

# تأثیر تمرین تناوبی شدید بر بیان ژنی پروتئین متصل به رتینول ۴ و پروتئین کیناز فعال شده با AMP در عضله اسکلتی رت های نر مبتلا به دیابت نوع دو

فریبا آقایی<sup>۱\*</sup>، مهسا محسن زاده<sup>۱</sup>، فرح نامنی<sup>۲</sup>، فواد فیض‌اللهی<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران، <sup>۲</sup> گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد ورامین، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۷/۴/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۴

## چکیده:

**زمینه و هدف:** تأثیرهای مثبت تمرین تناوبی شدید (HIIT) بر تقویت مسیرهای متابولیسم بافت عضلانی سالم به اثبات رسیده است. از جمله هدف‌های دیابت تخریب متابولیسم گلوکز و چربی عضله می‌باشد، لذا هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر ۸ هفته تمرین تناوبی شدید بر تعدیل بیان ژنی پروتئین متصل به رتینول ۴ (RBP4) و پروتئین کیناز فعال شده با AMP (AMPK) در عضله نعلی رت‌ها می‌باشد.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی، ۶۰ رت نر نژاد ویستار با میانگین سنی ۸ هفته، وزن  $250 \pm 20$  گرم به طور تصادفی در ۵ گروه (تعداد=۱۲)؛ پایه، کنترل سالم، دیابت، تمرین HIIT، گروه دیابت و تمرین، تقسیم شدند. قبل از شروع برنامه تمرینی، تمامی گروه‌ها به غیر از گروه‌های پایه و کنترل سالم و تمرین به وسیله تزریق نیکوتین آمید-استرپتوزوتوسین (STZ) با تزریق صفاقی دیابتی شدند. رت‌های گروه‌های تمرینی به مدت ۸ هفته، ۵ روز در هفته با شدت ۸۰ تا ۸۵ درصد حداکثر سرعت به تمرین‌های HIIT پرداختند. ۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرین، پس از بیهوشی رت‌ها با محلول زایلازین و کتامین، عضله نعلی خارج و میزان mRNA AMPK و mRNA RBP4 سنجیده شد. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون‌های آماری آنالیز واریانس و تست تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** القای دیابت سبب افزایش معنی‌دار در میزان mRNA RBP4 شد. در حالی که کاهش این ژن در گروه دیابت و تمرین نسبت به گروه دیابت معنی‌دار بود ( $p=0/003$ ). انجام تمرین ورزشی HIIT به صورت قابل توجهی میزان mRNA AMPK را نسبت به گروه دیابت و کنترل سالم افزایش داد ( $p=0/001$ ). همچنین افزایش این ژن در گروه دیابت و تمرین نسبت به گروه دیابت معنی‌دار بود ( $p=0/002$ ).

**نتیجه‌گیری:** نتایج پژوهش حاضر نشان داد که استفاده از تمرین HIIT قادر به مقابله با اثرات تخریبی دیابت با افزایش فاکتور کلیدی متابولیسم سلول عضلانی AMPK (تحریک افزایش انتقال GLUT) و کاهش RBP می‌باشد که می‌تواند در بهبود مقاومت به انسولین سلول عضلانی مؤثر باشد.

**واژه‌های کلیدی:** تمرین تناوبی شدید، پروتئین متصل به رتینول ۴ (RBP4)، پروتئین کیناز فعال شده با AMP (AMPK)، دیابت

\* نویسنده مسول: فریبا آقایی، کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی

Email: fariba.aghaei@kiau.ac.ir

## مقدمه

امروزه چاقی یکی از ریسک فاکتورهای مرتبط با سلامت عمومی در جهان به شمار می‌رود (۱). بر اساس آمار سازمان جهانی بهداشت (WHO) در سال ۲۰۰۵، ۱/۱ میلیارد بزرگسال در جهان اضافه وزن داشتند که از نظر بالینی حداقل ۳۱۲ میلیون نفر آنها چاق محسوب می‌شوند. به دلیل سبک زندگی غیرفعال و رژیم غذایی نامناسب در کشورهای توسعه یافته و نیز کشورهای در حال توسعه، روند رو به رشد چاقی همچنان ادامه دارد (۲). افزایش وزن و درصد چربی بدن رابطه مستقیم با افزایش مقاومت به انسولین دارد (۳)، وجود این دو عامل درصد ابتلا به دیابت نوع دو را افزایش می‌دهد (۴)، به گونه‌ای که تخمین زده می‌شود ۸۰ درصد افراد مبتلا به دیابت نوع دو قبل از بیماری، اضافه وزن داشته یا چاق و یا بی تحرک بوده‌اند. یکی از دلایل اصلی بروز دیابت نوع دو، اختلال در عمل انسولین در بافت‌های چربی، عضلات و کبد، یعنی بافت‌های اصلی مصرف کننده گلوکز می‌باشد (۵). زمانی که ترشح انسولین نتواند برداشت گلوکز در این بافت‌ها را تضمین کند، مقاومت به انسولین و به دنبال آن هایپرگلیسمی اتفاق می‌افتد (۶). عوامل زیادی در القای مقاومت به انسولین نقش دارند که از جمله این عوامل می‌توان به برخی از آدیپوکاین‌ها اشاره کرد (۷).

به طور مشخص بافت چربی علاوه بر تنظیم متابولیسم بدن، یک عضو درون ریز فعال است که شمار زیادی مولکول‌های پیام رسان پپتیدی فعال با

عملکرد بیولوژیکی متنوع ترشح می‌کند (۸). تعداد زیادی از هورمون‌های مشتق از آدیپوسیت یا آدیپوکاین‌ها شامل؛ لپتین، آدیپونکتین، رزیستین و رتینول متصل به پروتئین ۴ (RBP4) شناسایی شده‌اند (۹). رتینول متصل به پروتئین ۴ به خانواده لیپوکالین‌ها و انتقال دهنده مولکول‌های کوچک آبرگیز رتینول (ویتامین A) در جریان خون تعلق دارد (۱۰). RBP4 ترکیبی با وزن مولکولی سبک است که به وسیله کبد و آدیپوسیت‌ها ترشح می‌شود (۱۱). به بیان دیگر جایگاه اصلی تولید این پروتئین کبد است با این حال بافت چربی با ۲۰ تا ۴۰ درصد مقدار تولیدی رتینول متصل به پروتئین ۴ در مقایسه با کبد جایگاه دوم تولید این پروتئین در بدن را دارا می‌باشد (۱۲). در مطالعاتی دیگر نیز بیان شده که آدیپوسیت‌ها و نه کبد نقش اصلی را در افزایش مقادیر سرمی این پروتئین دارند (۱۳). بیان ژنی RBP4 در آدیپوسیت‌ها با مقادیر پلاسمایی آن ارتباط دارد و افزایش مقادیر سرمی RBP4 با چاقی، مقاومت به انسولین و دیابت نوع دو ارتباط دارد (۱۴). بیان شده که غلظت سرمی RBP4 در مدل‌های گوناگون رت‌های دیابتی یا نمونه انسانی مبتلا به دیابت نوع دو و در شرایط مقاومت به انسولین افزایش می‌یابد (۱۵). مکانیسم‌های متنوعی در رابطه با تأثیرهای RBP4 در القای مقاومت به انسولین و دیابت نوع دو ذکر شده است. نشان داده شده که RBP4 سرمی در القای مقاومت به انسولین به وسیله تحریک بیان آنزیم‌های گلوکونوزونیک در کبد و اختلال سیگنالینگ انسولین

دیابت نوع ۲، سبب تغییرات معنی‌داری در غلظت سرمی RBP4 می‌شود که این تغییرات به طور معنی‌داری در گروه تمرین مقاومتی بیشتر از گروه تمرین هوازی بود (۲۰). با وجود این که پیشنهاد شده است افت غلظت RBP4 پلاسمایی (که سبب بهبود حساسیت انسولینی بافتی می‌شود) در تمرین مقاومتی بیشتر از تمرین هوازی است، تغییرات RBP4 در تمرین‌های HIIT نیز مشابه تمرین‌های مقاومتی می‌باشد (۲۲).

همان طور که بیان شد RBP4 سبب آبنرمالیتی متابولیکی می‌شود و مسیرهای متابولیکی مرتبط با متابولیسم گلوکز را تخریب می‌کند (۲۳)، اما در مقابل RBP4، AMPK قرار دارد که مسیرهای اصلی و بالادست مرتبط با متابولیسم گلوکز را تحت تأثیر قرار می‌دهد و بر فاکتورهای PI3K و GLUT4 مؤثر می‌باشد. به بیان دیگر AMPK آنزیمی است که به عنوان یک سوخت سنج عمل می‌کند. تحریک فسفوریلاسیون پروتئین کیناز فعال شده با AMP (AMPK) منجر به افزایش جابه‌جایی انتقال دهنده گلوکز ۴ (GLUT4) در غشای پلاسمایی می‌شود که منجر به بهبود مصرف گلوکز در عضله اسکلتی می‌گردد (۲۴). بیان شده که در عضله اسکلتی نمونه‌های دیابتی، سیگنالینگ مسیر AMPK که در عملکرد متابولیکی و مصرف گلوکز درگیر است، کاهش می‌یابد (۲۵). فعال‌سازی AMPK حساسیت انسولینی و هموستاز گلوکز را در بافت عضلانی بهبود می‌بخشد و افزایش آن برای مقابله با تخریب‌های ناشی از بیماری دیابت نوع دوم مؤثر می‌باشد. تحقیقات مختلف نشان داده‌اند که فعالیت

در عضله سهیم می‌باشد (۱۶). در بافت عضلانی یک همبستگی منفی بین RBP4 و دسترسی به گلوکز و سطوح GLUT4 در افراد با سابقه دیابت وجود دارد. به بیان دیگر افزایش غلظت RBP4، فعالیت فسفوانیزوتید ۳ کیناز (PI3-kinase) را کاهش می‌دهد و متعاقب آن سوبسترای گیرنده انسولینی ۱ (IRS-1) را فسفوریله و بر روی نقل و انتقال GLUT4 نیز تأثیر می‌گذارد که از این طریق بر مسیر سیگنالینگ انسولین تأثیر گذاشته و مصرف گلوکز وابسته به انسولین را در بافت عضله کاهش می‌دهد (۱۷).

محققین پیشنهاد داده‌اند که کاهش و مهار RBP4 در کاهش آسیب‌های ناشی از دیابت می‌تواند تأثیر داشته باشد. به عنوان مثال، اخیراً در پژوهشی تأثیرهای مفید فنرتینید (یک مهار کننده RBP4) در درمان موش‌ها، با رژیم غذایی پرچرب مورد تأیید قرار گرفته است، به طوری که نتایج تحقیق فوق نشان داده که فنرتینید از ایجاد عدم تحمل گلوکز و مقاومت به انسولین در کبد و عضله پیشگیری می‌کند و تولید گلوکز در کبد و متابولیسم گلوکز در عضله را بهبود می‌بخشد (۱۸). از جمله راه‌های پیشگیری و درمان دیابت، افزایش تحرک و انجام فعالیت ورزشی می‌باشد (۱۹). مطالعات زیادی نشان داده‌اند که سطوح RBP4 با تمرین ورزشی افت می‌کند (۲۰). فیلیپس و کوبولد در مقاله مروری خود بیان کردند که تمرین‌های ورزشی با شدت بالاتر، تأثیرهای مثبت و زیادتری بر سطوح RBP-4 پلاسمایی دارد (۲۱). بیان شده که ۱۲ هفته تمرین هوازی و مقاومتی در افراد با

ورزشی قادر به بهبود مسیرهای پیام‌رسانی درگیر در متابولیسم گلوکز در شرایط دیابت می‌باشد. بیان شده که AMPK حساسیت انسولینی بعد از فعالیت ورزشی را بهبود می‌بخشد (۲۶). ریم کو و همکاران، در تحقیق خود نشان دادند که ۸ هفته فعالیت ورزشی هوازی سبب افزایش مسیر سیگنالینگ AMPK در بافت عضلانی رت‌های دیابتی شد که در بهبود حساسیت انسولینی نیز مؤثر بود (۲۷). بنابراین یکی از راه‌ها و هدف‌های درمانی بیماری دیابت افزایش AMPK برای افزایش مصرف گلوکز جریان خون می‌باشد، که تحت تأثیر تمرین‌های ورزشی به ویژه HIIT قرار می‌گیرد و می‌تواند به مقابله با تأثیرهای منفی RBP4 برخیزد. با وجود این، در رابطه با بررسی تغییرات این دو عامل با یکدیگر در پاتولوژی دیابت در کنار تمرین ورزشی با شدت بالا مطالعات اندکی وجود دارد، در نتیجه هدف از این پژوهش بررسی تأثیر تمرین تناوبی شدید بر بیان ژنی پروتئین متصل به رتینول ۴ و پروتئین کیناز فعال شده با AMP در عضله اسکلتی رت‌های نر مبتلا به دیابت نوع دو بود.

#### روش بررسی

پژوهش حاضر از نوع تجربی می‌باشد که به شیوه میدانی و آزمایشگاهی انجام شد. جامعه آماری این مطالعه تعداد ۶۰ راس رت‌های نر ویستار ۸ هفته‌ای (با میانگین وزنی  $20 \pm 250$  گرم) بودند که از انستیتو تحقیقاتی دانشگاه بقیه الله (عج) خریداری و به صورت تصادفی در پنج گروه ۱۲ تایی شامل؛ گروه

پایه، گروه کنترل سالم، گروه دیابت، گروه تمرین HIIT و گروه دیابتی و تمرین HIIT تقسیم شدند. رت‌های مذکور در آزمایشگاه پژوهش دانشگاه با درجه حرارت ۲۳ - ۲۰ درجه سانتی‌گراد، چرخه روشنایی تاریکی ۱۲ ساعته، رطوبت نسبی ۵۰ درصد و تعداد هر سه راس رت در یک قفس پرورشی با آب و غذای استاندارد نگهداری شدند.

در این تحقیق دستورالعمل کمیته اخلاق دانشگاه در رابطه با کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید و در تمامی مراحل سعی شد که کمترین رنج متوجه حیوان گردد. کد اخلاق پژوهش حاضر IR.BMSU.REC.1396.524 می‌باشد.

جهت القای دیابت نوع ۲ از تزریق نیکوتین آمید و استرپتوزوتوسین (STZ) استفاده گردید، ابتدا محلول نیکوتین آمید با دوز ۹۵ میلی‌گرم بر هر کیلوگرم وزن رت، به صورت صفاقی تزریق شد، پس از ۱۵ دقیقه، محلول تازه تهیه شده STZ در بافر سیترات ۰/۱ مولار (pH=۴/۵) به صورت داخل صفاقی با دوز ۵۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم تزریق شد (۱۶). یک هفته پس از تزریق استرپتوزوتوسین، قند خون ورید دم رت‌ها مورد سنجش قرار گرفت و رت‌هایی که قند خون آنها بالاتر از ۲۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بود، به عنوان رت‌های دیابتی وارد مطالعه شدند (۲۸).

پس از انتقال حیوانات به آزمایشگاه برای گروه تمرین و گروه دیابت و تمرین، ۲ هفته زمان جهت آشنایی و سازگاری به پروتکل تمرین در نظر گرفته شد. در طول این دو هفته رت‌ها با دویدن روی

دقیقه با سرعت 3000g سانتریفیوژ شد. محلول به دست آمده برای سنجش مقادیر mRNA RBP4 و mRNA AMPK استفاده شد.

برای تجزیه و تحلیل داده‌های نتایج qPCR از روش  $2^{-\Delta\Delta CT}$  - برای بررسی بیان کمی - نسبی ژن P53 به شرح زیر استفاده شد. تمام تجزیه و تحلیل‌ها به طور مجزا برای ۵ گروه نمونه انجام شد.

$$\text{Relative fold change in gene expression} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

$$\Delta CT = CT \text{ target gene} - CT \text{ reference gene}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ test sample} - \Delta CT \text{ Contro}$$

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری کولموگروف اسمیرنوف، آنالیز واریانس و تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند.

#### یافته‌ها

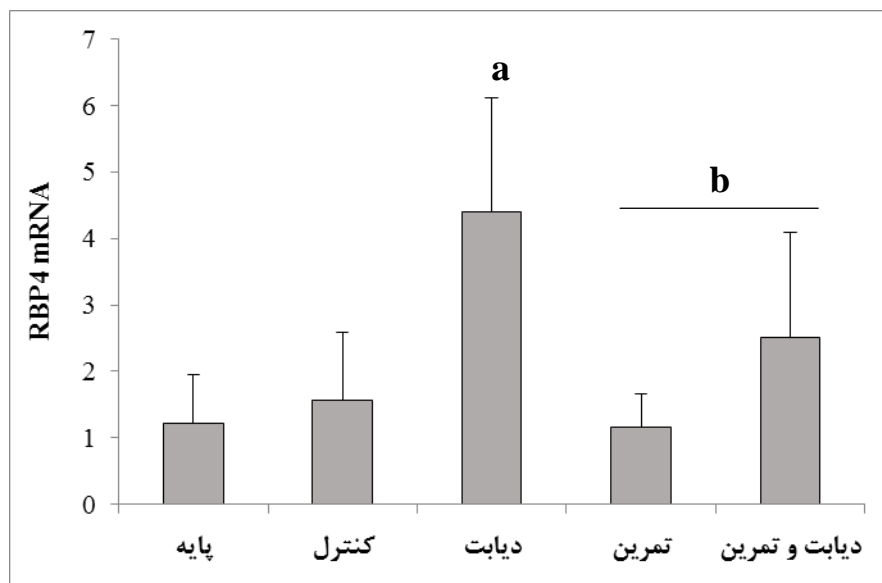
سطح mRNA RBP4 عضله نعلی در بین گروه‌های تحقیق تفاوت معنی‌داری داشت ( $p=0/0001$ ) و ( $F=15/23$ ). نتایج آزمون توکی نشان داد که سطوح mRNA RBP4 عضله نعلی در گروه دیابت نسبت به گروه‌های پایه و کنترل افزایش معنی‌داری داشت ( $p=0001$ ). همچنین کاهش mRNA RBP4 در گروه تمرین (تمرین HIIT) و دیابت تمرین نسبت به گروه دیابت معنی‌دار بود (به ترتیب:  $p=0001$  و  $p=0/003$ ). سطح mRNA RBP4 عضله نعلی در بین گروه‌های مختلف در نمودار ۱ ارائه شده است.

تردمیل با سرعت ۸ متر در دقیقه، ۳ روز در هفته آشنا شدند. روز قبل از تمرین HIIT پایلوت پروتکل بر روی چهار رت جهت برآورد  $VO_{2max}$  مناسب پروتکل تمرین انجام شد. همچنین ۴ سر رت به عنوان گروه پایلوت برای اندازه‌گیری حداکثر سرعت دویدن روی نوارگردان انتخاب شدند. برای برآورد حداکثر سرعت دویدن، آزمون عملکرد ورزشی مدرج را با شیب صفر درجه اجرا کردند که با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه آغاز و سرعت تردمیل به ازای هر دقیقه، ۱ متر بر دقیقه افزوده می‌شد تا رت‌ها قادر به دویدن نباشند (واماندگی). پس از برآورد حداکثر سرعت، گروه تمرینی HIIT، ۵ جلسه در هفته و به مدت ۸ هفته به فعالیت بر روی نوار گردان پرداختند. پروتکل HIIT اجرای دفعات تمرینی با شدت ۸۰ تا ۸۵ درصد حداکثر سرعت به مدت ۲ دقیقه با دوره‌های استراحتی فعال ۱ دقیقه ای بود که از ۶ مرتبه تمرینی در هفته اول به ۱۴ مرتبه تمرینی در هفته آخر رسید (۲۹).

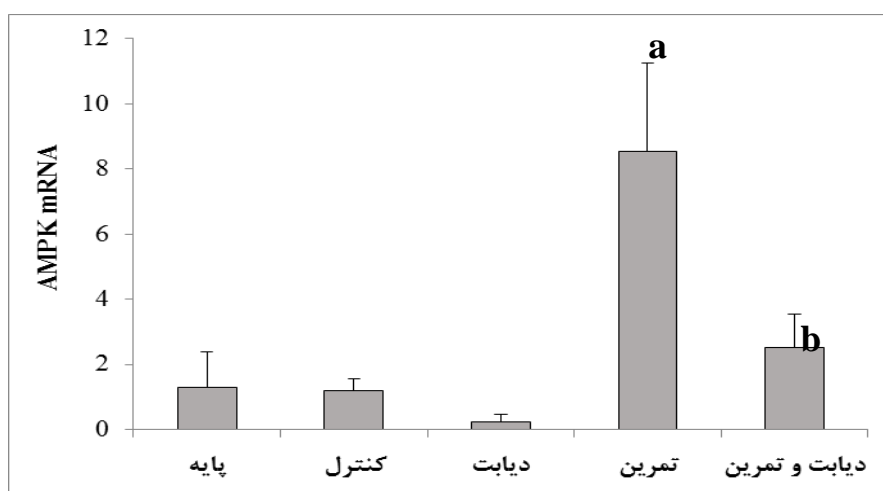
۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی رت‌ها تمامی گروه‌ها با استفاده از محلول کتامین - زایلازین، با تزریق ۳ واحد محلول کتامین (۵۰ - ۳۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) و زایلازین (۵ - ۳ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) بی‌هوش و بافت عضله آن‌ها خارج شد. مقادیر mRNA AMPK و mRNA RBP4 در بافت عضله نعلی با استفاده از روش تخلیص RNA مورد ارزیابی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای این منظور، ابتدا عضله نعلی در محلول بافر هموژنیزه و به مدت ۱۵

داشتند ( $p=0/0001$ ). گروه دیابت و تمرین (HIIT) نیز سطح mRNA AMPK را نسبت به گروه دیابت افزایش داد که این افزایش معنی دار بود ( $p=0/002$ ). سطح mRNA AMPK عضله نعلی در بین گروه‌های مختلف در نمودار ۲ ارایه شده است.

سطح mRNA AMPK عضله نعلی در بین گروه‌های تحقیق تفاوت معنی داری داشت ( $p=0/0001$ ) و نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد که سطوح mRNA AMPK عضله نعلی در گروه تمرین (HIIT) افزایش معنی داری نسبت به تمام گروه‌های پژوهش



نمودار ۱: تغییرات سطوح mRNA RBP4 بین گروه‌های مختلف تحقیق. a: نشانه معنی داری نسبت به گروه پایه و گروه کنترل، b: نشانه معنی داری نسبت به گروه دیابت ( $p<0/05$ )



نمودار ۲: تغییرات سطوح mRNA AMPK بین گروه‌های مختلف تحقیق. a: نشانه معنی داری نسبت به گروه های پایه، کنترل و دیابت. b: نشانه معنی داری نسبت به گروه دیابت ( $p<0/05$ )

## بحث

یکی از دلایل اصلی بروز دیابت نوع دو، اختلال در عمل انسولین در بافت‌های چربی، عضلات و کبد، یعنی بافت‌های اصلی مصرف‌کننده گلوکز می‌باشند (۵). بیان ژنی RBP4 در آدیپوسیت‌ها با مقادیر پلاسمایی آن ارتباط دارد و افزایش مقادیر سرمی RBP4 با چاقی، مقاومت به انسولین و دیابت نوع دو ارتباط دارد (۱۴)، به طوری که غلظت سرمی RBP4 در مدل‌های گوناگون رت‌های دیابتی یا نمونه انسانی مبتلا به دیابت نوع دو و در شرایط مقاومت به انسولین افزایش می‌یابد (۱۵). محققین پیشنهاد داده‌اند که کاهش و مهار RBP4 در کاهش آسیب‌های ناشی از دیابت می‌تواند تأثیر داشته باشد، اما در مقابل RBP4، AMPK قرار دارد. به طور کلی فعال‌سازی AMPK حساسیت انسولینی و هموستاز گلوکز را در بافت عضلانی بهبود می‌بخشد و افزایش آن برای مقابله با تخریب‌های ناشی از بیماری دیابت نوع دو مؤثر می‌باشد. تحقیقات مختلف نشان داده‌اند که فعالیت ورزشی قادر به بهبود مسیرهای پیام‌رسانی درگیر در متابولیسم گلوکز در شرایط دیابت می‌باشد (۲۶). از این‌رو هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر تمرین تناوبی شدید بر بیان ژنی پروتئین متصل به رتینول ۴ و پروتئین کیناز فعال شده با AMP در عضله اسکلتی رت‌های نر مبتلا به دیابت نوع دو بود.

در پژوهش حاضر، افزایش mRNA RBP4 در گروه دیابت و کاهش این آدیپوکاین در گروه تمرین ورزشی نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (نمودار ۱).

نتایج پژوهش حاضر با تحقیق فیلیپس و کوبولس، منصوری و همکاران و کوانبونجان و همکاران هم‌سو بود (۳۰ و ۲۱، ۱۴). از جمله آسیب‌های دیابت تخریب هموستاز گلوکز با تخریب گیرنده‌های انسولینی در سطح سلول‌های عضلانی می‌باشد که میزان نقل و انتقال گلوکز در سلول را به شدت کاهش می‌دهد (۳۱). پروتئین RBP4 از بافت چربی ترشح شده و با عملکردهایی در بدن نظیر انتقال رتینول، فیبروز و همچنین مقاومت به انسولین همراه است و با سرکوب محیطی GLUT4 موجب افزایش مقاومت به انسولین می‌شود. بنابراین افزایش mRNA RBP4 در گروه دیابت پژوهش حاضر کاملاً قابل توجیه می‌باشد. مطالعات بالینی انجام گرفته نشان می‌دهد که افراد چاق مبتلا به دیابت نوع دو، سطوح بالاتر RBP4 را در گردش خون خود دارا می‌باشند (۳۲). انجام تمرین‌های هوازی سهم عمده‌ای در کاهش عوارض دیابت دارند (۳۳) که کاهش mRNA RBP4 گروه تمرین ورزشی HIIT پژوهش حاضر نیز از این قاعده مستثنی نیست، زیرا که، آزمودنی‌های گروه دیابتی که تمرین ورزشی تناوبی (HIIT) انجام می‌دادند مقادیر mRNA RBP4 آنها نسبت به گروه دیابت کاهش معنی‌دار نشان داد. هم‌سو با نتایج پژوهش حاضر کوی و همکاران در پژوهش خود نشان دادند که فعالیت ورزشی قادر به کاهش غلظت mRNA RBP4 و بهبود حساسیت به انسولین در نمونه‌های حیوانی می‌باشد (۳۴). با افزایش فعالیت ورزشی، انقباض بافت عضلانی افزایش و میزان انرژی مصرفی و متابولیسم پایه نیز بالا

می‌رود. از جمله بافت‌های هدف برای تامین انرژی قند جریان خون، گلیکوژن عضلانی و بافت آدیپوز می‌باشد. در شرایط پاتولوژی نظیر دیابت میزان قند جریان خون افزایش یافته و بافت عضلانی برای مصرف قند با مشکل مواجه خواهد شد. بیان شده است که فعالیت ورزشی و انقباض عضلانی در شرایط دیابت قادر به کنترل سطوح قند جریان خون و کاهش ریسک فاکتورهای ترشحی از بافت چربی نظیر RBP4، برای مقابله با آسیب‌های پاتولوژی دیابت می‌باشد که مسیرهای سیگنالینگ انرژی را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد (۳۵). هم‌سو با نتایج پژوهش حاضر سوری و همکاران به بررسی تأثیر تمرین ورزشی بر سطوح RBP4 در نمونه‌های انسانی با دیابت نوع دو پرداخته و بیان کردند که در گروه‌های تمرین ورزشی قدرتی میزان RBP4 کاهش معنی‌دار نشان داده در صورتی که ۱۰ هفته تمرین هوازی کاهش غیرمعنی‌داری در این آدیپوکاین ایجاد کرده است. این محققین کاهش معنی‌دار RBP4 گروه تمرین قدرتی خود را به افزایش بیشتر توده عضلانی نسبت دادند که در بهبود مقاومت به انسولین مؤثرتر از تمرین‌های هوازی عمل کرده است و بنابراین RBP4 را بیشتر تحت تأثیر قرار داده است (۳۶) این در حالی است که در پژوهش حاضر میزان توده عضلانی بررسی نشد و در پژوهش حاضر از تمرین‌های تناوبی استفاده شد که در گروه دیابتی کاهش معنی‌داری در میزان mRNA RBP4 ایجاد کرد. تمرین‌های تناوبی تغییرات گسترده‌تری در کاهش چربی بدن ایجاد می‌کند (۳۷) در نتیجه

از طریق مصرف بیشتر این منبع انرژی، بهتر روی میزان mRNA RBP4 مؤثر می‌باشد. در سایر مطالعات، بیان شده است که میزان سرمی RBP4 با مقاومت به انسولین و دیابت نوع دوم مرتبط می‌باشد (۳۸) برخی مطالعات، تأثیر مقاومت به انسولین RBP4 را به کاهش فسفریلاسیون PI3k نسبت داده‌اند (۳۹). فعالیت ورزشی برای جبران اثرات تخریبی ناشی از دیابت قادر به افزایش GLUT4 (۴۰) و افزایش PI3K (۴۱) می‌باشد که احتمالاً از این طریق در کاهش RBP4 و تأثیرات آن مؤثر بوده است.

بیان شده است که فعالیت ورزشی، تأثیرات مفیدی بر سلامت متابولیکی و کاهش ریسک فاکتورهای بیماری‌های مختلف به ویژه دیابت نوع دوم دارد (۴۲). تمرین ورزشی از جمله استرس‌های متابولیکی است که سبب افزایش نسبت AMP به ATP سلولی می‌شود و بنابراین در فعال کردن AMPK مؤثر می‌باشد (۴۲). در پژوهش حاضر نیز افزایش شدید در mRNA AMPK گروه تمرین ورزشی نسبت به سایر گروه‌ها مشاهده شد (نمودار ۲). مطالعات در دو دهه گذشته نشان دادند که AMPK در نمونه انسانی (۴۳) و حیوانی (۴۴) به وسیله انقباض عضلانی تحریک می‌شود. ترن اوور ATP در عضلات اسکلتی در طول فعالیت ورزشی به ۱۰۰ برابر می‌رسد که سبب افزایش AMP و ADP می‌شود (۴۵). تمامی این عوامل که در شارژ انرژی سلول دخیل هستند در افزایش AMPK نقش دارند. در دیابت نیز کاهش میزان ورود قند به سلول سبب کاهش شارژ انرژی سلول می‌شود و در



نتیجه افزایش AMPK در گروه دیابت و تمرین HIIT نسبت به گروه دیابت نیز قابل توجیه می‌باشد. در گروه دیابت نیز میزان mRNA AMPK کاهش نشان داد که این کاهش نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نبود. سربلون (CRBN) که در بیماری دیابت افزایش می‌یابد به عنوان یکی از تنظیم‌کننده‌های منفی AMPK می‌باشد (۴۶) با وجود این میزان CRBN در پژوهش حاضر مورد اندازه‌گیری قرار نگرفت. از جمله دلایل افزایش mRNA AMPK در گروه دیابت و تمرین را می‌توان به تأثیرات تمرین HIIT به افزایش لیپولیز چربی نیز نسبت داد (۴۷) زیرا که AMPK در متابولیسم چربی نیز درگیر می‌باشد که تحت تأثیر تمرین HIIT قرار می‌گیرد.

از جمله محدودیت‌های این تحقیق این بود که به خاطر نرخ مرگ و میر بالا در استفاده از STZ و دیابتی شدن، پروتکل تمرینی فقط ۸ هفته به طول انجامید. علاوه بر این، تحقیق حاضر نمی‌تواند مکانیسم افزایش AMPK را شناسایی و معرفی کند و با توجه به اثر تمرین ورزشی HIIT بر روی AMPK باید به دنبال مکانیسم‌هایی دیگر در فعال‌سازی این پروتئین بود. بنابراین پیشنهاد می‌شود که سایر فعال‌کننده‌های AMPK و مسیرهای سیگنالینگ بالادست نظیر PGC-1 $\alpha$  و GLUT4 نیز در این مسیر مورد بررسی قرار گیرند و علاوه بر بافت عضله، بافت آدیپوز و کبد نیز که یکی از فعال‌ترین بافت‌ها حین فعالیت ورزشی است مورد بررسی قرار گیرد.

### نتیجه‌گیری

در مجموع می‌توان بیان کرد که استفاده از تمرین‌های HIIT در بهبود مارکرهای کلیدی سیگنالینگ بافت چربی و عضلانی با پاتولوژی دیابت نوع دوم می‌تواند مؤثر واقع شود. با وجود این بررسی دقیق این مسیرهای سیگنالی در نمونه دیابتی با HIIT نیاز به مطالعات بیشتر دارد.

### تقدیر و تشکر

از اعضاء محترم گروه فیزیولوژی ورزش دانشگاه بقیه الله (عج) که در انجام این پروژه ما را یاری رساندند، کمال تشکر و قدردانی رو داریم.

**REFERENCES**

1. Chaput J-P. Screen time associated with adolescent obesity and obesity risk factors. *The Journal of Pediatrics* 2017; 186: 209-12.
2. Hales CM, Carroll MD, Fryar CD, Ogden CL. Prevalence of obesity among adults and youth: United States, 2015-2016: US Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention: National Center for Health Statistics; 2017.
3. Caprio S, Perry R, Kursawe R. Adolescent obesity and insulin resistance: roles of ectopic fat accumulation and adipose inflammation. *Gastroenterology* 2017; 152(7): 1638-46.
4. Jayanthi R, Srinivasan AR, Hanifah M, Maran AL. Associations among Insulin resistance, triacylglycerol/high density lipoprotein (TAG/HDL ratio) and thyroid hormone levels—a study on type 2 diabetes mellitus in obese and overweight subjects. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 2017; 11: S121-S6.
5. Roden M, Petersen K, Shulman G. Insulin resistance in type 2 diabetes. *Textbook of Diabetes* 2017: 174-86.
6. Umegaki H, Makino T, Uemura K, Shimada H, Hayashi T, Cheng XW, et al. The associations among insulin resistance, hyperglycemia, physical performance, diabetes mellitus, and cognitive function in relatively healthy older adults with subtle cognitive dysfunction. *Frontiers in Aging Neuroscience* 2017; 9: 72.
7. Kang YE, Kim JM, Joung KH, Lee JH, You BR, Choi MJ, et al. The roles of adipokines, proinflammatory cytokines, and adipose tissue macrophages in obesity-associated insulin resistance in modest obesity and early metabolic dysfunction. *PloS One* 2016; 11(4): e0154003.
8. Tsiotra PC, Halvatsiotis P, Patsouras K, Maratou E, Salamalekis G, Raptis SA, et al. Circulating adipokines and mRNA expression in adipose tissue and the placenta in women with gestational diabetes mellitus. *Peptides* 2018; 101: 157-66.
9. Moraes-Vieira PM, Yore MM, Dwyer PM, Syed I, Aryal P, Kahn BB. RBP4 activates antigen-presenting cells, leading to adipose tissue inflammation and systemic insulin resistance. *Cell Metabolism* 2014; 19(3): 512-26.
10. Zabetian-Targhi F, Mahmoudi MJ, Rezaei N, Mahmoudi M. Retinol binding protein 4 in relation to diet, inflammation, immunity, and cardiovascular diseases. *Advances in Nutrition* 2015; 6(6): 748-62.
11. Berry DC, Noy N. Retinol binding protein 4: role in diabetes and cancer. *Adipocytokines, Energy Balance, and Cancer*: Springer; 2017; 89-107.
12. Lee SA, Yuen JJ, Jiang H, Kahn BB, Blaner WS. Adipocyte-specific overexpression of retinol-binding protein 4 causes hepatic steatosis in mice. *Hepatology* 2016; 64(5): 1534-46.
13. Perduca M, Nicolis S, Mannucci B, Galliano M, Monaco HL. Human plasma retinol-binding protein (RBP4) is also a fatty acid-binding protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 2018; 1863(4): 458-66.
14. Kwanbunjan K, Panprathip P, Phosat C, Chumpathat N, Wechjakwen N, Puduang S, et al. Association of retinol binding protein 4 and transthyretin with triglyceride levels and insulin resistance in rural thais with high type 2 diabetes risk. *BMC Endocrine Disorders* 2018; 18(1): 26.
15. Tabesh M, Noroozi A, Amini M, Feizi A, Saraf-Bank S, Zare M. Association of retinol-binding protein 4 with metabolic syndrome in first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences* 2017; 22: 28.
16. de Oliveira Leal V, Mafra D. Adipokines in obesity. *Clinica Chimica Acta* 2013; 419: 87-94.
17. Ost A, Danielsson A, Lidén M, Eriksson U, Nystrom FH, Stralfors P. Retinol-binding protein-4 attenuates insulin-induced phosphorylation of IRS1 and ERK1/2 in primary human adipocytes. *The FASEB Journal* 2007; 21(13): 3696-704.
18. Preitner F, Mody N, Graham TE, Peroni OD, Kahn BB. Long-term fenretinide treatment prevents high-fat diet-induced obesity, insulin resistance, and hepatic steatosis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2009; 297(6): E1420-9.
19. Stelmach-Mardas M, Mardas M, Warchoł W, Jamka M, Walkowiak J. Successful maintenance of body weight reduction after individualized dietary counseling in obese subjects. *Scientific Reports* 2014; 4: 6620.
20. Ku Y, Han K, Ahn H, Kwon H, Koo B, Kim H, et al. Resistance exercise did not alter intramuscular adipose tissue but reduced retinol-binding protein-4 concentration in individuals with type 2 diabetes mellitus. *Journal of International Medical Research* 2010; 38(3): 782-91.

21. Phillips A, Cobbold C. A comparison of the effects of aerobic and intense exercise on the type 2 diabetes mellitus risk marker adipokines, adiponectin and retinol binding protein-4. Review article, *International Journal of Chronic Diseases* 2014; 5: 358058.
22. Christou G, Tselepis A, Kiortsis D. The metabolic role of retinol binding protein 4. *Horm Metab Res* 2012; 44(01): 6-14.
23. Corvera S, Burkart A, Kim JY, Christianson J, Wang Z, Scherer PE. Keystone meeting summary: adipogenesis, obesity, and inflammation and , diabetes mellitus and the control of cellular energy metabolism, January 21–26, 2006, Vancouver, Canada. *Genes & Development* 2006; 20(16): 2193-201.
24. Sun Y, Hong J, Chen M, Ke Y, Zhao S, Liu W, et al. Ablation of Lgr4 enhances energy adaptation in skeletal muscle via activation of Ampk/Sirt1/Pgc1 $\alpha$  pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2015; 464(2): 396-400.
25. Lin CH, Wu JB, Jian JY, Shih CC. Epicatechin-3-O- $\beta$ -D-allopyranoside from *Davallia formosana* prevents diabetes and dyslipidemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *PLoS One* 2017; 12(3): e0173984.
26. Kjøbsted R, Munk-Hansen N, Birk JB, Foretz M, Viollet B, Bjørnholm M, et al. Enhanced muscle insulin sensitivity after contraction/exercise is mediated by AMPK. *Diabetes* 2016; db160530.
27. Ko JR, Seo DY, Park SH, Kwak HB, Kim M, Ko KS, et al. Aerobic exercise training decreases cereblon and increases AMPK signaling in the skeletal muscle of STZ-induced diabetic rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2018; 501(2): 448-53.
28. Kazemi F, Zahediasl S. Effects of exercise training on adipose tissue apelin expression in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Gene* 2018; 662: 97-102.
29. Thomas C, Bishop D, Moore-Morris T, Mercier J. Effects of high-intensity training on MCT1, MCT4, and NBC expressions in rat skeletal muscles: influence of chronic metabolic alkalosis. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2007; 293(4): E916-22.
30. Mansouri M, Nikooie R, Keshtkar A, Larijani B, Omidfar K. Effect of endurance training on retinol-binding protein 4 gene expression and its protein level in adipose tissue and the liver in diabetic rats induced by a high-fat diet and streptozotocin. *Journal of diabetes investigation* 2014; 5(5): 484-91.
31. Alam F, Islam A, Ibrahim Khalil M, Hua Gan S. Metabolic control of type 2 diabetes by targeting the GLUT4 glucose transporter: intervention approaches. *Current Pharmaceutical Design* 2016; 22(20): 3034-49.
32. Graham TE, Yang Q, Blüher M, Hammarstedt A, Ciaraldi TP, Henry RR, et al. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *New England Journal of Medicine* 2006; 354(24): 2552-63.
33. Lim S, Choi SH, Jeong IK, Kim JH, Moon MK, Park KS, et al. Insulin-sensitizing effects of exercise on adiponectin and retinol-binding protein-4 concentrations in young and middle-aged women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2008; 93(6): 2263-8.
34. Cui J, Bai Y, Wu L, Sun M, Lin C, Zhang H, et al. Effects of exercise and resveratrol on retinol binding protein 4, blood glucose and insulin sensitivity in aged obese rats. *Journal of hygiene research* 2017; 46(4): 602-9.
35. Kjøbsted R, Pedersen AJ, Hingst JR, Sabaratnam R, Birk JB, Kristensen JM, et al. Intact regulation of the AMPK signaling network in response to exercise and insulin in skeletal muscle of male patients with type 2 diabetes-Illumination of AMPK activation in recovery from exercise. *Diabetes* 2016; db151034.
36. Soori R, Yazdandoust H, Mosayebi Z, Khademi SH. The effect of exercise training on RBP4 Serum Levels and Insulin Resistance in women with type II diabetes. *Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences* 2016; 4(1): 50-7.
37. Hazell TJ, Hamilton CD, Olver TD, Lemon PW. Running sprint interval training induces fat loss in women. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* 2014; 39(8): 944-50.
38. Ou HY, Wu HT, Yang YC, Wu JS, Cheng JT, Chang CJ. Elevated retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in spontaneously hypertensive rats. *Hormone and Metabolic Research* 2011; 43(05): 312-8.
39. Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, et al. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 2005; 436(7049): 356.

40. Lehnen A, Leguisamo N, Pinto G, Markoski M, De Angelis K, Machado U, et al. Exercise-stimulated GLUT4 expression is similar in normotensive and hypertensive rats. *Hormone and Metabolic Research* 2011; 43(04): 231-5.
41. Cao S, Zhao G, Chang B, Zhang H. Effects of exercise on expression and phosphorylation of PI3K and PKB in insulin signaling in the skeletal muscles of type 2 diabetic rats. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao= Journal of Southern Medical University* 2010; 30(6): 1217-21.
42. Richter EA, Ruderman NB. AMPK and the biochemistry of exercise: implications for human health and disease. *Biochemical Journal* 2009; 418(2): 261-75.
43. Chen ZP, Stephens TJ, Murthy S, Canny BJ, Hargreaves M, Witters LA, et al. Effect of exercise intensity on skeletal muscle AMPK signaling in humans. *Diabetes* 2003; 52(9): 2205-12.
44. Park H, Kaushik VK, Constant S, Prentki M, Przybytkowski E, Ruderman NB, et al. Coordinate regulation of malonyl-CoA decarboxylase, sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase in rat tissues in response to exercise. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277(36): 32571-7.
45. Sahlin K, Tonkonogi M, Söderlund K. Energy supply and muscle fatigue in humans. *Acta Physiologica Scandinavica* 1998; 162(3): 261-6.
46. Lee KM, Jo S, Kim H, Lee J, Park CS. Functional modulation of AMP-activated protein kinase by cereblon. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 2011; 1813(3): 448-55.
47. Lanzi S, Codecasa F, Cornacchia M, Maestrini S, Capodaglio P, Brunani A, et al. Short-term HIIT and Fatmax training increase aerobic and metabolic fitness in men with class II and III obesity. *Obesity* 2015; 23(10): 1987-94.

# The Effect of High Intensity Interval Training on Retinol Binding Protein 4 and AMP-Activated Protein Kinase Gene Expression in Skeletal Muscle of Rats with Type II Diabetes

Aghaei F<sup>1\*</sup>, Mohsenzadeh M<sup>1</sup>, Nameni F<sup>2</sup>, Feizollahi F<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Physical Education and Sport Sciences, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran,

<sup>2</sup>Department of Physical Education and Sport Sciences, Varamin Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran

Received: 25 Dec 2018 Accepted: 9 Nov 2018

## Abstract

**Background & aim:** The positive effects of High Intensity Interval Training (HIIT) on reinforcement of healthy muscle tissue metabolism pathways have been long proven. One of the side effects of diabetes is the impairment of glucose metabolism and muscle fat. Therefore, the aim of the present study was to investigate the effect of HIIT on Retinol Binding Protein 4 (RBP) and AMP-activated protein kinase (AMPK) gene expression in skeletal muscle of rats with type II diabetes.

**Methods:** Sixty male Wistar rats (age: 8 weeks, weighing 250 ± 20 g) were randomly divided into 5 groups (n = 12): basal, healthy control, diabetes, HIIT, diabetes and exercise group. Before the starting of the training program, all groups except the basal group and control and exercise were injected with nicotinamide - streptozotocin (STZ) by peritoneal injection to induce diabetic model. The training rats were treated for 8 weeks, 5 days a week, with an intensity of 80 to 85% of maximum speed to HIIT exercises. 48 hours after the last training session, after anesthesia, soleus muscle was removed and mRNA RBP4 and mRNA AMPK were measured. Data were analyzed by ANOVA and post hoc Tukey test (P <0.05).

**Results:** The induction of diabetes caused a significant increase in the mRNA RBP4 rate. While the reduction in this gene was significant in the diabetic exercise group and exercise group compared with the diabetic group (p=0.003). Performing a HIIT exercise significantly increased AMPK mRNA levels compared with the control group for diabetes (p=0.001). Also, the increase of this gene in the diabetic exercise group and exercise was significantly more than the diabetes group (p=0.002)

**Conclusion:** The results of the present study revealed that the use of HIIT exercise lessens the destructive effects of diabetes by increasing the key factor in muscle cellular metabolism of AMPK (stimulating the increase of GLUT transfer) and reducing RBP, it could be effective in improving insulin resistance of the muscle cell.

**Key words:** HIIT, Retinol Binding Protein 4 (RBP4), AMP-activated protein kinase(AMPK), diabetes.

---

**Corresponding author:** Aghaei F, Department of Physical Education and Sport Sciences, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

**Email:** fariba.aghaei@kiau.ac.ir

**Please cite this article as follows:**

Aghaei F, Mohsenzadeh M, Nameni F, Feizollahi F. The Effect of High Intensity Interval Training on Retinol Binding Protein 4 and AMP-Activated Protein Kinase Gene Expression in Skeletal Muscle of Rats with Type II Diabetes. *Armaghane-danesh* 2019; 23(6): 709-721