

تأثیر تمرین تناوبی شدید بر بیان ژن شاخص‌های آپوپتوزی در عضله اسکلتی موش‌های دیابتی

حسین مرادی^۱، سعیده شادمهری^۱، حسین شیروانی^۲

^۱گروه تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، واحد یادگار امام خمینی(ره) شهر ری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران، ^۲مرکز تحقیقات فیزیولوژی ورزشی، پژوهشکده سبک زندگی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله(عج)، تهران، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۷/۱۰/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۲/۰۷

چکیده

مقدمه و هدف: آپوپتوز نقش مهمی در پاتوفیزیولوژی دیابت نوع ۲ دارد. هدف از این تحقیق، تعیین و تأثیر تمرین تناوبی شدید بر بیان ژن شاخص‌های آپوپتوزی در عضله اسکلتی موش‌های دیابتی بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ۶۰ سر رت نر ویستار با میانگین وزنی 20 ± 220 گرم به طور تصادفی در ۵ گروه شامل؛ کنترل پایه، کنترل هشت هفته، دیابت، تمرین و دیابت-تمرین قرار گرفتند. در این مطالعه موش‌ها با استفاده از استرپتوزوتوسین به صورت تک دوز ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و به صورت درون صفاقی دیابتی شدند. تمرین تناوبی با شدت ۸۵-۸۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه، ۵ روز در هفته و به مدت ۸ هفته اجرا گردید. میزان بیان ژن‌های کاسپاز-۳ و Bcl2 به روش ریل تام پی‌سی‌ار اندازه‌گیری شد. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون‌های آماری تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد بین میانگین بیان ژن Bcl2 و کاسپاز-۳ عضله اسکلتی موش‌های دیابتی در گروه‌های مختلف تفاوت وجود دارد ($p=0/001$). بیان ژن Bcl2 عضله اسکلتی در گروه تمرین ($p=0/001$) و تمرین - دیابت ($p=0/048$) نسبت به گروه دیابت به طور معنی‌داری بیشتر بود ($p=0/001$). همچنین بیان ژن کاسپاز-۳ عضله اسکلتی در گروه تمرین و تمرین-دیابت نسبت به گروه دیابت به طور معنی‌داری کمتر بود ($p=0/001$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد دیابت با افزایش آپوپتوز عضله اسکلتی همراه است و تمرین تناوبی شدید می‌تواند به تنظیم سطح آپوپتوز در عضله اسکلتی طی دیابت کمک کند، بنابراین پیشنهاد می‌شود انجام این تمرینات برای بیماران دیابتی مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: تمرین تناوبی شدید، کاسپاز-۳، Bcl2، دیابت

*نویسنده مسئول: سعیده شادمهری، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد یادگار امام خمینی(ره) شهر ری، گروه تربیت‌بدنی و علوم ورزشی

Email: saeedehsh61@gmail.com

مقدمه

پروتئین ضد آپوپتوزی است که باعث جلوگیری از تخریب اکسیداتیو سلول می‌گردد و به عنوان یکی از معروف‌ترین پروتئین‌های مهارکننده آپوپتوز شناخته می‌شود که علاوه بر جلوگیری از آزادسازی سیتوکروم c از میتوکندری، از طریق حفظ یکپارچگی غشای میتوکندری با خارج ساختن یون‌های H^+ به عامل فعال‌سازی پروتئاز آپوپتوز متصل می‌شود و فعال‌سازی کاسپازها را مهار می‌کند (۸).

آپوپتوز یک فرآیند طبیعی در سلول‌ها است که سبب حذف سلول‌های پیر، آسیب دیده و مضر می‌شود (۹). از نظر فیزیولوژیکی، آپوپتوز نقش مهمی در تنظیم رشد، نمو، هموستاز و مهار توموری در بافت‌های میتوزی دارد. با این حال، از لحاظ پاتولوژیک آپوپتوز بیش از حد نقش منفی در حفظ عملکرد عضله اسکلتی دارد (۱۰). به نظر می‌رسد در این حالت مرگ برنامه‌ریزی شده (آپوپتوز) در سلول‌های عضله اسکلتی افزایش یافته و بافت را دچار آسیب می‌کند. بنابراین پژوهشگران همواره به دنبال اتخاذ راهکارهای مناسب برای پیشگیری از آپوپتوز و بیماری‌های مختلف عضلانی مرتبط با آن هستند. ورزش منظم یک استراتژی مؤثر برای پیشگیری و درمان دیابت نوع ۲ است. اکثر پژوهش‌هایی که اثرات درمانی ورزش در دیابت نوع ۲ را بررسی کرده‌اند شامل؛ ورزش مداوم، شدت کم و متوسط مانند راه رفتن و دویدن یا دوچرخه سواری کمتر از ۳۰ دقیقه در جلسه هستند (۱۱-۱۳). اگر چه راهبرد مطلوب هنوز مشخص نیست، تمرین با شدت بالاتر ممکن است برای

دیابت یکی از شایع‌ترین بیماری‌های غیر واگیر است که اگر کنترل نشود، دستگاه‌های مختلف بدن را با عواقب جدی ناتوان کننده و تهدید کننده زندگی هدف قرار می‌دهد. علی‌رغم ناهمگونی در علل بالینی، هیپرگلیسمی شایع‌ترین اختلال متابولیک در بیماران دیابتی است. یکی از عوارض ایجاد شده در اثر هیپرگلیسمی ناشی از دیابت، القاء آپوپتوز در بافت‌های مختلف بدن از جمله عضله اسکلتی می‌باشد (۱). عضله اسکلتی تقریباً نیمی از وزن بدن ما را تشکیل می‌دهد که پس از غذا تا ۷۵ درصد از دفع گلوکز تحرک شده به وسیله انسولین را به عهده دارد. در واقع، تحویل گلوکز خون به عضله و تبدیل آن به گلیکوژن عامل مهمی برای حساسیت به انسولین است (۲). پژوهش‌های مختلف نشان داده‌اند که دیابت میزان آپوپتوز را به میزان چشمگیری افزایش می‌دهد (۳-۵). در سطح مولکولی، از دست دادن سلول بتای پانکراس به وسیله آپوپتوز نقش مهمی در توسعه کمبود انسولین و شروع یا پیشرفت بیماری دارد. عوامل اصلی در ایجاد آپوپتوز پروتئازهایی به نام کاسپازها هستند که با فعال شدن آن‌ها، پروتئین‌های هسته‌ای، پروتئین‌های اسکلت سلولی و همچنین پروتئین‌های دخیل در انتقال پیام مورد هدف قرار گرفته و در نهایت مرگ سلولی رخ می‌دهد (۶). کاسپاز-۳ یکی از عوامل اثرگذار اصلی آپوپتوز است به طوری که فعال شدن کاسپاز-۳ نشان دهنده آپوپتوز سلولی غیرقابل برگشت است (۷). Bcl-2 نیز

جسمانی شود (۲۲). در بدن انسان، عضلات اسکلتی از آنجا که تعداد زیادی از میتوکندری ها را شامل می شوند، به عنوان ارگان اصلی متابولیسم در نظر گرفته می شوند. بنابراین، با توجه به اهمیت عضله اسکلتی در کنترل گلوکز و همچنین نقش حیاتی آن در عمل انسولین، اختلال در سلامت عضلات اسکلتی در افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ توانایی آنها در کاهش بارهای دیس گلیسمی، موجب افزایش عوارض بعدی می شود (۲۳) و در نهایت، ناتوانی جسمی دیابت را به همراه دارد (۲۴). با این حال، درک ما از تأثیر این بیماری مزمن بر سلامت و کیفیت عضلات اسکلتی انسان و اثرات مفید فعالیت های ورزشی بر آن بسیار محدود است. بنابراین هدف از این مطالعه تعیین و بررسی تأثیر تمرین تناوبی شدید بر بیان ژن شاخص های آپوتوزی در عضله اسکلتی موش های دیابتی بود.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، ۶۰ سررت نر ۸ هفته ای نژاد ویستار از انستیتو پاستور ایران با میانگین وزنی 220 ± 20 به عنوان نمونه تحقیق انتخاب شدند. رت ها به طور تصادفی در پنج گروه شامل؛ کنترل سالم بدون تزریق استرپتوزوتوسین و ورزش (کنترل پایه) (۱۲ سر)، کنترل سالم بدون تزریق استرپتوزوتوسین و ورزش (کنترل ۸ هفته) (۱۲ سر)، دیابتی بدون انجام تمرین (۱۲ سر)، دیابتی با انجام تمرین (۱۲ سر) و تمرین سالم (۱۲ سر) قرار گرفتند. در

بهبود کنترل گلیسمی در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ مؤثرتر باشد. نشان داده شده است که تمرین ها با شدت بالا (HIIT) می تواند کنترل گلیسمی در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ را بهبود بخشد (۱۶-۱۴). HIIT شامل اینتروال های کوتاه فعالیت با شدت بالا است که با دوره های فعالیت کم یا استراحت همراه می باشد (۱۷). خاکدان و همکاران نشان دادند که هشت هفته HIT منجر به افزایش معنی دار بیان Bcl2 بافت قلب موش های دیابتی شد (۱۸). با این حال، تنورساز و همکاران نشان دادند چهار هفته تمرین هوازی (۵ جلسه در هفته) با سرعت ۱۵-۱۸ متر در دقیقه و مدت ۲۵-۴۴ دقیقه بر Bcl-2 سلول های عضلانی قلب موش های دیابتی تأثیر نداشت (۱۹). نتایج سیاه کوهیان و همکاران نیز حاکی از آن است که پس از ۱۲ هفته تمرین های استقامتی میزان پروتئین Bcl-2 کاهش یافت، اما بین گروه تمرینی و گروه کنترل در کاسپاز-۳ عضله اسکلتی موش های ویستار تفاوت معنی داری مشاهده نشد (۲۰). با این حال لی و همکاران نشان دادند که فعالیت ورزشی میزان آپوتوز را با افزایش بیان پروتئین های کاسپاز-۳ در یک مدل موش های صحرائی دچار ایسکمی افزایش می دهد (۲۱). از طرفی، مزایای بالقوه HIT بر روی شاخص های آپوتوزی و ضد آپوتوزی در عضله اسکلتی بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ هنوز مشخص نشده است.

بیماری های مزمن از قبیل دیابت ممکن است با اختلال در تنظیم آپوتوز باعث تسریع کردن کاهش توده و قدرت عضلانی و در نتیجه افزایش خطر ناتوانی

این مطالعه موش‌ها با استفاده از داروی استرپتوزوتوسین به صورت تک دوز ۵۰ میلی‌گرم به ازای هرکیلوگرم وزن بدن و به صورت درون صفاقی دیابتی شدند. گروه‌های مورد مطالعه در قفسه‌های مخصوص چوندگان از جنس PVC با درپوش توری فلزی که کف آنها با تراشه‌های تمیز چوب پوشانده شده بود، تقسیم شدند. دمای اتاق $22 \pm 1/4$ درجه سانتی‌گراد و رطوبت معادل ۵۰ تا ۵۵ درصد بود. نمونه‌ها طبق چرخه ۱۲ ساعت خواب و بیداری، با در دسترس بودن آب و غذا (غذای فشرده و آماده مخصوص موش، ساخت کارخانه خوراک گرگان و آب مصرفی و آب تصفیه شده شهری در ظرف آبخوری) نگهداری شدند. در این تحقیق اصول اخلاقی در مورد نحوه کار با حیوانات آزمایشگاهی از جمله در دسترس بودن آب و غذا، شرایط نگهداری مناسب و عدم اجبار در تمرین‌ها مدنظر قرار گرفت. همه آزمایش‌ها بر اساس خط مشی‌های قرارداد هلسینکی اجرا شد.

در پژوهش حاضر برای برآورد حداکثر سرعت دویدن آزمون عملکرد ورزشی مدرج را با شیب ۰ درجه اجرا کردند که با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه آغاز و سرعت تدریجی به ازای هر یک دقیقه ۱ متر بر دقیقه افزوده می‌شد تا رت‌ها قادر به دویدن نباشند (واماندگی). پس از برآورد حداکثر سرعت گروه تمرینی ۵ جلسه در هفته و به مدت ۸ هفته به فعالیت بر روی نوارگردان پرداختند. پروتکل اجرای وهله‌های تمرینی با شدت ۸۰ تا ۸۵ درصد حداکثر سرعت به

HIIT به مدت ۲ دقیقه با دوره‌های استراحتی فعال ۱ دقیقه‌ای بود و در هر جلسه ۵ وهله تمرینی اجرا می‌شد (جدول ۱).

۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی (۱۰ تا ۱۲ ساعت ناشتا)، رت‌های مورد مطالعه در هر گروه با تزریق درون صفاقی کتامین (۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شدند. سپس بافت عضله نعلی رت‌ها نمونه برداری شده و پس از شستشو در سرم فیزیولوژیک در میکروتیوب‌های ۱/۸ حاوی مایع RNA later™ با نسبت ۲۰ درصد غوطه ور گردیده و جهت انجام آزمایش‌های ژنتیک به آزمایشگاه انتقال داده شد. اندازه‌گیری بیان ژن‌های فاکتورهای مورد نظر از بافت عضله نعلی به وسیله تکنیک Real time-PCR سنجش و پس از کمی‌سازی مقادیر بیان ژن با استفاده از فرمول $\Delta\Delta Ct$ تجزیه و تحلیل شد. واکنش PCR با استفاده از PCR (Applied Biosystems) master mix و SYBR Green در دستگاه (Applied Biosystems, Sequence ABI Step One Detection Systems. Foster City, CA) شرکت سازنده انجام گرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده در تحقیق حاضر در جدول ۲ آورده شده است.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری شاپیرو ویلک، آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند.

جدول ۱: پروتکل تمرینی هشت هفته‌ای آزمودنی‌ها

هفته	تکرارهای دو دقیقه‌ای (سرعت متر بر دقیقه)	استراحت‌های فعال یک دقیقه‌ای (سرعت متر بر دقیقه)	وهله های تمرینی
اول	۱۶	۱۰	۵
دوم	۱۸	۱۰	۵
سوم	۲۴	۱۱	۵
چهارم	۲۶	۱۱	۵
پنجم	۳۰	۱۲	۵
ششم	۳۴	۱۲	۵
هفتم	۳۶	۱۴	۵
هشتم	۳۸	۱۴	۵

جدول ۲: توالی پرایمرهای مورد استفاده

طول amplicon	توالی	پرایمرها	نام ژن
92 bp	5'- CCTGTGAGCACTGGTCTGT -3'	Forward	Caspas3
	5'- ATGCTTTCCAAGTCCCGTGT -3'	Reverse	
95 bp	5'- GACTTCTCTCGTCGCTACCG -3'	Forward	Bcl2
	5'- CATGACCCCCACCGAACTCAA -3'	Reverse	
94 bp	5'- ATCACTGCCACTCAGAAGAC -3'	Forward	GAPDH
	5'- ACATTGGGGGTAGGAACAC -3'	Reverse	

یافته‌ها

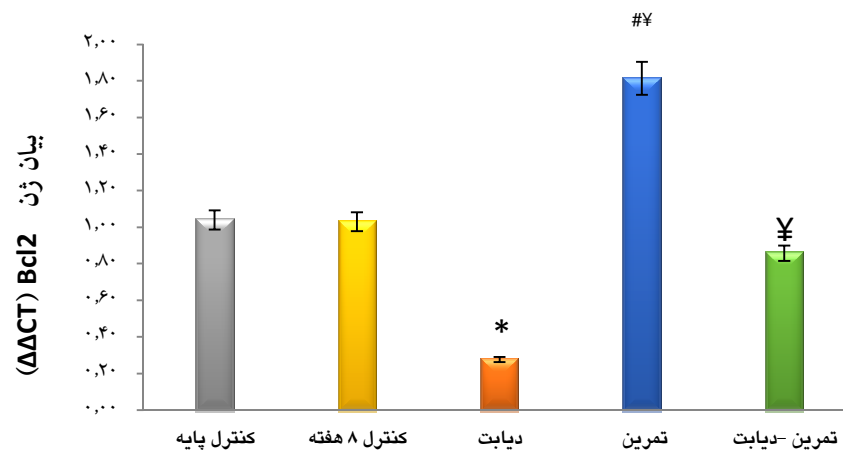
تمرین ($p=0/0001$) و تمرین - دیابت ($p=0/048$) نسبت به گروه دیابت به طور معنی‌داری بیشتر بود. هم‌چنین تغییرات بیان ژن Bcl2 عضله اسکلتی در گروه تمرین نسبت به گروه تمرین - دیابت به طور معنی‌داری بالاتر بود ($p=0/0001$) (نمودار ۱). هم‌چنین تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که بین میانگین بیان ژن کاسپاز-۳ عضله اسکلتی موش‌های دیابتی در گروه‌های مختلف تحقیق، تفاوت وجود دارد ($p=0/0001$). نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد تغییرات بیان ژن کاسپاز-۳ عضله اسکلتی در گروه دیابت نسبت به گروه‌های کنترل پایه و کنترل ۸ هفته به طور معنی‌داری بیشتر بود ($p=0/0001$). تغییرات

در جدول ۳ میانگین و انحراف معیار متغیرهای تحقیق در گروه‌های مختلف نشان داده شده است. تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که بین میانگین بیان ژن Bcl2 عضله اسکلتی موش‌های دیابتی در گروه‌های مختلف تحقیق، تفاوت وجود دارد ($p=0/0001$). نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد تغییرات بیان ژن Bcl2 عضله اسکلتی در گروه دیابت نسبت به گروه‌های کنترل پایه ($p=0/004$)، کنترل ۸ هفته ($p=0/004$) به طور معنی‌داری کمتر بود. تغییرات بیان ژن Bcl2 عضله اسکلتی در گروه

بیان ژن کاسپاز-۳ عضله اسکلتی در گروه تمرین نسبت به گروه دیابت به طور معنی‌داری کمتر بود ($p=0/001$). همچنین تغییرات بیان ژن کاسپاز-۳ عضله اسکلتی در گروه تمرین نسبت به گروه دیابت به طور معنی‌داری کمتر بود ($p=0/003$) (نمودار ۲).

جدول ۳: میانگین و انحراف معیار متغیرهای تحقیق در گروه‌های مختلف

گروه	کنترل پایه	کنترل ۸ هفته	دیابت	تمرین	تمرین-دیابت
متغیر					
بیان نسبی ژن Bcl2 (fold change)	۱/۰۴±۰/۰۸	۱/۰۳±۰/۱۳	۰/۲۷±۰/۰۵	۱/۸۱±۰/۲۶	۰/۸۵±۰/۰۵
بیان نسبی ژن کاسپاز-۳ (fold change)	۱/۰۹±۰/۱۳	۱/۰۱±۰/۱۵	۶/۷۴±۰/۶۵	۰/۵۶±۰/۰۸	۲/۳۳±۰/۲۳

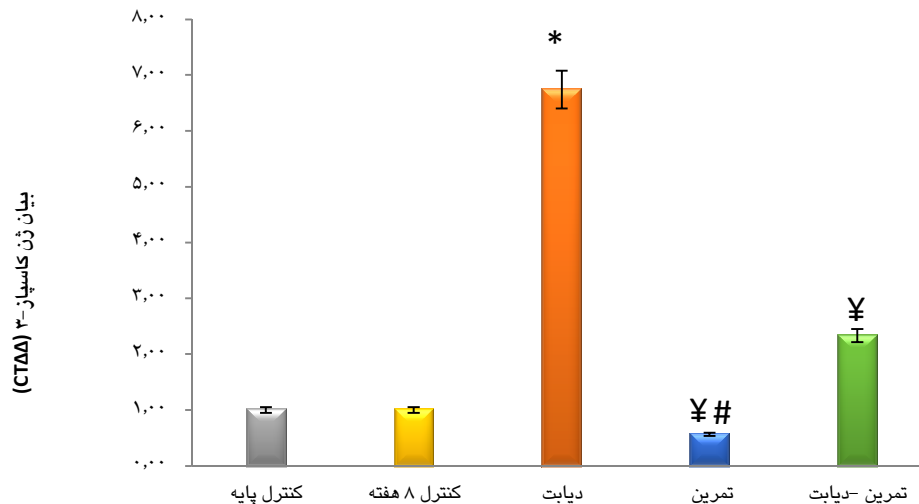


نمودار ۱: تغییرات بیان ژن Bcl2 عضله اسکلتی موش‌های دیابتی در گروه‌های مختلف

* تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل پایه و کنترل ۸ هفته ($p \leq 0/05$).

¥ تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه دیابت ($p \leq 0/05$).

تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه تمرین - دیابت ($p \leq 0/05$).



نمودار ۲: تغییرات بیان ژن کاسپاز-۳ در عضله اسکلتی موش های دیابتی در گروه های مختلف

* تفاوت معنی دار نسبت به گروه کنترل پایه و کنترل ۸ هفته ($p \leq 0.05$).

¥ تفاوت معنی دار نسبت به گروه دیابت ($p \leq 0.05$).

تفاوت معنی دار نسبت به گروه تمرین - دیابت ($p \leq 0.05$).

بحث

بالا و تمرین های تداومی با شدت متوسط بر فرآیند آپوپتوز موش های مبتلا به انفارکتوس قلبی پرداختند. در این پژوهش نشان داده شد که هر دو روش تمرینی موجب افزایش معنی دار Bcl-2 میوکارد در مقایسه با گروه کنترل شد (۲۵). Bcl-2 مهم ترین پروتئین در تنظیم آپوپتوزیس است که در تحقیق حاضر در عضله اسکلتی مورد بررسی قرار گرفت. اگرچه مکانیسم دقیق آپوپتوز هنوز مشخص نیست، اما ممکن است با توجه به نوع سلول و نوع تحریکات متفاوت باشد (۲۶). نشان داده شده است که تمرین ورزشی سبب القا آپوپتوز می شود که یک روند طبیعی برای از بین بردن سلول های آسیب دیده است که در آن واکنش های التهابی چشمگیری رخ نمی دهد. این روند باعث حصول اطمینان از عملکرد طبیعی بدن می شود (۲۷). چندین سازوکار برای اثرات محافظتی تمرین های ورزشی

هیپرگلیسمی شایع ترین اختلال متابولیک در بیماران دیابتی است. یکی از عوارض ایجاد شده در اثر هیپرگلیسمی ناشی از دیابت، القاء آپوپتوز در بافت های مختلف بدن از جمله عضله اسکلتی می باشد (۱). لذا هدف از پژوهش حاضر تعیین و بررسی تأثیر تمرین تناوبی شدید بر بیان ژن شاخص های آپوپتوزی در عضله اسکلتی موش های دیابتی بود.

یافته های این تحقیق نشان داد هشت هفته تمرین تناوبی شدید موجب افزایش معنی دار بیان ژن Bcl2 عضله اسکلتی موش های دیابتی شد. نتایج در مطالعه حاضر با نتایج پژوهش های قبلی همخوان می باشد (۲۵ و ۲۰، ۱۸). در همین راستا، کای و همکاران به مقایسه دو روش تمرینی اینتروال با شدت

روی آپوپتوز عضله مطرح شده است که شامل تغییر مستقیم در بیان پروتئین‌های مربوط به آپوپتوز، کاهش آزادسازی عوامل آپوپتوزنیک میتوکندری و تغییرات تولید گونه‌های فعال اکسیژن و وضعیت ضد اکسایشی می‌باشد (۲۸). میتوکندری نقش مهمی در تنظیم آپوپتوز سلول‌های عضله اسکلتی ایفا می‌کند. به نظر می‌رسد در اثر تمرین پر شدت در تحقیق حاضر عملکرد میتوکندری‌های عضله اسکلتی بهبود یافته و این عامل منجر به افزایش مقادیر Bcl-2 به عنوان عامل مهار کننده آپوپتوز شده باشد. همچنین یکی از دلایل افزایش Bcl-2 می‌تواند ناشی از کاهش Bax بوده باشد (هر چند که در تحقیق حاضر مقادیر Bax اندازه‌گیری نشد). به هر حال آپوپتوز در عضلات اسکلتی با افزایش Bcl-2 کاهش می‌یابد. علاوه بر این، مکانیسم‌های حفاظت در برابر آپوپتوز به علت پیشگیری ممکن است به وسیله NF- κ B متأثر شود، که مانع از حساسیت به آپوپتوز می‌شود و می‌تواند تنظیم افزایشی سلول‌های ضد آپوپتوتیک Bcl-2 را تقویت کند (۲۹). استرس اکسایشی نیز به عنوان یک آغازگر مهم آپوپتوز در سلول‌ها می‌باشد (۳۰). همان‌طور که اشاره شد مکانیسم ورزش در مقابله با آپوپتوز به طور کامل روشن نشده است، با وجود این، تحقیق انجام شده به وسیله فرنچ و همکاران نشان می‌دهد که حداقل در بخشی ممکن است بهبود عملکرد آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از جمله فعالیت MnSOD در تعدیل آپوپتوز نقش داشته باشد (۳۰). این یک دیدگاه مهم است که اهمیت ورزش درمانی را برای بهبود سازوکارهای اکسایشی به عنوان وسیله‌ای برای جلوگیری از آپوپتوز برجسته می‌کند. افزایش Bcl-2 با

تحکیم دیواره میتوکندری، جلوگیری از رهاسازی سیتوکروم c، تنظیم کلسیم رها شده از سارکوپلاسمیک و کاهش اثر ROS ناشی از فعالیت ورزشی، ایمنی سلول را بالا می‌برد و از آپوپتوز ناشی از استرس جلوگیری می‌کند. با توجه به این که در پژوهش حاضر از پروتکل هشت هفته‌ای استفاده شد، بنابراین احتمال دارد سازگاری‌های ناشی از تمرین تناوبی پر شدت سبب فعال‌سازی مسیرهای ضد آپوپتوزی شده باشد. با این حال، افزایش Bcl-2 به دنبال فعالیت ورزشی در تحقیق حاضر با نتایج برخی پژوهش‌های قبلی همخوان نمی‌باشد. در همین راستا، تنورساز و همکاران نشان دادند چهار هفته تمرین هوازی (۵ جلسه در هفته) با سرعت ۱۸-۱۵ متر در دقیقه و مدت ۴۴-۲۵ دقیقه بر Bcl-2 سلول‌های عضلانی قلب موش‌های دیابتی تأثیر نداشت (۱۹). سنو و همکاران نیز در مطالعه‌ای به بررسی تأثیر فعالیت اختیاری (چرخ دوار) بر عوامل درگیر در آپوپتوز و کاهش استرس پرداختند. تفاوت معنی‌داری در سطح بیان کبیدی BCL-2 مشاهده نشد (۳۱). علت تناقض تحقیق حاضر با یافته فوق نیز احتمالاً بافت محل اندازه‌گیری، نوع آزمودنی‌ها، شرایط آزمودنی‌ها و نوع پروتکل تمرینی می‌باشد. گزارش شده است که اختلالات بافتی با آسیب DNA میتوکندری مرتبط است و منجر به نقص در زنجیره انتقال الکترون و تنظیم افزایشی ROS و در نتیجه آپوپتوز می‌شود (۳۲). بنابراین با توجه به نتایج، به نظر می‌رسد تمرین تناوبی شدید در تحقیق حاضر، می‌تواند راهکار مناسبی برای افزایش بیان ژن Bcl-2 عضله اسکلتی طی دیابت باشد، همچنین نتایج تحقیق حاضر نشان داد

تمرین کرده به طور معنی داری کمتر از گروه کنترل دیابتی بود (۳۷). فعالیت ورزشی با کاهش فعالیت کاسپاز ۹ آغاز گر ۹ و کاسپاز اجرایی ۳ می تواند از دو مسیر داخلی و خارجی مانع آپوپتوز و قطعه قطعه شدن DNA شود (۳۸). همچنین نشان داده شده است که عامل نکروز تومور آلفا (TNF- α) آپوپتوز را از طریق بیان اسید نیتریک اکسید سنتاز (Inducible nitric oxide synthase (iNOS)) و نیتریک اکسید (NO) افزایش می دهد (۳۹). ممکن است تمرین از طریق کاهش عامل نکروز تومور آلفا سیگنال دهی مرتبط با آن به کاهش آپوپتوز در تحقیق حاضر کمک کرده باشد. گزارش شده است که افزایش Bcl-2 با تحکیم دیواره میتوکندری، سرکوب Bax، جلوگیری از رهاسازی سیتوکروم c، تنظیم کلسیم رها شده از شبکه سارکوپلاسمیک و کاهش اثر ROS ناشی از فعالیت ورزشی، ایمنی سلول را بالا می برد و از آپوپتوز ناشی از استرس جلوگیری می کند. Bcl-2 یک پروتئین ضد آپوپتوزی است که در مسیر داخلی آپوپتوز نقش دارد و مانع فعالیت کاسپاز ۳ می شود (۲۲). با توجه به این که در پژوهش حاضر از پروتکل هشت هفته ای استفاده شد احتمال دارد سازگاری های ناشی از تمرین سبب فعال سازی مسیرهای ضد آپوپتوزی شده باشد، لذا این مسیرها می تواند زمینه ساز تنظیم کلسیم و در نتیجه تعدیل بیان ژن کاسپاز ۳ در تحقیق حاضر باشد. هنگامی که سطح انسولین پلازما پایین باشد (در دیابت نوع ۱) یا هنگامی که سلول های عضلانی به اثرات انسولین-IGFI حساس می شوند (در بیماری مزمن دیابت نوع ۲)، تخریب پروتئین از طریق سیستم

بیان ژن کاسپاز ۳ در عضله اسکلتی موش های دیابتی به طور معنی داری بالاتر بود و هشت هفته تمرین تناوبی شدید موجب کاهش معنی دار بیان ژن کاسپاز ۳ در عضله اسکلتی موش های دیابتی شد. تاکنون سازوکارهای دقیق مولکولی آپوپتوز ناشی از غلظت بالای گلوکز مشخص نشده است. سازوکارهای آپوپتوز که گلوکز به واسطه آنها موجب القای مرگ برنامه ریزی سلول می شود، بسته به نوع سلول و بافت مورد مطالعه متفاوت است (۳۳). پژوهش ها گزارش کردند که پروتئین کیناز B در اثر دیابت در نمونه های حیوانی کاهش می یابد (۳۴) و احتمالاً یکی دیگر از مکانیسم های محافظت سلولی ناشی از تمرین های منظم ورزشی در برابر آپوپتوز با اثرات مهم ورزش در افزایش بیان پروتئین کیناز B مرتبط است، چرا که نشان داده شده است که پروتئین کیناز B با فعالیت ورزشی با تنظیم افزایشی مواجه می شود (۳۵). پروتئین کیناز B از طریق مهار مستقیم فعالیت کاسپازی موجب مسدود کردن مسیرهای آپوپتوز می گردد (۳۴). تمرین می تواند با تنظیم بیان کاسپاز ۳ همان طور که در مطالعه حاضر مشخص شد به بهبود عضله اسکلتی و پیشگیری از آسیب آن کمک نماید. اگرچه مکانیسم های دقیق تأثیر فعالیت ورزشی بر تنظیم مسیر آپوپتوزی ناشی از دیابت به درستی مشخص نیست در تحقیقات قبلی مشاهده شده است که فعالیت ورزشی می تواند از طریق کاهش پروتئین پرو آپوپتیک Bax و افزایش پروتئین ضد آپوپتیک Bcl-2 و در نتیجه مهار آزاد سازی سیتوکروم c مانع فعال شدن کاسپاز ۹ شود (۳۶). چای و همکاران گزارش کردند که فعالیت کاسپاز ۳ پس از شش هفته تمرین روی نوارگردان در موش های دیابتی

نتیجه‌گیری

با توجه با یافته‌های تحقیق حاضر، به نظر می‌رسد دیابت با افزایش آپوپتوز عضله اسکلتی همراه است و تمرین تناوبی شدید می‌تواند به تنظیم سطح آپوپتوز در عضله اسکلتی طی دیابت کمک کند. با وجود این، با توجه به پژوهش‌های اندک انجام شده در این رابطه، درک اثرات فعالیت ورزشی بر بیان ژن فاکتورهای درگیر در آپوپتوز در عضله اسکلتی به ویژه در بیماری دیابت نوع ۲ نیاز به پژوهش‌های بیشتری دارد.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پروژه تحقیقاتی با کد اخلاق IR.BMSU.REC.1396.712 دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله (عج) می‌باشد، بدین وسیله از پرسنل مرکز حیوانات علوم آزمایشگاهی این دانشگاه، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

یوبیکوئیتین- پروتئوزوم تسریع شده و یک قطعه اکتین ۱۴ کیلو دالتون به وسیله آبشار کاسپاز ۳ در عضله تولید می‌شود (۴۰). احتمالاً در اثر تمرین پرشدت Bcl-2 به میتوکندری منتقل شده و باعث القای یک سری منافذ نفوذپذیر موقت در غشای خارجی میتوکندری شده‌اند که رهایش سیتوکروم C را مهار و منجر به کاهش فعالیت کاسپاز-۹ و در نتیجه کاهش مقادیر کاسپاز-۳ شده‌اند (۲۲). با این حال مخالف با یافته‌های تحقیق حاضر، لی و همکاران نشان دادند که فعالیت ورزشی میزان آپوپتوز را با افزایش بیان پروتئین‌های کاسپاز-۳ در یک مدل موش‌های صحرایی دچار ایسکمی افزایش می‌دهد. این پژوهشگران بر تأثیر زمان تمرین در توانبخشی پس از ایسکمی تأکید کردند (۲۱). نتایج سیاه‌کوهیان و همکاران نیز حاکی از آن بود که تمرین‌های استقامتی بر کاسپاز-۳ عضله اسکلتی موش‌های ویستار تأثیر معنی‌داری نداشت (۲۰). علت تناقض تحقیق حاضر با یافته‌های فوق نیز احتمالاً نوع آزمودنی‌ها، پروتکل تمرین و نوع بافت مورد مطالعه می‌باشد. در مجموع در باره اثر تمرین بر آپوپتوز در آزمودنی‌های دیابتی پژوهش‌های محدودی انجام شده که با توجه به نوع آزمودنی و روش تحقیق نتایج متفاوتی داشته است. از محدودیت‌های تحقیق حاضر می‌توان به عدم اندازه‌گیری دیگر فاکتورهای مرتبط با آپوپتوز اشاره کرد. اندازه‌گیری فاکتورهای پیش آپوپتوزی (Bid و Bax) و ضد آپوپتوزی (Bcl-XL) نیز می‌تواند در تبیین و تفسیر بهتر نتایج به ویژه در بافت عضله در آزمودنی‌های دیابتی کمک نماید.

REFERENCES

- 1.Kumar P, Rao GN, Pal BB, Pal A. Hyperglycemia-induced oxidative stress induces apoptosis by inhibiting PI3-kinase/Akt and ERK1/2 MAPK mediated signaling pathway causing downregulation of 8-oxoG-DNA glycosylase levels in glial cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2014; 53: 302-19.
- 2.Højlund K, Beck-Nielsen H. Impaired glycogen synthase activity and mitochondrial dysfunction in skeletal muscle: markers or mediators of insulin resistance in type 2 diabetes? *Curr Diabetes Rev* 2006; 2:375–95.
- 3.Shen E, Li Y, Li Y, Shan L, Zhu H, Feng Q, et al. Rac1 is required for cardiomyocyte apoptosis during hyperglycemia. *Diabetes* 2009; 58(10): 2386-95.
- 4.Guleria RS, Choudhary R, Tanaka T, Baker KM, Pan J. Retinoic acid receptor-mediated signaling protects cardiomyocytes from hyperglycemia induced apoptosis: Role of the rennin-angiotensin system. *Journal of cellular physiology*. 2011;226(5):1292-307.
- 5.Hashish HA, Kamal RN. Effect of curcumin on the expression of Caspase-3 and Bcl-2 in the spleen of diabetic rats. *J Exp Clin Anat* 2015; 14(1): 18-23.
- 6.Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 2007; 35(4): 495–516.
- 7.Yu ZQ, Jia Y, Chen G. Possible involvement of cathepsin B/D and caspase-3 in deferoxamine-related neuroprotection of early brain injury after subarachnoid haemorrhage in rats. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2014; 40: 270–83.
- 8.Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2008; 9(1): 47-58.
- 9.Marzetti E, Privitera G, Simili V, Wohlgemuth SE, Aulisa L, Pahor M, et al. Multiple pathways to the same end: mechanisms of myonuclear apoptosis in sarcopenia of aging. *The Scientific World Journal* 2010; 10: 340-9.
- 10.Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 495–516.
- 11.Davies MJ, D'Alessio DA, Fradkin J, Kernan WN, Mathieu C, Mingrone G, et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2018. a consensus report by the american diabetes association (ada) and the european association for the study of diabetes (EASD). *Diabetes Care* 2018; 41(12): 2669-701.
- 12.Karstoft K, Safdar A, Little JP. Optimizing exercise for the prevention and treatment of Type 2. *Diabetes Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018; 9: 237-246.
- 13.van Dijk JW, van Loon LJ. Exercise strategies to optimize glycemic control in type 2 diabetes: a continuing glucose monitoring perspective. *Diabetes Spectr* 2015; 28(1): 24-31.
- 14.Francois ME, Little JP. Effectiveness and safety of high-intensity interval training in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Spectr* 2015; 28: 39–44.
- 15.Cassidy S, Thoma C, Hallsworth K, Parikh J, Hollingsworth KG, Taylor R, et al. High intensity intermittent exercise improves cardiac structure and function and reduces liver fat in patients with type 2 diabetes: a randomised controlled trial. *Diabetologia* 2016; 59: 56–66.
- 16.Fex A, Leduc-Gaudet JP, Filion ME, Karelis AD, Aubertin-Leheudre M. Effect of elliptical high intensity interval training on metabolic risk factor in pre- and type 2 diabetes patients: a pilot study. *J Phys Act Health* 2015; 12: 942–6.
- 17.Cassidy S, Thoma C, Houghton D, Trenell MI. High-intensity interval training: a review of its impact on glucose control and cardiometabolic health. *Diabetologia* 2017; 60(1): 7-23.
- 18.Khakdan S, Delfan M, Heydarpour Meymeh M, Kazerouni F, Ghaedi H, Shanaki M, et al. High-intensity interval training(HIIT) effectively enhances heart function via miR-195 dependent cardiomyopathy reduction in high-fat high-fructose diet-induced diabetic rats. *Arch Physiol Biochem* 2018; 15: 1-8.
- 19.Tanoorsaz S, Behpour N, Tadibi V. Investigating the effect of mid-term of aerobic exercise on apoptosis biomarkers in the cardiomyocytes of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Fasa Univ Med Sci* 2018; 7(4): 488-97.
- 20.Siahkohian M, Asgharpour-arshad M, Bolboli L, Jafari A, Sheikhzadeh hesari F. Effect of 12-weeks aerobic training on some indices of skeletal muscle apoptosis in male rats. *Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services* 2018; 39(6): 35-43.
- 21.Li F, Shi W, Zhao EY, Geng X, Li X, Peng C, et al. Enhanced apoptosis from early physical exercise rehabilitation following ischemic stroke. *J Neurosci Res* 2017; 95(4):1017-24.

22. Koçtürk S, Kayatekin BM, Resmi H, Açıkgoz O, Kaynak C, Özer E. The apoptotic response to strenuous exercise of the gastrocnemius and soleus muscle fibers in rats. *European Journal of Applied Physiology* 2008; 102(5): 515-24.
23. Lachin JM, Genuth S, Cleary P, Davis MD, Nathan DM. Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive therapy. *N Engl J Med* 2000; 342: 381-9.
24. Wong E, Backholer K, Gearon E. Diabetes and risk of physical disability in adults: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2013; 1:106-114
25. Cai MX, Shi XC, Chen T, Tan ZN, Lin QQ, Du SJ, et al. Exercise training activates neuregulin 1/ErbB signaling and promotes cardiac repair in a rat myocardial infarction model. *Life Sciences* 2016; 149:1-9.
26. Childs AC, Phaneuf SL, Dirks AJ, Phillips T, Leeuwenburgh C. Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome c release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2: Bax ratio. *Can Res* 2002; 62:4592-8.
27. Mooren FC, Blöming D, Lechtermann A, Lerch MM, Völker K. Lymphocyte apoptosis after exhaustive and moderate exercise. *Journal of Applied Physiology* 2002; 93(1): 147-53.
28. Peterson JM, Bryner RW, Sindler A, Frisbee JC, Alway SE. Mitochondrial apoptotic signaling is elevated in cardiac but not skeletal muscle in the obese Zucker rat and is reduced with aerobic exercise. *Journal of Applied Physiology* 2008; 105(6): 1934-43.
29. Maulik N, Sasaki H, Addya S, Das DK. Regulation of cardiomyocyte apoptosis by redox-sensitive transcription factors. *FEBS Lett* 2000; 485: 7-12.
30. Marin-Garcia J, Goldenthal MJ. Mitochondrial centrality in heart failure. *Heart Fail Rev* 2008; 13: 137-50.
31. Seo H, Park CH, Choi S, Kim W, Jeon BD, Ryu S. Effects of voluntary exercise on apoptosis and cortisol after chronic restraint stress in mice. *J Exerc Nutrition Biochem* 2016; 20(3): 16-23.
32. Anderson EJ, Rodriguez E, Anderson CA, Thayne K, Chitwood WR, Kypson AP. Increased propensity for cell death in diabetic human heart is mediated by mitochondrial-dependent pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 300: 118-24.
33. Allen DA, Yaqoob MM, Harwood SM. Mechanisms of high glucose-induced apoptosis and its relationship to diabetic complications. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2005; 16(12): 705-13.
34. Kim DY, Jung SY, Kim CJ, Sung YH, Kim JD. Treadmill exercise ameliorates apoptotic cell death in the retinas of diabetic rats. *Molecular Medicine Reports* 2013; 7(6): 1745-50.
35. Libonati JR. Cardiac effects of exercise training in hypertension. *ISRN Hypertension* 2013; 24: 1-9.
36. Chen KC, Peng CC, Hsieh CL, Peng RY. Exercise ameliorates renal cell apoptosis in chronic kidney disease by intervening in the intrinsic and the extrinsic apoptotic pathways in a rat model. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine* 2013; 13: 23-36.
37. Chae CH, Jung SL, An SH, Jung CK, Nam SN, Kim HT. Treadmill exercise suppresses muscle cell apoptosis by increasing nerve growth factor levels and stimulating p-phosphatidylinositol 3-kinase activation in the soleus of diabetic rats. *Journal of Physiology and Biochemistry* 2011; 67(2): 235-41.
38. Kwak HB, Song W, Lawler JM. Exercise training attenuates age-induced elevation in Bax/Bcl-2 ratio, apoptosis, and remodeling in the rat heart. *The FASEB Journal* 2006; 20(6): 791-3.
39. Song W, Lu X, Feng Q. Tumor necrosis factor- α induces apoptosis via inducible nitric oxide synthase in neonatal mouse cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2000; 45: 595-602.
40. Du J, Wang X, Miereles C, Bailey JL, Debigare R, Zheng B, et al. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J Clin Invest* 2004; 113: 115-23.

The Effect of High-Intensity Interval Training (HIIT) on Gene Expression of Apoptotic Markers in the Skeletal Muscle of Diabetic Rats

Moradi H¹, Shadmehri S^{1*}, Shirvani H²

¹Department of Physical Education and Sport Science, Yadegare Imam Khomeini(RAH) Shahre-Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, ²Exercise Physiology Research Center, Life Style Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 31 Dec 2018

Accepted: 27 April 2019

Abstract

Background & aim: Apoptosis plays an important role in the pathophysiology of Type 2 diabetes. The aim of this study was to evaluate the effect of high-intensity interval training (HIIT) on gene expression of apoptotic markers in the skeletal muscle of diabetic rats.

Methods: In the present experimental study, three male Wistar rats weighing 220±20 g were randomly divided into 4 groups including: baseline control, eight weeks control, diabetes mellitus, exercise and diabetes mellitus. In the present study, rats were diabetic intraperitoneally using streptozotocin in a single dose of 50 mg / kg. Intermittent exercise with intensity of 0.55% maximal oxygen consumption was performed 5 days a week for 2 weeks. The expression of Caspase3 and Bcl2 genes was measured by Ray-Tom-Pissar method. The data were analyzed using one-way ANOVA and Tukey post hoc tests.

Results: The results indicated that there was a significant difference between the mean of Bcl2 gene expression and Caspase-3 skeletal muscle in diabetic rats ($p = 0.0001$). Skeletal muscle Bcl2 gene expression was significantly higher in exercise ($p = 0.0001$) and exercise-diabetes ($p = 0.048$) than diabetic group ($p = 0.0001$). Furthermore, the expression of Caspase-3 gene in skeletal muscle was significantly lower in diabetic group ($p = 0.0001$).

Conclusion: Diabetes appears to be associated with increased skeletal muscle apoptosis, and vigorous intermittent exercise may help to regulate apoptosis in skeletal muscle during diabetes, therefore it is recommended that these exercises be considered for diabetic patients.

Key words: High-intensity interval training, Caspas3, Bcl2, Diabetes

***Corresponding Author: Shadmehri S**, Department of Physical Education and Sport Science, Yadegare Imam Khomeini(RAH), Shahre Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
Email: saeedehsh61@gmail.com

Please cite this article as follows:

Moradi H, Shadmehri S, Shirvani H. The Effect of High-Intensity Interval Training(HIIT) on Gene Expression of Apoptotic Markers in the Skeletal Muscle of Diabetic Rats. *Armaghane-danesh* 2019; 24(3)(1): 461-473