Sport and Biomotor Sciences
ورزش و علوم زیست حرکتی

تأثیر یک دوره تمرین تناوبی شدید و مقاومتی فزاینده بر بیان ژن MYD-88 و سطح سرمی TNF-α در موش‌های صحرایی دیابتی نر

مهشید عقیلی[1]، ندا خالدی[2]*، حمید رجبی [3]، حسین عسکری[4]

۱- دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه خوارزمی تهران، تهران، ایران

۲- استادیار گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه خوارزمی تهران، تهران، ایران

۳- استاد گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

٤- استادیار دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشکده علوم زیستی دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

* نشانی نویسنده مسئول: دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه خوارزمی تهران

Email: n.khaledi@khu.ac.ir

وصول: ۱۳۹۸/۰۴/۲۳ اصلاح: ۱۳۹۸/۰۸/۱۰ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۱۱

چکیده

مقدمه و هدف: دیابت‌ملیتوس ناهنجاری متابولیکی است که همراه با نوروپاتی، عوارض کلیوی، بیماری قلبی و عروق محیطی، تصلب شرایین، فشارخون بالا و التهاب سیستمی است. امروزه استفاده از تمرین‌های تناوبی شدید و مقاومتی فزاینده برای درمان بیماری‌های متابولیکی مانند دیابت که تحمل قند و انسولین خون نقش بسزایی در کاهش عوارض آن دارد، در بین مردم رواج یافته است، لذا هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر یک دوره تمرین تناوبی شدید و مقاومتی فزاینده بر میزان تغییرات بیان ژن تمایز میلوئید ۸۸ و سطوح سرمی TNF-α بود.

روش‌شناسی: ۷۲ سر رت ٦ هفته‌ای با میانگین وزنی ۱۵۰ گرم به صورت تصادفی به شش گروه ۱۲ تایی: گروه کنترل (C)، گروه دیابت (D)، گروه دیابت-تمرین تناوبی شدید (DIT)، گروه تمرین تناوبی شدید (HIIT)، گروه دیابت- تمرین مقاومتی فزاینده (DRT) و گروه تمرین مقاومتی فزاینده (RT) تقسیم شدند. ٦ هفته تمرین تناوبی شدید و مقاومتی فزاینده ۳ روز در هفته انجام شد. بیان ژن با تکنیک Real-Time PCR و محاسبه تغییرات با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ صورت گرفت. سطوح سرمی TNF-α نیز به روش الایزا اندازه‌گیری شد. داده‌ها با استفاده از آزمون فیشر و مانوا در سطح معناداری ($p\leq ۰/۰۱$) تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: یافته‌های پژوهش، افزایش معنادار بر میزان تغییرات هر دو فاکتور مورد سنجش بیان ژن تمایز میلوئید ۸۸ و سطوح سرمی TNF-α را نشان داد.

بحث و نتیجه‌گیری: درنتیجه، تمرین تناوبی شدید و مقاومتی فزاینده از طریق فعال کردن مسیر و سازوکارهای سلولی مولکولی موجب کاهش اثرات منفی ناشی از بیماری آسیب عضله قلب دیابتی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: تمرین تناوبی شدید، myd88، بافت قلب، دیابت، تمرین مقاومتی فزاینده، TNF-a.

مقدمه

ازدیاد میزان بیماران دیابتی در دو دهه اخیر و شیوع دو تا سه برابری مرگ و میرهای قلبی عروقی وابسته به آن چشم‌گیر است. همراه با بیماری دیابت تشخیص ضعیف‌تری از بیماری‌های عروق کرونری و سطوح کسر تزریقی بطن چپ را در بیماران نارسایی قلبی به همراه دارد. مفهوم «کاردیومایوپاتی دیابتی[1]» بحث برانگیز است و استراتژی خاصی برای جلوگیری یا درمان نارسایی‌های قلبی همراه با دیابت طراحی نشده است(۱, ۲). کاردیومیوپاتی دیابتی، توسط دامنه تغییرات سیستمیکی ایجاد می شود و از طریق فرایندهای چندگانه منجر به اختلالات عملکردی و ساختاری در قلب می‌شود. پاتوژنز

1. Diabetic Cardiomyopathy

کاردیومیوپاتی[1] پیچیده و چند عاملی می‌باشد و هر کدام به طور اتفاقی منجر به کاهش ظرفیت کاری قلب[2] و افزایش حساسیت‌پذیری به آسیب ایسکمی[3] می‌شود. اختلالات متابولیکی[4] از نشانه‌های کاردیومیوپاتی دیابتی هستند(۳, ٤). پیام‌رسانی ایمنی داخلی به وسیله گیرنده TLR4[5] و مولکول‌های آداپتور پایین دستی[6] MyD88[7] و سرتونین کیناز[8]، کیناز کمکی‌دهنده به اینترلوکین۱[9](IRAK-1) نقش مهمی در دفاع داخلی و التهاب بافتی ایفا می‌کند. قلب حداقل سه گیرنده در پیام‌رسانی TLR درگیر می‌کند: CD14، TLR2، TLR4. به خوبی نشان داده شده است که این گیرنده‌ها مسئول اختلال در انقباض قلبی در شرایط مختلف پاتولوژیکی هستند. اطلاعات کمی در مورد نقش پیام رسانی ایمنی ذاتی در آسیب‌های میوکاردی قلب شناخته شده است. چندین مطالعه اخیر نشان داده‌اند که سیستم ایمنی ذاتی قلبی به صورت پویا در پاسخ به آسیب‌های ایسکمیک تنظیم می‌شود(۵, ٦). تعریف امروزی کاردیومایوپاتی دیابتی شامل ناهنجاری‌های ساختاری و عملکردی عضله قلبی در بیماران دیابتی بدون بیماری عروق کرونری یا هایپرتنشن می‌باشد. واضح است این نوع کاردیومایوپاتی در بیماران دیابتی دارای ناراحتی‌های عروق کرونری و هایپرتنشن[10] نیز وجود دارد، ولی دسترسی جداگانه به این بخش از کاردیومایوپاتی دیابتی برای اختلال عملکرد کل بطن در این موارد دشوار است(۱). مطالعه‌ای نشان داده است که تمرین برون‌گرا نقش مهمی در فعالیت NF-Kβ[11] القا شده با TLR4 از طریق مسیر مستقلMyD88 و وابسته PBMC[12] در مردان جوان بازی می‌کند(۷).

انواع فعالیت‌های ورزشی منظم روش محافظتی و درمانی مناسبی برای بیماری‌های مزمن التهابی بیان شده است. زیرا آغازگر سازگاری در سیستم التهابی می‌باشد(۸). تمرین مسیرهای پیام‌رسان متفاوتی را فعال می‌کند که فعالیت چندین عوامل رونویسی را افزایش یا کاهش می‌دهد(۹). مسیر پایین‌دست TLR4، از طریق تعامل چندین پروتئین منجر به فعال شدن مسیرهای مستقل و یا وابسته به MyD88 می‌شود و به ترتیب سایتوکین‌های پیش‌التهابی را آزاد می‌کند(۱۰, ۱۱). اکثر مطالعات رابطه معکوسی را بین میزان آمادگی قلبی تنفسی و کاهش مارکرهای التهابی گزارش کرده‌اند و از آن جهت که بعضی از مطالعات به وجود رابطه بین TNF-α ، چربی‌ها و مقاومت انسولینی اشاره داشته‌اند، تمرینات HIIT[13] و مقاومتی فزاینده را در این مطالعه مد نظر قرار می‌دهیم(۱۲). فعالیت بدنی یا مداخله تمرینی باعث کاهش التهاب و بیان کمتر TLR4 می‌شود اما تاثیر آن برMyD88 به طور کامل مشخص نیست(۱۳). با توجه به ویژگی التهابی بودن مارکرهای TNF-α و MyD88 و پیش‌بینی بیماری‌های قلبی عروقی از روی این مقادیر و از طرف دیگر تأثیرات مثبت بیان شده ناشی از فعالیت‌های ورزشی بر مقادیر آن‌ها، به مطالعه اثر این تمرینات در رت‌های نر دیابتی پرداختیم. با توجه به ویژگی التهابی بودن دو فاکتور مورد بررسی و از طرف دیگر تأثیرات مثبت بیان‌شده ناشی از فعالیت ورزشی بر مقادیر آن‌ها، ضرورت مطالعه تأثیر یک دوره تمرین تناوبی شدید و مقاومتی فزاینده بر مقادیر MYD88 و TNF-α در رت‌های نر دیابتی احساس می‌شود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های پژوهش

تعداد ۷۲ سر رت نر ٦ هفته‌ای با وزن۱٦۰-۱٤۰گرم از مرکز پاستور ایران خریداری شد. رت‌ها به شش گروه ۱۲تایی شامل: گروه کنترل(C)، گروه دیابتی(D)، گروه دیابتی-تمرین تناوبی شدید(DIT)، گروه تمرین تناوبی شدید(HIT)، گروه دیابت-تمرین مقاومتی فزاینده(DRT) و گروه تمرین مقاومتی فزاینده(RT) تقسیم شدند. همه رت‌ها از شرایط محیطی (درجه هوا ۲۳–۲۵ درجه سانتی‌گراد) و رطوبت نسبی(۵۵ تا ٦۰ درصد) و سیکل شبانه‌روزی ۱۲ - ۱۲(ساعت روشنایی و تاریکی) یکسان برخوردار بودند. رت‌های گروه دیابتی جهت اعمال چاقی به مدت ٤ هفته تحت رژیم غذایی پر چرب که شامل ۲۲ درصد چربی، ٤۸ درصد کربوهیدرات و ۲۰ درصد پروتئین بود، قرار گرفتند. بدین ترتیب بعد از دو هفته رت‌ها دچار اضافه وزن (چاق) شدند. جهت ایجاد دیابت در هر دو گروه از استرپتوزوتوسین[14] به صورت تک دوز و به میزان ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به روش تزریق داخل صفاقی استفاده شد. ٤۸ ساعت بعد از تزریق، جهت اطمینان از

1. The Pathogenesis Of Cardiomyopathy
2. Cardiac Output
3. Ischemia
4. Metabolic Disorders
5. Toll like Receptor-4
6. Downstream Adapter Molecules
7. Myeloid 88 Gene Expression
8. Sertonin Kinase
9. Interleukin Auxiliary Kinase 1
10. Hypertension
11. Nuclear Factor Kappa B
12. Peripheral Blood Mononuclear Cells
13. High Intensity Interval Training
14. Streptozotocin

جدول ۱. برنامه تمرین تناوبی شدید

هفته	سرعت(m/min)	مدت(دقیقه)	استراحت(دقیقه)	نوبت	جلسه(در هفته)	شیب	شدت (vo2max)
۱	۱۸ – ۲۰	۱	۲	۱۰	۳	۲	٪ ۵۰-۶۰
۲	۲۲ – ۲٤	۱	۲	۱۰	۳	٤	۶۵-۷۵٪
۳	۲٤ – ۲۶	۱	۲	۱۰	۳	۶	۷۵-۸۵٪
٤	۲۶ – ۲۷	۱	۲	۱۰	۳	۸	٪ ۸۵-۹۰
۵	۲۷ – ۲۹	۱	۲	۱۰	۳	۱۰	۹۰-۱۰۰٪
۶	۲۹ – ۳۱	۱	۲	۱۰	۳	۱۰	۱۰۰-۱۱۰٪

جدول ۲. برنامه تمرینی مقاومتی فزاینده

آشنا سازی با نردبان مقاومتی و محیط آزمایشگاه	آزمون عملکردی	آغاز پروتکل و آزمون1RM	هفته ۱	هفته ۲	هفته ۳	هفته ٤	هفته ۵	هفته ۶	آزمون عملکردی	آزمون تحمل قند خون و تغییرات انسولین	نمونه گیری
			چهارصعود به ازای ۵۰-۷۵-۹۰-۱۰۰ ٪ بعنوان ظرفیت حمل بیشینه (در هر جلسه تمرین)								
			اضافه نمودن ۳۰ گرم درصورت صعود موفقیت آمیز (٪ ۳۰+۱۰۰/۶۰/۱۲۰/۱۵۰/۱۸۰ گرم)								
			بیشترین بار حمل شده در هر جلسه ملاک حمل بیشینه در آن جلسه تمرینی خواهد بود.								
نردبان با شیب ۸۵ درجه بطول ۱۱۰ سانتی متر ، ٤ تا ۹ صعود ، ۱ دقیقه استراحت بالای نردبان و سه جلسه در هفته پروتکل تمرین مقاومتی فزاینده طراحی گردیده است.											

ایجاد دیابت در رت‌ها، قطره‌های خون از ورید دمی اخذ و میزان قند خون توسط دستگاه گلوکومتر[1] تعیین شد. قند خون بالای ۲۵۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر به عنوان شاخص دیابتی شدن در نظر گرفته شد. تعداد نمونه‌ها با توجه به nآماری پژوهش به روش تصادفی تأیید گردیده است. ضمناً با توجه به نمونه‌های بیمار و امکان از بین رفتن آن‌ها تعداد با ۲+ تعیین گردید.

پروتکل تمرینی

در پژوهش حاضر برای کار با رت‌های آزمایشگاهی، از ضوابط اخلاقی نگه‌داری و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی کشور استرالیا استفاده شد. در تمامی مراحل کار، فرد پژوهشگر همواره این موارد را مورد نظر داشت. ضمناً این طرح در کمیته اخلاق پژوهشکده تربیت بدنی به شماره IR. SSRI. REC. 1397. 305 ثبت گردیده است.

برنامه تمرینی تناوبی شدید(HIIT)

آشناسازی رت‌ها با نوار گردان به مدت ۳ روز طول کشید. برنامه تمرینی برای گروه دیابت–تناوبی شدید به مدت ٦ هفته و به شرح جدول زیر بود. رت‌هایی که به هر دلیلی از دویدن امتناع می‌کردند توسط پژوهشگر جایگزین می‌شدند. شدت و بار کار با توجه به مقالات از ۵۰٪ حداکثر اکسیژن مصرفی آغاز و تا ۱۱۰٪ حداکثر اکسیژن مصرفی افزایش یافت (١٤). (جدول۱).

برنامه تمرینی مقاومتی فزاینده

در پروتکل تمرین مقاومتی جهت آشناسازی، موش‌های گروه مقاومتی به مدت ۳ جلسه در هفته تمرین کردند و بلافاصله پس از آن، وارد پروتکل تمرینی مخصوص خود شدند. در ابتدا و پایان تمرینات پیش‌آزمون1RM[2] (یک تکرار بیشینه) از حیوانات گرفته شد. یک تکرار در طول نردبان شامل ٢٦ پله یا ۱۳ گام در هر اندام است. به واسطه تمرین مقاومتی فزاینده، آزمودنی‌های گروه تمرین مقاومتی(RT) و دیابت تمرین مقاومتی (DRT)، وزنه‌ها را با توجه به جدول۲، حمل کردند. در پایان هفته ششم موش‌ها توسط زایلوزین–کتامین (۹۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم) بی‌هوش شدند. سپس بافت قلب جدا

1. Glucometer

2. One-Repetition Maximum

شده و پس از وزن کردن در مایع نیتروژن منجمد شده و در دمای ۸۰ – درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد(۱۵).

نمونه‌گیری و نگه‌داری نمونه‌ها

۲٤ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی ابتدا آزمودنی‌های گروه‌های کنترل، تمرین تناوبی شدید و مقاومتی فزاینده نمونه‌گیری شدند و ۲٤ ساعت بعد از آن آزمودنی‌های گروه‌های دیابت و گروه دیابت- تمرین تناوبی شدید و دیابت- تمرین مقاومتی فزاینده نمونه‌گیری شدند. در روند بی‌هوشی، به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدنشان ۱/۰ میلی‌گرم از مخلوط کتامین ـ زایلوزین[1] (۱۰ میلی‌گرم کتامین + ۱/۵ میلی‌گرم زایلوزین) تزریق شد. سپس با باز کردن قفسه سینه، برای اطمینان از کمترین آزار حیوان، به سرعت خون‌گیری از بطن چپ قلب انجام شد، سپس قلب آزمودنی‌ها جدا و وزن‌کشی شد.

سنجش میزان تغییرات بیان ژن‌ها

استخراج RNA[2]: اسید ریبونوکلئیک کل با استفاده از کیت ترایزول[3] ساخت کشور آلمان استخراج گردید. نمونه‌های ذخیره شده در فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد در هاون سرد ریخته و به کمک نیتروژن مایع کوبیده تا به حالت پودری درآیند. در مرحله بعدی به ویال‌های حاوی پودر نمونه های مورد بررسی ۵۰۰ میکرو لیتر از محلول کیت ترایزول اضافه شد. سپس ویال‌ها ۳۰ ثانیه با استفاده از دستگاه ورتکس و ۳۰ ثانیه با دستگاه هموژنایز با ۲۵۰۰ دور در دقیقه یکنواخت شدند. نمونه‌های استخراج شده جهت استفاده بعدی در دمای ۸۰- درجه قرار داده شدند.

تعیین کمی و کیفی مقدار اسید ریبونوکلئیک استخراج شده: به منظور بررسی کمیت و کیفیت اسید ریبونوکلئیک استخراج شده از دو روش UV اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد. اسید ریبونوکلئیک استخراج شده با استفاده از دستگاه NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer شرکت Thermo Scientific ساخت کشور آمریکا غلظت‌سنجی شد.

تیمار **اسید ریبونوکلئیک** با آنزیم DNase I: قبل از ساخت cDNA، جهت حذف آلودگی‌های احتمالی اسید ریبونوکلئیک با دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید ژنومی، اسید ریبونوکلئیک استخراج شده توسط آنزیم DNase1 شرکت فرمنتاز ساخت کشور آمریکا تیمار شد. بر اساس برنامه شرکت؛ مواد، مقادیر و زمان هر کدام از مراحل در جدول ۳ آمده است.

برای تأیید عدم خردشدگی اسید ریبونوکلئیک پس از تیمار با DNase1، مقدار ٤۰۰ نانوگرم از اسید ریبونوکلئیک‌های تیمار داده شده با آنزیم، بر روی ژل آگارز ۲ درصد جداسازی شدند و هم‌چنین جهت کمیت سنجی با روش UV اسپکتروفتومتری، نمونه‌ها توسط دستگاه Epoch micro-volume Spectrophotometer System شرکت بایوتک آمریکا و هم‌چنین اسپکتروفتومتر نانودراپ طیف‌سنجی شدند.

ساخت cDNA: برای ساخت cDNA، برای ژن مورد نظر یکسان‌سازی و نمونه‌ها بر اساس کم غلظت‌ترین RNA ها، رقیق‌سازی شدند به طوری که مقدار نهایی RNA در واکنش تقریباً ۸۸۰ نانوگرم بود. ساخت cDNA تک‌رشته‌ای با استفاده از کیت First Strand cDNA Synthesis (ساخت شرکت MXcell) و به این شرح انجام شد: مخلوط نمودن RNA(۸۸۰ نانوگرم) با یک میکرولیتر آغازگر Oilgo(dT) (مخلوط A) و حرارت دادن به مدت ۵ دقیقه در دمای ٦۵ درجه سانتی‌گراد. افزودن بافر واکنش (حاوی ۱۰ میلی‌مولار مخلوط dNTP) ٤ میکرولیتر، DTT (۸ میلی‌مولار): ۱ میکرولیتر آنزیم DiaStar RTase: ۱ مایکرولیتر به مخلوط A و نهایتاً تنظیم حجم با آب عاری از RNase تا حصول ۲۰ مایکرولیتر حجم نهایی. مخلوط حاصل به مدت ٦۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد، سپس به دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه جهت غیر فعال کردن آنزیم منتقل گردید. پس از اتمام واکنش، نمونه‌ها در دمای ۲۰-درجه نگه‌داری شدند.

طراحی آغازگرهای اختصاصی

بر اساس طول آغازگر، شاخص‌های طراحی آغازگر بین ۲۰ تا ۲۵ نوکلئوتید، نقطه ذوب آغازگر بین ۵۸ تا ٦۵ درجه سانتی‌گراد، درصد جایگاه سیتوزین به گوانین بین ٤۰ تا ٦۰ و طول قطعه قابل تکثیر بین ٦۰ تا ۱۵۰ نوکلئوتید در نظر گرفته شد. با رعایت این شرایط برای ژن‌ها، آغازگرهای رفت و برگشتی، به کمک نرم‌افزار (پرایمر ۳) و بر اساس توالی کدکننده ژن‌ها، آغازگرهای انتخابی طراحی، و جهت ساخت به شرکت سیناکلون ارجاع داده شدند (جدول ٤).

1. Ketamine - Xylosine
2. Ribonucleic Acid
3. Trisol

جدول ۳. برنامه حذف آلودگی ژنومی از RNA کل توسط آنزیم DNase1

مقدار (حجم کل ۱۱ میکرولیتر)	به ازای
RNA(اسید ریبونوکلئیک)	۱ میکرو گرم
10X reaction buffer with $MgCL_2$	۱ میکرولیتر
DNase1	۱ میکرولیتر
Diethyl Pyro carbonate(DEPC) in Water	To 10 µl
به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (دمای مورد نیاز برای فعالیت آنزیم DNase1)	
EDTA 50 Mm	۱ میکرولیتر
به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٦٥ درجه سانتی گراد(دمای بالا برای غیر فعال کردن آنزیم)	

جدول ٤- طراحی پرایمرهای ژن مورد نظر

نام ژن	Accesseion No.	Primers	Sequence from 5' to 3'	TM (oC)	Amplicon size (bp)
MYLOID DIFFERENTIATION PRIMARY RESPONSE 88 (*MYD88*)	NM_198130	Forward	actatcggcttaaattgtgtgtgtc	59.88	147
		Reverse	agtcacattccttactttgcaggta	60.22	
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	NM_017008	Forward	aactcccattcttccacctttgat	60.2	94
		Reverse	agccatattcattgtcataccagga	59.93	

آنالیز و واکنش QRT-PCR: برای کمیت‌سنجی بیان ژن از آزمون QRT-PCR به صورت Relative استفاده شد. پس از اندازه‌گیری میزان Ct، برای ژن‌های مورد مطالعه نمونه‌های منتخب، کارایی PCR با استفاده از نرم‌افزار LinRegPCR (Ruijter et al –2009) تعیین شد. سپس با استفاده از برنامه اکسل میزان نسبت بیان (FC) بر مبنای فرمول فافل[1] محاسبه گردید.

$$FC = Ratio = \frac{(E_{ref})^{Ct\,sample}}{(E_{target})^{Ct\,sample}} \div \frac{(E_{ref})^{Ct\,calibrator}}{(E_{target})^{Ct\,calibrator}}$$

روش آماری

از آمار توصیفی برای دسته‌بندی داده‌های خام و تنظیم جدول‌ها، از برنامه‌های مایکروسافت اکسل[2] ویرایش ۲۰۱۰، MSTATC ویرایش ۲۰۱۸، SPSS ویرایش ۲٤ و نرم‌افزار پریزم۸[3] برای تنظیم نمودارها و انجام محاسبات استفاده شد. پس از بدست آمدن میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه، جهت بررسی صحت فرض‌های تجزیه و واریانس، آزمون نرمال بودن توزیع خطاهای آزمایشی با استفاده از نرم‌افزار MSTATC و آزمون بارتلت برای بررسی فرض یک‌نواختی واریانس‌ها انجام شدند. از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ برای محاسبه میزان افزایش یا کاهش بیان ژن هدف در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل استفاده شد. از آزمون فیشر[4](F-test) و M-ANOVA با سطح معنی‌داری (p≤۰/۰۱) برای تعیین معنی‌داری استفاده شد.

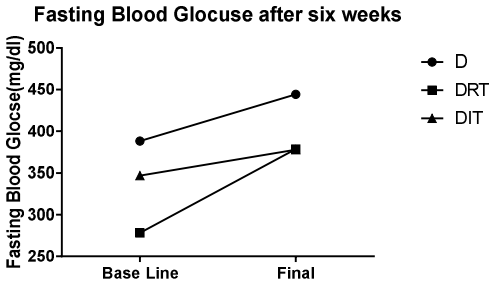
نتایج

میزان تغییرات قند خون ناشتایی

با بررسی میانگین تغییرات قندخون ناشتایی در سه گروه دیابت، دیابت-تناوبی شدید و دیابت-مقاومتی فزاینده در دو نوبت هفته دوم پژوهش پس از تزریق داروی STZ و در هفته پایانی پژوهش که شامل: هفته اول: آشناسازی با محیط نگه‌داری، هفته دوم: القای‌دیابت، هفته سوم: آشناسازی با برنامه تمرینی و ٦ هفته تمرین اصلی، شاهد افزایش قند خون ناشتا بودیم که نشان‌دهنده القای‌دیابت در گروه‌های ذکر شده است.

1. Pfaffl
2. Microsoft Office Excel 2010
3 .Graph Prism 8

4. Fisher

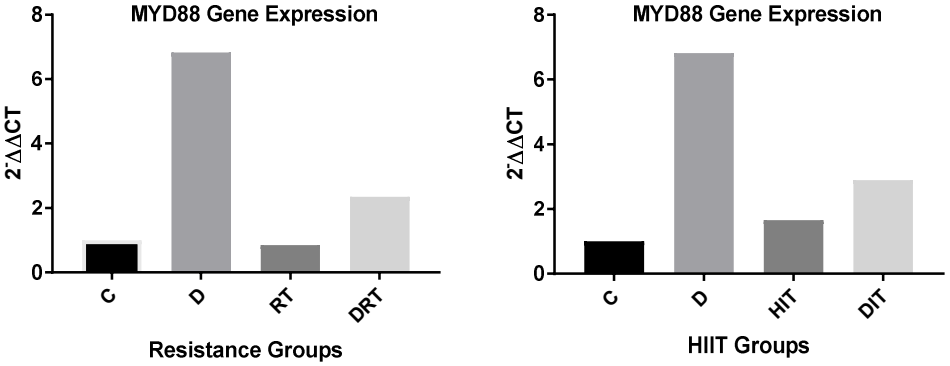


نمودار۱- تغییرات قند خون ناشتایی گروه‌های دیابت، دیابت تمرین مقاومتی فزاینده و دیابت تمرین تناوبی شدید

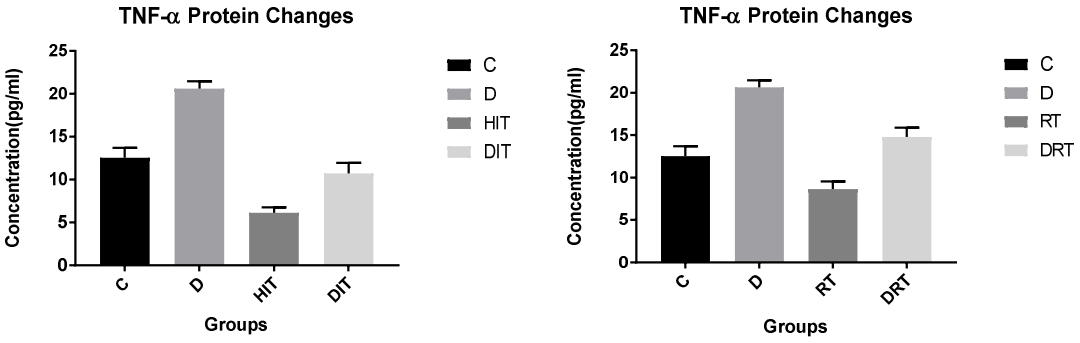
گروه‌های دیابت و دیابت تمرین مقاومتی فزاینده، (p=۰/۰۰۱) کاهش چشم‌گیر و معنادار در بیان ژن *MyD88* در گروه دیابت- تمرین مقاومتی نسبت به گروه دیابت مشاهده شد. هم‌چنین بین گروه‌های دیابت و دیابت تمرین تناوبی شدید، (p=۰/۰۰۱) نیز کاهش چشم‌گیر و معنادار بیان ژن *MyD88* در گروه دیابت- تمرین تناوبی شدید نسبت به گروه دیابت وجود داشت.

میزان بیان ژن *myd88*

با توجه به نتایج بدست آمده و براساس تفاوت میانگین بین



نمودار۲- تغییرات بیان ژن myd88 (در نمودار گروه گنترل C، گروه دیابت D، گروه تمرین مقاومتی فزاینده‌RT، گروه دیابت-تمرین مقاومتی فزاینده‌DRT، گروه تمرین تناوبی شدید HIT، گروه دیابت-تمرین تناوبی شدیدDIT با علامت‌های اختصاری مشخص شده است و معنی‌داری با علامت دایره ● مشخص شده است).



نمودار۳- تغییرات سرمی TNF-α (در نمودار گروه گنترل C، گروه دیابت D، گروه تمرین مقاومتی فزاینده‌RT، گروه دیابت-تمرین مقاومتی فزاینده‌DRT، گروه تمرین تناوبی شدید HIT، گروه دیابت-تمرین تناوبی شدیدDIT با علامت‌های اختصاری مشخص شده است و سطح معنی‌داری گروه دیابت-تمرین مقاومتی فزاینده و دیابت- تمرین تناوبی شدید با علامت دایره ● و گروه دیابت با علامت ▲ نسبت به گروه‌های تمرین مقاومتی فزاینده و تناوبی شدید مشخص شده است).

میزان سرمی TNF-α

میزان تغییرات سرمی TNF-a بر اساس تفاوت میانگین‌های محاسبه شده بین گروه‌های دیابت و دیابت تمرین مقاومتی فزاینده (p=۰/۰۰۲) و گروه‌های تمرین مقاومتی فزاینده و دیابت تمرین مقاومتی فزاینده، (p=۰/۰۰۱) معنادار و با افزایش TNF-α در دو گروه دیابت و دیابت- تمرین مقاومتی همراه می‌باشد.

هم‌چنین بین گروه‌های دیابت و دیابت تمرین تناوبی شدید (p=۰/۰۰۱) و گروه‌های تمرین تناوبی شدید و دیابت تمرین تناوبی شدید، (p=۰/۰۰۳) نتایج به دست آمده نشان‌دهنده افزایش چشم‌گیر تغییرات سرمی TNF-α در گروه‌های دیابت و دیابت تمرین تناوبی شدید نسبت به گروه تمرین تناوبی شدید می‌باشد و در گروه‌های دیابت- تمرین مقاومتی فزاینده و دیابت- تمرین تناوبی شدید کاهش چشم‌گیری نسبت به گروه دیابت مشاهده شد.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر به منظور تعیین تغییرات در بیان ژن *MYD88* و TNF-αعضله قلبی رت‌های دیابتی نر متعاقب تمرین تناوبی شدید و تمرین مقاومتی فزاینده به اجرا درآمد. این پژوهش نشان داد که افزایش معنی‌دار میزان بیان ژن *MYD88* سطوح سرمی TNF-αمتعاقب تمرین تناوبی شدید و تمرین مقاومتی فزاینده در عضله قلبی رت‌های نر گروه‌های DIT و DRT مشاهده می شود. با توجه به داده‌های بدست آمده، گروه دیابت-تناوبی شدید نسبت به گروه دیابت و کنترل کاهش چشم‌گیر و معناداری را در تغییرات سرمی TNF-α داشته است که این می‌تواند تأثیر انجام تمرین تناوبی شدید و تمرین مقاومتی فزاینده بر رت‌های دیابتی شده را نشان دهد. این پژوهش هم‌چنین پس از بررسی و مقایسه گروه‌های آزمودنی جهت بررسی تغییرات بیان ژن *MYD88* اثبات نمود که گروه دیابت-تمرین مقاومتی فزاینده(DRT) و دیابت- تمرین تناوبی شدید(DIT) نسبت به گروه دیابت کاهش معناداری در میزان بیان این ژن داشته ست. با بررسی میانگین تغییرات قندخون در سه گروه دیابت، تناوبی شدید و دیابت-تناوبی شدید طی ۱۰ هفته، شاهد کاهش قند خون در گروه دیابت-تناوبی شدید نسبت به گروه دیابت بودیم که نشان دهنده اثر ورزش بر کاهش قند خون و بیانگر اهمیت نقش آن، تاثیرات و سازگاری بیان ژن‌های مرتبط با مرگ برنامه‌ریزی سلول و آسیب عضله قلب است. درک مکانیسم‌های مولکولی توسعه‌دهنده اختلال قلبی و نارسایی قلبی به منظور هدف‌های درمانی مهم می‌باشد. بیماران با سندروم متابولیک، مقادیر بالاتری از میانجی‌گرهای التهابی را در گردش خون و بافت نشان می‌دهند و این نشانگرها به طور جدی، با عدم نرمال بودن قلب در این آزمودنی‌ها مرتبط می‌باشند. رابلر و همکاران[1] بیان کردند کاردیومیوپاتی دیابتی توسط اثر مستقیم دیابت بر ساختار و عملکرد قلب در فقدان بیماری سرخرگ کرونر، پرفشارخونی یا پاتولوژی‌های قلبی دیگر تشخیص داده می‌شود(۵). چندین مکانیسم مولکولی می‌توانند درگیر در التهاب عضله قلبی در تنظیم دیابت باشند به طور کل این مکانیسم‌ها بسوی مسیر التهابی NF κB سوق می‌یابند(۱۶). دیابت وابسته به اختلالات متابولیکی می‌تواند به طور مستقیم موجب بیان سایتوکاین و رهایی آن‌ها از سلول‌های قلبی شود. قبلاً نشان داده شده است که هایپر گلیسمی، بیان گروه با تحرک زیاد[2] (HMGB1[3]) در سلول‌های عضله قلبی، ماکروفاژها و فیروبلاست‌های قلبی را به شدت افزایش داده و از این‌رو مسیر MAPK و NF κB فعال شده و موجب ترشح α - TNF می‌شود(٤). مقادیر گلوکز بالا نیز موجب بیان سایتوکاین در سلول عضله قلبی از طریق فعال شدن مسیر JNK[4]/NFKβ می‌شود(٤). دیابت هم‌چنین به نظر می‌رسد بیان سایتوکاین‌ها، کموکاین‌ها و مولکول‌های چسبنده در قلب را از طریق فعال شدن GSK - 3β[5] افزایش می‌دهد. مهار کیناز، التهاب قلب، آسیب نیتروساتیو و فیبروز در موش‌ها با دیابت نوع دوم را کاهش می‌دهد(۱۷). افزایش لیپید در گردش نیز می‌تواند در التهاب قلب در دیابت سهیم باشد. اسیدهای چرب، TLR4 را فعال می‌کنند که به طور قوی التهاب را از طریق مسیر NF-kβ از طریق فعال‌سازی *Myd88* توسعه می‌بخشد(١٤). موش‌ها با حذف ژن *Myd88*، بهبود عملکرد قلب را در پاسخ به دیابت ناشی از استرپتوزوتوسین نشان داده‌اند که نتایج همسو با پژوهش حاضر می‌باشد(١٤). در حمایت از نقش *MyD88* به عنوان یک مبدل ضد آپوپتوزی، یافته‌های اخیر نشان می‌دهد که بیان بیش از حد میانجی آدنویروس IRAK-1 که یک کیناز مسئول شده به وسیله *MyD88* در طول فعال‌سازی TLR4 است، اثر ضد آپوپتوزی در

1. Rubler et al
2. High Mobility Group Box1
3. High Mobility Group Box 1 Protein
4. NH2-Terminal Kinase
5. Glycogen Synthase Kinase 3 Beta

کاردیومیوسیت‌های جدا شده موش صحرایی القا می‌کند(۵).اسیدهای چرب موجب فعال شدن NF-kβ و متعاقباً TNF- α می‌شود که می‌تواند توسط PPAR - β/[1] delta معکوس شود. مطالعات پیشین نشان داده اند که هایپرگلیسمیا و مقادیر بالای لیپید در گردش، التهاب را از طریق فعال کردن پروتئین کیناز c (PKC) ارتقا می‌بخشد که مسیر MAPK[2] را فعال می‌کند؛ بنابراین IKB[3] را غیرفعال می‌کند(۱۲). اختلال میتوکندریایی نیز شرکت‌کننده قوی دیگر در تولید ROS و التهاب عضله قلبی در کاردیو میوپاتی می‌باشد. اختلال میتوکندریایی تغییرات فراوانی در قلب دیابتی در توسعه غیر نرمال قلب و اختلال آن دارد(۱۶). احتمالاً یکی از دلایل افزایش معنادار بیان *MyD88* در گروه دیابتی به دلیل افزایش تولیدات سوپر اکسید باشد. از سویی دیگر پس از پایان برنامه تمرینی، تمرین تناوبی شدید و مقاومتی فزاینده باعث کاهش معنادار بیان ژن *MyD88* در هر دو گروه دیابتی و غیر دیابتی شده است. اکثر مطالعات به بررسی اثر تمرین حاد پرداخته‌اند اما آنچه قابل توجه است، نشان‌دهنده آن می‌باشد که استفاده از برنامه‌های تمرینی طولانی‌مدت بالای ۹۰ دقیقه پاسخ بهتری داشته است(۵، ۱۹). علاوه بر کاهش بیان گیرنده‌های شبه تول سطحی سلول، شواهد اخیر به تنظیم ژن‌های بالادستی درگیر در تنظیم منفی پیام‌رسان گیرنده‌های شبه تول در خون به دنبال یک جلسه تلاش تمرینی نیز اشاره کرده‌اند(۱۸). احتمالاً بخشی از کاهش بیان و پیام‌رسان *MyD88* ناشی از تمرین، می‌تواند به التهاب ایجاد شده متعاقب دیابت نوع ۲ ربط داشته باشد. پرقندی خون، *MyD88* را در بافت قلب و مونوسیت‌ها[4] افزایش می‌دهد و هر دو باعث افزایش مقاومت انسولینی می‌شوند. ما دریافتیم مقدار گلوکز خون و مقاومت به انسولین در پایان تمرین در گروه دیابتی با تمرین کاهش معناداری یافته است که احتمالاً کاهش پرقندی خون و مقاومت به انسولین خود از محرک‌های کاهش بیان *MyD88* در اثر تمرین تناوبی شدید و مقاومتی فزاینده هستند(۱۹). بر مبنای نتایج بدست آمده از پژوهش، تمرین تناوبی و مقاومتی فزاینده به نوعی از طریق فعال کردن مسیر و سازوکارهای سلولی و مولکولی مختلف موجب کاهش چشمگیر اثرات منفی ناشی از بیماری دیابت بر دستگاه قلبی-عروق می‌شود. از جمله این سازوکارها کاهش معنادار سطوح سرمی TNF- α و متعاقب آن کاهش *MyD88* به عنوان یک سازوکار حفاظتی است که موجب کاهش بیان عوامل التهابی و آپوپتوزی ایجاد شده در اثر پرقندی خون ناشی از دیابت می‌شود. پیام مقاله حاضر این است که کاهش *MyD88* به عنوان یک عامل التهابی از یک‌سو و کاهش ا تغییرات سرمی TNF-α به عنوان یک عامل محافظتی از سویی دیگر متعاقب تمرین در شرایط فشار سوخت‌وسازی، اکسایشی و التهابی دیابت می‌تواند موجب کاهش اثرات تخریبی این بیماری و جلوگیری از کاهش عملکرد ساختاری و سلولی عضله قلب شود.

تشکر و قدردانی

پژوهشگران بر خود می‌دانند تا از معاونت علمی- پژوهشی دانشگاه خوارزمی بدلیل حمایتهای مالی، آزمایشگاه سلولی-مولکولی دانشگاه خوارزمی و آزمایشگاه سلولی-مولکولی دانشکده گیاه‌شناسی دانشگاه شهید بهشتی و همه عزیزانی که در این طرح تحقیقاتی شرکت کردند قدردانی و سپاس‌گزاری کنند.

1. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor B/Delta
2. Mitogen-Activated Protein Kinase
3. Nuclear factor of kappa light Polypeptide Gene Enhancer In B-Cells Inhibitor
4 .Monocytes

منابع

1. Goyal BR, Mehta AA. Diabetic cardiomyopathy: pathophysiological mechanisms and cardiac dysfuntion. Human & experimental toxicology. 2013 Jun; 32(6):571-90. PubMed PMID: 23174745.
2. Hall g. medical physiology. Tehran. 2011.
3. Hafstad AD, Boardman N, Aasum E. How exercise may amend metabolic disturbances in diabetic cardiomyopathy. Antioxidants & redox signaling. 2015 Jun 10; 22(17):1587-605. PubMed PMID: 25738326. Pubmed Central PMCID: 4449627.
4. Aronson D, Edelman ER. Coronary artery disease and diabetes mellitus. Heart failure clinics. 2016; 12(1):117-33.
5. Zhu X, Zhao H, Graveline AR, Buys ES, Schmidt U, Bloch KD, et al. MyD88 and NOS2 are essential for toll-like receptor 4-mediated survival effect in cardiomyocytes. American journal of physiology. Heart and circulatory physiology. 2006 Oct; 291(4):H1900-9. PubMed PMID: 16648192.
6. Koo JH, Jang YC, Hwang DJ, Um HS, Lee NH, Jung JH, et al. Treadmill exercise produces neuroprotective effects in a murine model of Parkinson's disease by regulating the TLR/۲MyD88/NF-kappaB signaling pathway. Neuroscience. 2017 Jul 25; 356:102-13. PubMed PMID: 28527958.
7. Fernandez-Gonzalo R, De Paz JA, Rodriguez-Miguelez P, Cuevas MJ, Gonzalez-Gallego J. Effects of eccentric exercise on toll-like receptor 4 signaling pathway in peripheral blood mononuclear cells. Journal of applied physiology. 2012 Jun; 112(12):2011-8. PubMed PMID: 22461445.
8. Arikawa AY, Thomas W, Schmitz KH, Kurzer MS. Sixteen weeks of exercise reduces C-reactive protein levels in young women. Medicine and science in sports and exercise. 2011 Jun; 43(6):1002-9. PubMed PMID: 21085036.
9. Into T, Inomata M, Takayama E, Takigawa T. Autophagy in regulation of Toll-like receptor signaling. Cellular signalling. 2012 Jun; 24(6):1150-62. PubMed PMID: 22333395.
10. Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. Cytokine. 2008 May;42(2):145-51. PubMed PMID: 18304834.
11. Mazur-Bialy AI, Pochec E, Zarawski M. Anti-Inflammatory Properties of Irisin, Mediator of Physical Activity, Are Connected with TLR4/MyD88 Signaling Pathway Activation. International journal of molecular sciences. 2017 Mar 25;18(4). PubMed PMID: 28346354. Pubmed Central PMCID: 5412287.
12. Vepsalainen T, Soinio M, Marniemi J, Lehto S, Juutilainen A, Laakso M, et al. Physical activity, high-sensitivity C-reactive protein, and total and cardiovascular disease mortality in type 2 diabetes. Diabetes care. 2011 Jul; 34(7):1492-6. PubMed PMID: 21602429. Pubmed Central PMCID: 3120189.
13. Flynn MG, McFarlin BK, Markofski MM. The Anti-Inflammatory Actions of Exercise Training. American journal of lifestyle medicine. 2007 May; 1(3):220-35. PubMed PMID: 25431545. Pubmed Central PMCID: 4243532.
14. Francois ME, Little JP. Effectiveness and Safety of High-Intensity Interval Training in Patients with Type 2 Diabetes. Diabetes Spectrum. 2015; 28(1):39-44.
15. Fayazmilani R, Gaeini AA, Javeri A. Progressive Resistance Training Modulates the Expression of ACTN2 and ACTN3 Genes and Proteins in the Skeletal Muscles. American Journal of Sports Science and Medicine. 2016; 4(2):26-32.
16. Jang JH, Shin HW, Lee JM, Lee HW, Kim EC, Park SH. An Overview of Pathogen Recognition Receptors for Innate Immunity in Dental Pulp. Mediators of inflammation. 2015; 2015:794143. PubMed PMID: 26576076. Pubmed Central PMCID: 4630409.
17. Wang H, Bei Y, Lu Y, Sun W, Liu Q, Wang Y, et al. Exercise Prevents Cardiac Injury and Improves Mitochondrial Biogenesis in Advanced Diabetic Cardiomyopathy with PGC-1alpha and Akt Activation. Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology. 2015; 35(6):2159-68. PubMed PMID: 25896313.
18. Abbasi A, Hauth M, Walter M, Hudemann J, Wank V, Niess AM, et al. Exhaustive exercise modifies different gene expression profiles and pathways in LPS-stimulated and un-stimulated whole blood cultures. Brain, behavior, and immunity. 2014; 39:130-41.
19. Dasu MR, Devaraj S, Park S, Jialal I. Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects. Diabetes care. 2010; 33(4):861-8.

The effect of high intensity interval training and progressive resistance training on MYD-88 myocardia gene expression and TNF-α serum levels in diabetic rats

Mahshid Aghili[1], Neda Khaledi[2], Hamid Rajabi [3], Hossein Askari [4]*

1. PhD Sports Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, Kharazmi University of Tehran, Tehran, Iran
2. Assistant Professor, Department of Sports Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, Kharazmi University, Tehran, Tehran, Iran
3. Professor of Department of Sports Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, Kharazmi University, Tehran, Tehran, Iran
4. Assistant Professor, Faculty of Biological Sciences and Technology, Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University of Tehran, Tehran, Iran

Received: 2019/07/14 **Revised:** 2019/11/01 **Accepted:** 2020/01/31

∗Correspondence Email:

n.khaledi@khu.ac.ir

Abstract

Introduction: Diabetes mellitus is a metabolic abnormality associated with neuropathy, kidney complications, coronary artery disease and peripheral arteries, arteriosclerosis, hypertension and systemic inflammation. The use of high intensity interval training and progressive resistance training to treat metabolic disorders such as diabetes which blood glucose and insulin tolerance has an important role in reducing its side effects, is common among people. the aim of this study was to investigate the effect of high intensity interval training and progressive resistance training on differentiation of myeloid 88 gene expression and serum levels of TNF-α.

Methods: 72 Rats (6 weeks old) weighing 150 g were randomly divided into six groups of 12 consist of: Control group(C), Diabetes group (D), Diabetes –High Intensity Interval Training (DIT) and High intensity Interval Training (HIIT), Diabetes – progressive resistance training(DRT), resistance training(RT) groups. Six weeks of High Intensity Interval and progressive resistance training were done 3 days a week. Gene expression was performed using the Real-Time PCR technique and the calculation of the changes using the 2-ΔΔCT method. Serum levels of TNF-α were measured by ELISA method. The data were analyzed by Fisher and M-ANOVA tests at a significant level of p≤0/01.

Results: The findings of the present study showed a significant increase in both factors of myeloid 88 gene expression and serum levels of TNF-α.

Conclusion: As a result, High Intensity Interval training and progressive resistance training reduced the negative effects of diabetic cardiomyopathy by activating the pathway and different molecular cell mechanisms dramatically.

Key Words: Diabetes, progressive resistance training, High Intensity Interval Training, TNF-a, *MYD88*.