی افزایش می‌یابد از آن جایی که این فاکتور نقش حفاظتی در سلول‌های بدن داشته و در بهبود هیپوگلیسمی و افزایش حساسیت به انسولین بافت عضلانی موثر می‌باشد، بنا بر این نقش مثبت ورزش منظم در کاهش عوارض دیابت و هم‌خوانی نتایج مطالعه حاضر با نتایج سایر محققین مورد تأیید قرار می‌گیرد. هر چند مکانیسم‌های تأثیر ورزش HIIT هنوز به طور کامل مشخص نیست ولی به نظر می‌رسد که، این نوع شدت تمرینی با افزایش Vo_{2max} در مقایسه با شدت تمرینی MICT با توسعه بیشتر عروق خونی باعث افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در برابر رادیکال‌های آزاد می‌شود. در مقابل ادیت و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه‌ای با مقایسه اثرات شدت تمرین بر روی موش‌های دیابتی نتیجه‌گیری کردند که تمرینات ورزشی با شدت ملایم به دلیل خاصیت بیشتر ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی بر متابولیسم دیابتی‌ها تأثیر بیشتری دارند. که این نتایج با یافته‌های تحقیق حاضر مغایرت دارد. از دلایل مغایرت می‌توان به نوع تمرینات، (تمرینات شنا در مقابل تمرینات بر روی تردمیل) مدت زمان تمرین و هم‌چنین شدت تمرینات اشاره کرد (۱۵). از دیگر نتایج تحقیق حاضر نشان داده شد که تنها ورزش تناوبی با

شدت بالا بر مرگ نکرپتوزیس تأثیر معنی‌داری دارد که با نتایج تحقیقات قبلی بر روی افراد دیابتی نوع ۲ مطابقت دارد (۲۶). در همین ارتباط گومز و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه‌ای حیوانی به مدت ۷ هفته با انجام ورزش تناوبی با شدت بالا بیان کردند که انجام تمرینات با شدت بالا باعث کاهش بافت چربی سفید و هم‌چنین کاهش بیشتر شاخص‌های التهابی مثل $TNF-\alpha$ ، IL-6 و IL-8 می‌شود (۲۷). با توجه به نتایج اغلب مطالعات انجام شده به نظر می‌رسد که تمرین هوازی ممکن است یک عامل اصلی و بالقوه در تغییرات مربوط به $TNF-\alpha$ باشد. با این حال پاسخ‌های متابولیکی طی تمرین تناوبی، شدیدتر از پاسخ‌های تمرین‌های تداومی و متوالی و با شدت متوسط می‌باشد (۲۸). علاوه بر این، به نظر می‌رسد که ساز و کار تغییرات $TNF-\alpha$ پس از تمرین‌های تناوبی شدید، قوی‌تر از تغییرات آن پس از تمرینات هوازی با شدت متوسط است. بنا بر این، به احتمال زیاد تمرین‌های تناوبی شدید مانند تمرین‌های تداومی طولانی مدت با تغییر در میزان دسترسی به مواد غذایی طی ورزش و ایجاد کسر انرژی، مسیرهای متابولیکی موثر در تنظیم بیان $TNF-\alpha$ را فعال کرده و از این طریق در تعدیل و تنظیم این سایتوکاین موثر واقع می‌شوند. به دلیل بررسی نکردن بیوژنز میتوکندریایی که از محدودیت‌های این تحقیق بود و یکی از تأثیرگذارترین اندام‌ها بر شبکه اندوپلاسمیک است، باید در تحقیقات آتی تغییرات میتوکندری را با دقت ارزیابی کرد. نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که هر دو نوع تمرین تناوبی و تداومی باعث مقاوم شدن پروتئین‌های شبکه اندوپلاسمیک در شرایط دیابتی می‌شود، که می‌توان عنوان کرد که اجرای تمرینات تناوبی و تداومی با شدت‌های مختلف بر مرگ آپوپتوتیک تأثیر مثبتی داشته و از مرگ سلولی جلوگیری می‌کند، اما دیابت باعث تسریع مرگ سلولی در پروتئین‌های حساس شبکه اندوپلاسمیک می‌شود. با این حال با توجه به اهمیت تعیین نوع تمرین، شدت و مدت زمان تمرین در افراد دیابتی پیشنهاد می‌شود تحقیقات بیشتری در این رابطه انجام پذیرد.

سپاسگزاری

از مساعدت و همکاری صمیمانه مسئولین آزمایشگاه مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی تبریز و تمام افرادی که موجب انجام این پژوهش

شدند، تقدیر و تشکر می گردد. پژوهش حاضر نتیجه پایان نامه دکتری رشته فیزیولوژی ورزشی گرایش قلب، عروق و تنفس می باشد.
کد/خلاق: IAU.SARI.REC.1397.8

References

1. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes 1995–2025 prevalence numerical estimates and projections. *Diabetes Care* 1998;21:1414-31. doi:10.2337/diacare.21.9.1414
2. Kendal B, Wallace VA, Olivera PJ. Mitochondrial determinants of doxorubicin induced cardiomyopathy. *Am Heart Asso*2020;12:926-42. doi:10.1161/CIRCRESAHA.119.31468.
3. Rubler S, Dlugash J, Yuceoglu YZ, Kumral T, Branwood AW, Grishman A. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *Am J Cardiol*1972; 30:595-602. doi:10.1016/0002-9149(72)90595-4
4. Jin LI, Deli ZH, Bianca JJM, Wiersma M. Imbalance of ER and mitochondria interactions prelude to cardiac ageing and disease? *Cells*2019; 8:1217-32. doi:10.3390/cells8121617
5. Huvaling Li, Bei LV, Ling K, Jing Zh, Ming Zh, Lijuang H, et al. Nova1 mediates resistance of Rat pheochromocytoma cells to hypoxia induced apoptosis via the Bax/Bcl-2/caspase-3 pathway. *Int J Moler Med*2017; 40:1125-33. doi: 10.3892/ijmm.2017.3089
6. Gill C, Mestral R, Samali A. Losing heart the role of apoptosis in heart disease a novel therapeutic target? *FASEB J* 2002;16:135-46. doi:10.1096/fj.01-0629com
7. Kanda T, Matsuoka S, Yamazaki M, Shibato T, Nieri K, Takahashi H, et al. Apoptosis and non-alcoholic fatty liver diseases. *World J Gastroenterol*2018; 24:2661-71. doi:10.3748/wjg.v24.i25.2661
8. Health UDO, Services H. Physical activity guidelines advisory committee final report. *Washington Dep Health Hum Serv* 2008; 2:213-9. doi:10.1249/MSS.0000000000001945.
9. Nabilpour M, Mayhew J. Effect of peripheral heart action on body composition and blood pressure in women with high blood pressure. *Int J Sport Stud Health*2018;1:123-8. doi:10.5812/intjssh.81874.
10. Yingmei Zh, Adam T, Walley C, James RS, Jun R. Autophagy as an emerging target in cardiorenal metabolic disease from pathophysiology to management. *Pharmacol Therap* 2019; 191:1-22. doi:10.1016/j.pharmthera.2018.06.004.
11. Wisloff U, Helgerud J, Kemi OJ, Ellingsen O. Intensity controlled treadmill running in Rats Vo2max and cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Cir Physiol*2001;280:1301-10. doi:10.1152/ajpheart.2001.280.3.H1301.
12. Kazemi A, Eslami R, Karimqasemi L. [The effect of high-intensity interval training on tumor necrosis factor-alpha levels in visceral and subcutaneous adipose tissue and insulin resistance in male Rats]. *Sport Physiol Res Sport Sci* 2017;8:17-30. (Persian) doi:10.22059/JSB.2018.247817.1227.
13. Sophia M, Raefsky MP, Matson. Adaptive responses of neuronal mitochondria to bioenergetic challenges roles in neuroplasticity and disease resistance. *Expe Clin Endocrinol Diabete*2017; 102:203-16. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.045
14. Lu K, Wang L, Wang C, Yang Y, Hu D, Ding R. Effects of high intensity interval versus continuous moderate intensity aerobic exercise on apoptosis oxidative stress and metabolism of the infarcted myocardium in a Rat model. *Mole Med Rep*2015;12:2374-82. doi: 10.3892/mmr.2015.3669.
15. Teixeira de Lemos E, Pinto R, Oliveira J, Garrido P, Sereno J, Mascarenhas F, et al. Differential effects of acute extenuating and chronic training exercise on inflammation and oxidative stress status in an animal model of type 2 diabetes mellitus. *Med Inflam*2011; 5:69-82. doi:10.1155/2011/253061.

- 16.Sasidharan SR, Joseph JA, Anandakumar S, Venkatesan V, Madhavan A, Nair C, et al. An experimental approach for selecting appropriate rodent diets for research studies on metabolic disorders. *Biomed Res Int* 2013;2: 25-35. doi.10.1155/2013/752870.
- 17.Asgari HD, Riyahi MS, Babaei S. [Effect of eight weeks high intensity interval training and medium intensity interval training and aloe vera intake on serum vaspin and insulin resistance in diabetic male Rats]. *J Arak Uni Med Sci* 2018; 20: 67-75. (Persian) doi.79490421/259865.
- 18.Fiordaliso F, Li B, Latini R, Sonnenblick EH, Anversa P, Leri A, et al. Myocyte death in streptozotocin-induced diabetes in Rats is angiotensin II-dependent. *Lab Invest* 2000;80:513-22. doi.0023-6837/00/8004-51303.00/0.
- 19.Wencker D, Chandra M, Nguyen K, Miao W, Garantzios S, Factor SM, et al. A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *J Clin Invest* 2003;111:1497-504. doi.10.1172/JCI17664.
- 20.Cao JY, Wang H. Role of Fas fasL in insulinitis in nonobese diabetic mouse. *Chinese Med J* 2004;117:615-27. doi.10.1097/00006676-199803000-00008.
- 21.Aboutaleb N, Shamsaei N, Khaksari M, Erfani S, Rajabi H, Nikbakht F. Pre ischemic exercise reduces apoptosis in hippocampal CA3 cells after cerebral ischemia by modulation of the Bax/Bcl-2 proteins ratio and prevention of caspase-3 activation. *J Physiol Sci* 2015;65:435-443. doi.10.1007/s12576-015-0382-7.
- 22.Mohammadi M, Salehi I, Farajnia S. [Effect of swimming exercise on oxidative stress in hippocampus of diabetic male Rats]. *Med J Tabriz Uni Med Sci Health Serv* 2008;30:111-8. (Persian) doi.10.1179/1351000214Y.0000000116.
- 23.Derouich M, Boutayeb A. The effect of physical exercise on the dynamics of glucose and insulin. *J Biomech* 2002;35:911-7. doi.10.1016/s0021-9290(02)00055-6.
- 24.Lee S, Tjonna A, Rognmo O, Stolen T, Bye A, Haram P. Aerobic interval training versus continuous moderate exercise as a treatment for the metabolic syndrome. *Circulation* 2008;118:346-54. doi.10.1016/j.ahj.2009.10.003.
- 25.Ramos JS, Dalleck LC, Tjonna AE, Beetham KS, Coombes JS. The impact of high intensity interval training versus moderate intensity continuous training on vascular function a systematic review and meta analysis. *Sport Med* 2015;45:679-92. doi.10.1007/s40279-015-0321-z.
- 26.Little JP, Gillen JB, Percival M, Safdar A, Tarnopolsky MA, Punthakee Z, et al. Low volume high intensity interval training reduces hyperglycemia and increases muscle mitochondrial capacity in patients with type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Cir Physiol* 2011;111:15654-60. doi.10.1152/jappphysiol.00921.2011.
- 27.Gomezmerino D, Drogou C, Guezennec C, Chennaoui M. Effects of chronic exercise on cytokine production in white adipose tissue and skeletal muscle of Rats. *Cytokine* 2007;40:23-9. doi.10.1016/j.cyto.2007.07.188.
- 28.Rodahl K, Astrand PO, Dahl HA, Stromme SB. Physiological bases of exercise. *Hum Kin* 2003;7:142-52.



Effect of Continuous and Interval Exercise on the Necroptosis and Apoptosis of Endoplasmic Reticulum Proteins in the Heart of Diabetic Wistar Rats

Jahaniansaroudi M¹, Matinhomae H^{2*}, Farzangi P³

(Received: March 1, 2020)

Accepted: September 7, 2020)

Abstract

Introduction: Diabetes is the most prevalent endocrine disease. Apoptosis and necroptosis play a major role in the development of diabetes-related heart diseases; however, the effects of continuous and interval exercise on apoptosis and necroptosis of the heart cells in diabetics are unclear. This study aimed to investigate the effect of different intensities of aerobic exercise on apoptosis and necroptosis of the cardiac tissue of diabetic mice.

Materials & Methods: In total, 32 mature, male, and white Wistar rats (mean age of 12 ± 2 weeks and weight of 175 ± 15 g) were randomly divided into four groups of eight animals per group. The groups included a healthy control (C), diabetic control (D), diabetic with moderate-intensity continuous training (55 min with 26 m/min speed daily) (D+MICT), and diabetic with high-intensity interval training at the 85-90% of maximum speed (D+HIIT) (5 days/week for 8 weeks). Before the training protocol, the running speed was calculated to obtain the maximum oxygen consumption. Western blot analysis was utilized to evaluate the changes in the expression of the proteins associated with apoptosis and

necroptotic death path in the diabetic heart muscle myocardium. Furthermore, the one-way analysis of variance was used to determine the differences among the study groups. A p-value less than 0.05 was considered statistically significant. *Ethics code:* IAU.SARI.REC.1397.8

Findings: The results indicated that type 2 Diabetes Mellitus significantly increased both apoptotic and necroptotic cell death ($P=0.001$). However, both continuous and interval training moderated the apoptotic cell death ($P \leq 0.05$). Nonetheless, the effect of interval training was higher than that of the continuous one. It is worth mentioning that only interval training had a significant effect on reducing the necroptosis ($P \leq 0.05$).

Discussions & Conclusions: It seems that continuous and interval exercise affects apoptotic death; however, intense interval exercise is more effective in necroptotic death.

Keywords: Aerobic exercise, Apoptosis, Endoplasmic reticulum, Necroptosis, Type 2 diabetes mellitus

1. Dept of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Dept of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3. Dept of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

*Corresponding author Email: mail:hassan.mhomaie@gmail.com