Sport and Biomotor Sciences
ورزش و علوم زیست حرکتی

تأثیر ٦ هفته پیش‌آماده‌سازی ورزش مقاومتی بر پویایی میتوکندریایی در بافت قلب رت‌های دیابتی

صغری سجودی [۱]، مقصود پیری [۲*]، پروین فرزانگی [۳]، مریم دلفان [۴]

۱-دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی

۲-استاد، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی

۳- استادیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری

٤- استادیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه الزهرا

* *نشانی نویسنده مسئول: تهران، سوهانک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی تلفن: ۰۲۱۲۲٤۸۱٦۲۱
Email: m.peeri@iauctb.ac.ir

وصول: ۱۳۹۸/۱۱/۱۷ اصلاح: ۱۳۹۹/۴/۵ پذیرش: ۱۳۹۹/۶/۲۵

چکیده

مقدمه و هدف: کاردیومیوپاتی دیابتی به تغییرات قلب در نتیجه اختلال هوموستاز گلوکز اشاره دارد که منجر به اختلال عملکرد بطن می‌شود و با نقص عملکرد میتوکندریایی همراه است. از آنجایی که فعالیت ورزشی به عنوان محافظت‌کننده قلب شناخته می‌شود، هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر ٦ هفته پیش‌آماده‌سازی ورزش مقاومتی بر فرایندهای همجوشی و شکافت میتوکندریایی در بافت قلب رت‌های دیابتی نوع ۲ بود.

روش‌شناسی: ۱۸ سر رت نر ویستار به روش تصادفی به ۳ گروه تقسیم شدند: گروه دیابت (تعداد = ٦)، گروه دیابت + ورزش (تعداد = ٦) و گروه کنترل (تعداد = ٦)؛ گروه ورزش به مدت ٦ هفته و ۵ جلسه در هفته تمرین مقاومتی (حمل وزنه با ٤۰ الی ۱٦۰ درصد وزن بدن روی نردبان) را اجرا کردند. برای القای دیابت نوع ۲، رژیم غذایی پرچرب همزمان با شروع برنامه تمرینی اعمال گردید و تا انتهای مطالعه ادامه یافت، و ٤۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، تزریق STZ به صورت داخل صفاقی با دوز ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن صورت پذیرفت. ۷ روز بعد از تزریق STZ کلیه رت‌ها تشریح شدند و بافت بطن چپ قلب آنها استخراج شد. برای اندازه‌گیری میزان بیان mRNA ژن‌های MFN-2، OPA-1 و Drp-1 از روش Real time – PCR استفاده شد. همچنین، تحلیل آماری با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یکراهه در سطح معنی‌داری $p \leq ۰/۰۵$ انجام شد.

یافته‌ها: کاهش میزان بیان ژن‌های MFN-2 و OPA-1 و افزایش میزان بیان mRNA ژن Drp-1 در حیوانات گروه دیابت در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد ($p \leq ۰/۰۰۱$). همچنین، رت‌های دیابتی تمرین‌کرده در مقایسه با گروه دیابت میزان بیان ژن‌های MFN-2 و OPA-1 بالاتر ($p \leq ۰/۰۰۱$) و میزان بیان mRNA ژن Drp-1 پایین‌تری ($p \leq ۰/۰۱$) را نشان دادند.

بحث و نتیجه‌گیری: ه نظر می‌رسد که ٦ هفته پیش‌آماده‌سازی تمرین مقاومتی با تنظیم مثبت پروتئین‌های درگیر در همجوشی میتوکندریایی و تنظیم منفی شکافت میتوکندریایی افزایش‌یافته در بافت قلب می‌تواند خطر ابتلا به کاردیومیوپاتی دیابتی را کاهش دهد.

واژه‌های کلیدی: کاردیومیوپاتی دیابتی، پیش‌آماده‌سازی ورزش مقاومتی، MFN-2؛ OPA-1 و Drp-1

مقدمه

کاردیومیوپاتی دیابتی یا بیماری عضله قلب دیابتی شامل تغییرات ساختاری و مولکولی در بافت میوکارد است که خطر ابتلا به نارسایی قلب را به تنهایی یا در ترکیب با تغییرات در رفتارهای عروقی و همودینامیک موضعی (بیماری قلبی کرونری) یا سیستمیک (پرفشاری خون) افزایش می‌دهد (۱). کاردیومیوپاتی دیابتی به عنوان اختلال در عملکرد سیستول و دیاستول و همچنین، هایپرتروفی بطن چپ تظاهر می‌یابد که به موجب آن احتمال نارسایی قلب افزایش می‌یابد (۲). علاوه بر تغییرات ساختاری که موجب اختلال در انقباض سلول‌های

عضله قلب می‌شود، نقص عملکرد میتوکندریایی نیز سبب تضعیف انقباض می‌گردد که در نهایت منجر به کاردیومیوپاتی دیابتی می‌شود (۳). از آنجایی که میتوکندری‌ها منبع اصلی آدنوزین تری فسفات برای رفع نیازهای سوخت و سازی قلب هستند، نشان داده شده است که اختلال در عملکرد میتوکندری، عامل اصلی اختلالات سوخت و سازی و بیماری‌های قلبی مرتبط با مقاومت به انسولین می‌باشد (۲). از این رو، در حال حاضر بسیاری از مطالعات اختلال عملکرد میتوکندریایی را به عنوان یک عامل سببی در اختلالات متابولیکی و بیماری‌های قلبی مرتبط با مقاومت به انسولین در نظر می‌گیرند (٤).

در سلول‌های پستانداران، میتوکندری‌ها اندام‌های پویایی هستند که به طور مداوم مورفولوژی خود را از طریق فرایندهای همجوشی و شکافت در پاسخ به شرایط درون سلولی تغییر می‌دهند و تغییر در تعادل این فرایندها در وقایع مختلف بیولوژیکی سلولی دخیل است (۵). این رخدادها فرآیندهای کلیدی مرتبط با کنترل کیفیت میتوکندری، بازسازی میتوکندری و هومئوستاز میتوکندری در سلول‌های عضله قلب بالغ بشمار می‌روند (٦). همچنین، مطالعات اخیر پویایی میتوکندریایی را با تعادل بین نیازهای انرژی و موجودی مواد مغذی مرتبط دانسته‌اند؛ این امر نشان می دهد که تغییرات در مورفولوژی میتوکندریایی می‌تواند به عنوان سازوکار سازگاری انرژی با تغییر ضرورت‌های متابولیکی قلب عمل نماید. در واقع، تغییرات در ساختار و عملکرد میتوکندری‌ها با بیماری‌های قلبی–عروقی از جمله کاردیومیوپاتی دیابتی در ارتباط است (۷). تنظیم‌کننده‌های اصلی همجوشی میتوکندریایی عبارتند از: پروتئین‌های تخصص‌یافته میتوفیوزین‌های GTPآز مرتبط با دینامین (MFN-1 و MFN-2) که روی غشای بیرونی میتوکندری قرار گرفته‌اند و پروتئین آتروفی بصری ۱ (OPA-1) که روی غشای داخلی میتوکندری قرار می‌گیرد (۸). همچنین، پروتئین مرتبط با دینامین GTPآز سیتوپلاسمی ۱ (Drp-1)، پروتئین مهمی است که فرایند شکافت میتوکندریایی را میانجی‌گری می‌کند (۸). مطالعات در سلول‌های غیر قلبی نشان داده که بیان کم پروتئین‌های همجوشی با قطعه قطعه شدن شبکه‌های میتوکندریایی همراه است (۹). موش‌های فاقد Mfn1/Mfn2 سلول‌های عضله قلب، قطعه قطعه شدن شبکه میتوکندری را توسعه دادند که به کاردیومیوپاتی گسترده پیشرفت کرد (٤). این یافته‌ها علاوه بر تأکید بر اهمیت پویایی میتوکندریایی در حفظ یک شبکه طبیعی، نشان می‌دهند که پویایی میتوکندریایی یک فرایند پیچیده در قلب بالغ است و ممکن است ساختار و عملکرد قلب را دستخوش تغییر سازد. نشان داده شده است که هایپرگلیسمی با افزایش شکافت میتوکندریایی میانجی‌گری‌شده با Drp-1 باعث اختلال در عملکرد میتوکندری شده و سرانجام مرگ سلولی در بافت را موجب می‌شود (۱۰, ۱۱).

به غیر از رژیم غذایی و دارو، ورزش یکی از سه روش اصلی تجویزی برای پیشگیری و/یا مقابله با دیابت می‌باشد. ورزش از مهمترین عوامل کمک‌کننده است که نقش اساسی در کنترل عوارض متابولیکی دیابت نوع ۲ را دارد. ورزش حساسیت به انسولین را بهبود می‌بخشد و گلوکز خون را کنترل می‌کند و نیاز به مصرف داروهای خوراکی و انسولین را کاهش می‌دهد (۱۲). سازوکارهای سلولی اصلی مسئول تداوم حساسیت به انسولین در ورزش به طور دقیق مشخص نشده است ولی ممکن است بیش از یک عامل در این سازگاری‌ها دخیل باشد. ورزش، مزایای قلبی-عروقی فراوانی در شرایط دیابت دارد که یا به طور مستقیم به وسیله تعدیل مولکول‌های میوکارد و یا به طور غیرمستقیم از طریق کاهش هایپرگلیسمی موجب می‌شود (۱۳). با این حال، مطالعات بسیار کمی وجود دارد که مزایای مستقیم ورزش بر کاردیومیوپاتی دیابتی را مستقل از وضعیت هایپرگلیسمی در طی دیابت مطالعه نموده باشند. اخیراً ورانکی و همکاران (۲۰۱٦) بهبود در سطوح ATP بافت عضله قلب و کاهش فیبروز قلبی را از طریق افزایش پروتئین‌های درگیر در همجوشی میتوکندریایی به دنبال تمرین ورزشی روی تردمیل گزارش نموده‌اند (١٤). از سوی دیگر، تمرین مقاومتی به عنوان یک مداخله امیدوارکننده برای حفظ ظرفیت اکسیداتیو میتوکندری عضله (۱۵) و بهبود فنوتیپ کلی سوخت و سازی افراد مبتلا به دیابت نوع ۲ شناخته شده است (۱۳, ١٦). با این حال، بر اساس جستجوهای ما، تاکنون سازگاری‌های احتمالی پروتئین‌های درگیر در همجوشی و شکافت میتوکندریایی میوکارد به دنبال تمرینات مقاومتی مورد مطالعه قرار نگرفته است. بعلاوه، اطلاعاتی در زمینه نقش پیشگیرانه ورزش در پویایی میتوکندریایی برای مقابله با اثرات القای دیابت و کاردیومیوپاتی دیابتی در دسترس نیست. بنابراین، مطالعه حاضر به دنبال آن است که آیا ٦ هفته پیش‌آماده‌سازی ورزش مقاومتی می‌تواند با تعدیل فرایندهای همجوشی و شکافت

میتوکندریایی، عوارض ناشی از القای دیابت و کاردیومیوپاتی دیابتی را در رت‌های نر ویستار کاهش دهد؟

روش شناسی

پژوهش حاضر از نوع تجربی است که به شیوه آزمایشگاهی انجام شد. آزمودنی‌های تحقیق حاضر تعداد ۱۸ سر رت نر بالغ نژاد ویستار ۸ هفته‌ای با میانگین وزنی ۲۰ ± ۲۲۰ گرم بودند که از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. رت‌ها در دمای محیطی ۳ ± ۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت حدود ٤٥ درصد و چرخه روشنایی/تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت نگهداری شدند، به طوری که در دسترسی به آب و غذای استاندارد، محدودیتی نداشته باشند. همه مراحل مربوط به کار با حیوانات با توجه به دستورالعمل اخلاقی معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی با شماره IR.IAU.TMU.REC.1399.063 انجام شد.بعد از یک هفته آشناسازی با محیط نگهداری، رت‌ها به روش تصادفی ساده به ۳ گروه تقسیم شدند: گروه دیابت (تعداد = ٦)، گروه دیابت + ورزش (تعداد = ٦) و گروه کنترل (تعداد = ٦)؛ گروه‌های ورزش به مدت ٦ هفته تمرین مقاومتی را اجرا نمودند.

رت‌های گروه تمرین مقاومتی به منظور آشناسازی با تمرین به مدت ۳ روز آموزش داده شدند. سپس، پروتکل تمرین مقاومتی به مدت ٦ هفته، ۵ روز در هفته بر حیوانات گروه تمرین اعمال شد. تمرینات مقاومتی شامل بالا رفتن از نردبان یک متری به فاصله میله‌های ۲ سانتی‌متری و شیب ۸۵ درجه، و حمل وزنه‌ای بود که به دم رت‌ها آویزان می‌شد. در هفته اول میزان وزنه‌های بسته شده به رت‌ها ٤٠ تا ۵٠ درصد وزن بدن آن‌ها بود که به تدریج افزایش و به حدود ١٦٠ درصد وزن بدن در هفته ششم رسید. افزایش در بار تمرین در طول پروتکل تمرینی از طریق دستکاری وزنه جا به جا شده، تکرار در هر ست و تعداد ست‌ها اعمال گردید. تعداد تکرارها در هر ست ۸ تکرار، فاصله استراحت بین ست‌ها ۲ دقیقه و فاصله استراحت بین تکرارها ۲۰ – ۱۰ ثانیه بود. جزئیات پروتکل تمرینی در جدول ۱ گزارش شده است (۱۷).

جدول ۱. پروتکل تمرین مقاومتی

هفته	اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم
بار (درصد وزن بدن)	٥٠-٤٠	٧٠-٦٠	٩٠-٨٠	١١٠-١٠٠	١٤٠-١٣٠	١٦٠-١٥٠
تعداد ست	۵	۵	۵	۶	۶	۶
تکرار در هر ست	۸	۸	۸	۸	۸	۸

برای القای دیابت، از رژیم غذایی پرچرب و تزریق استرپتوزوتوسین (STZ) (ab142155, abcam, Germany) استفاده شد. رژیم غذایی پرچرب همزمان با شروع برنامه تمرینی اعمال گردید و تا انتهای مطالعه ادامه یافت. ترکیبات غذای پرچرب شامل: کنجاله سویا (٦/۵ گرم/۱۰۰ گرم)، کازئین (۱۱ گرم/۱۰۰ گرم)، آرد گندم تصفیه شده (٤٠ گرم/۱۰۰ گرم)، چربی حیوانی (۲۳ گرم/۱۰۰ گرم)، سدیم (۰/۰۲ گرم/۱۰۰ گرم)، بی‌کربنات کلسیم (۱ گرم/۱۰۰ گرم)، فروکتوز (۱۵/۷ گرم/۱۰۰ گرم)، مخلوط ویتامین و مواد معدنی (۲ گرم/۱۰۰ گرم) و انرژی کل ٤/٦ کیلوکالری/گرم بود (۱۸). ٤٨ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، تزریق محلول تازه تهیه شده STZ به صورت داخل صفاقی با دوز ۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن صورت پذیرفت. یک هفته پس از القای دیابت، گلوکز خون ناشتا اندازه‌گیری و قند خون بالای ۳۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر به عنوان معیاری برای اطمینان از ابتلای رت‌ها به دیابت نوع ۲ در نظر گرفته شد (۱۸).

۷ روز بعد از تزریق STZ و در حالت ناشتایی شبانه، همه حیوانات از طریق قرار گرفتن در معرض اتر بیهوش شدند. سپس قفسه سینه حیوان شکافته شده و قلب حیوان استخراج شد. سپس، بطن چپ حیوانات نمونه‌برداری شده و پس از شستشو در سرم فیزیولوژیک در میکروتیوب‌های ۱/۸ حاوی مایع RNAlaterTM با نسبت ۲۰ درصد غوطه‌ور گردید و

جهت اندازه‌گیری بیان ژن‌های مربوطه به آزمایشگاه انتقال داده شد. به منظور استخراج total RNA از بافت بطن چپ قلب هموژن شده، ۱ میلی‌لیتر ترایزول (Invitrogen, CN 15596018, USA) به ۱۰۰ میلی‌گرم بافت اضافه و پس از مخلوط کردن کامل به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس، ٤۰۰ میکرولیتر کلروفرم سرد (Merek, CAS 67-66-3 102445, Germany) به نمونه اضافه و به مدت ۱۵ ثانیه مخلوط شدند. محلول در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع حاوی RNA به میکروتیوب دیگری انتقال داده شد، سپس ۵۰۰ میکرولیتر اتانول (Merek, CAS 64-17-5 107017, Germany) به محلول RNA اضافه شد و به مدت ٢٤ ساعت در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از ٢٤ ساعت، این محلول نیز به مدت ۱۵ دقیقه (دمای ٤ درجه سانتی‌گراد، ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه) سانتریفیوژ شد. مایع رویی با دقت خارج گردید و ۱ میلی‌لیتر اتانول خالص سرد به رسوب RNA اضافه شد و سپس به مدت ۵ دقیقه (در دمای ٤ درجه با ۷۵۰۰ دور در دقیقه) سانتریفیوژ شد.

در ادامه مایع رویی به دقت خارج شد و رسوب RNA با ۱۰۰ میکرولیتر ایلوشن بافر (Sigma Aldrich, H5413, Germany) رقیق گردید. تمام مراحل استخراج زیر هود و با مواد و وسایل کاملاً استریل انجام گرفت. در پایان، غلظت و نسبت جذبی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (Eppendorf, Germany) ارزیابی شد و نسبت جذبی ٢٦۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ – ۱/٦ به عنوان تخلیص مطلوب تعریف گردید. جهت اطمینان بیشتر از صحت تخلیص RNA، تعدادی از RNAs تخلیص شده به طور تصادفی روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد. پس از استخراج RNA با خلوص و غلظت بالا، مراحل سنتز cDNA مطابق پروتکل شرکت سازنده (high-capacity cDNA reverse transcription kit) انجام شد. ابتدا RNA، پرایمر و آب با هم ترکیب شدند و محلول به مدت ۵ دقیقه در دمای ٦۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد، سپس محلول به مدت ، ۲ دقیقه روی یخ قرار گرفت. پس از آن enzyme mx و reaction mix به محلول اضافه شدند. محلول در ۳ مرحله متوالی انکوبه شد: مرحله اول، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد؛ مرحله دوم، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ٤۲ درجه سانتی‌گراد و مرحله سوم، به مدت ۵ ثانیه در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد انجام گردید و در نهایت cDNA سنتز شد و شده در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. تمام مراحل انجام کار روی یخ، زیر هود و با استفاده از وسایل RNase free انجام شد. برای اندازه‌گیری سطوح بیان mRNA ژن‌های MFN-2، OPA-1 و Drp-1 از روش کمی Real time-PCR استفاده شد. در ابتدای کار میزان غلظت بهینه cDNA و همچنین پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از آزمایش سریال غلظت برای هر کدام به طور جداگانه مشخص گردید به طوری که کمترین میزان دایمر و بهترین C_t مشاهده شود. Real time-PCR با استفاده از RealQ Plus 2x Master Mix Green شرکت AMPLIQON و با استفاده از غلظت ۲۵۰ نانوگرم از cDNA انجام گرفت. توالی پرایمرهای مربوط به متغیرهای مورد مطالعه بر اساس اطلاعات این ژن‌ها در بانک ژنی NCBI توسط شرکت پیشگام (ایران) طراحی شد (جدول ۲). هر نمونه به صورت دوتکراری اجرا و تجزیه و تحلیل شد. برنامه Real time-PCR شامل: واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد و به مدت۱۰ دقیقه، واسرشت در هر سیکل PCR در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه و با توجه به دمای انلینگ پرایمرها هر سیکل به مدت ۳۰ ثانیه (٤۰ سیکل) در نظر گرفته شد. نمودار Melting جهت بررسی صحت واکنش‌های انجام شده و به صورت اختصاصی برای هر ژن و در هر بار از واکنش به همراه نمودار کنترل منفی جهت بررسی وجود آلودگی در هر واکنش مورد ارزیابی قرار گرفت. از ژن گلیسرآلدهید-۳-فسفات دهیدروژناز (GAPDH) به عنوان ژن کنترل استفاده گردید و میزان بیان ژن مورد نظر با فرمول $^{-\Delta\Delta CT}$ ۲ محاسبه شد (۱۹). برای بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیرو-ویلک استفاده شد. همچنین، آزمون لوین برای بررسی همسان بودن واریانس‌ها بکار رفت. به منظور مقایسه-های بین‌گروهی از تحلیل واریانس یک راهه و در صورت نیاز از آزمون تعقیبی بونفرونی در سطح معنی‌داری $P \leq$ ۰/۰۵ استفاده شد.

جدول ۲. توالی پرایمرهای مورد مطالعه در تحقیق حاضر

Gene	Forward/Reverse	Primer (5'⟶3')
MFN-2	F	CTTTCACCCATCCCCAGTTGTC
	R	AGCAGCGGTCAGACATGTTTC
OPA-1	F	TGTGGTTGGAGATCAGAGTGC
	R	GGGCCTTCACTGAGAGTCAC
Drp-1	F	AGCAACTACAGCACACAGGAAC
	R	CCACAGGCATCAGCAAAGTC
GAPDH	F	AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG
	R	CATACTCAGCACCAGCATCACC

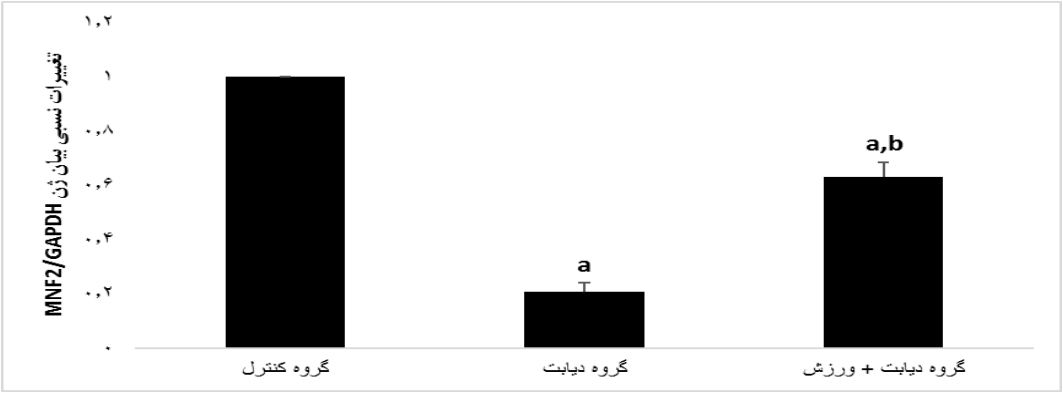
یافته‌ها

نتایج آزمون تحلیل واریانس یکراهه نشان داد بین وزن حیوانات گروه‌های مورد مطالعه در روز کشتار تفاوت معنی‌داری وجود نـدارد ($p > ۰/۰۵$) (جدول ۳).

جدول ۳. میانگین وزن حیوان ات مورد مطالعه (میانگین (گرم) ± انحراف استاندارد)

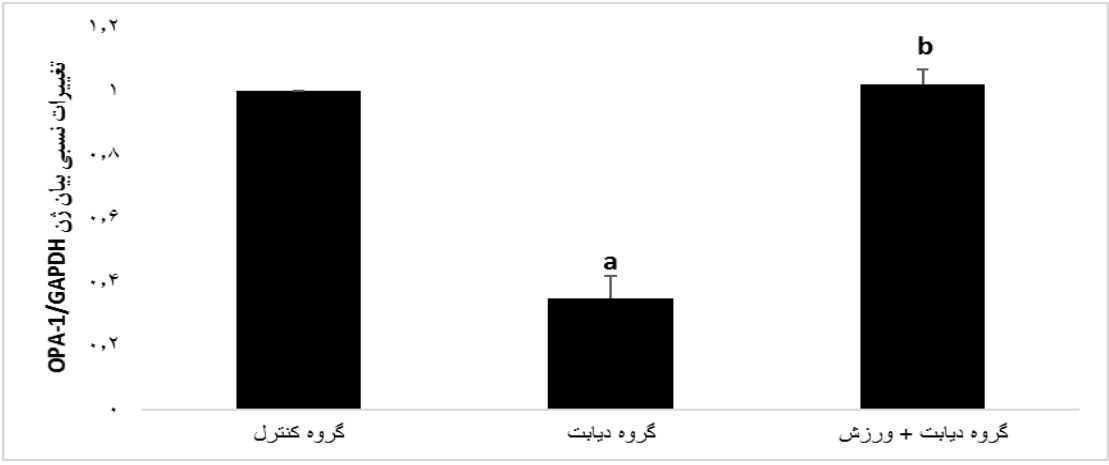
زمان	گروه کنترل	گروه دیابت	گروه دیابت + ورزش
پیش‌آزمون		**۲۲۰ ± ۲۰**	
پس‌آزمون	**۲۸۲/۸ ± ۸/۲**	**۲۹٤/۳ ± ۹/۹**	**۲۹۵/۶ ± ۱۰/۷**

نتایج آزمون تحلیل واریانس یکراهه نشان داد که بین میزان بیان mRNA ژن MFN-2 در سه گروه دیابت، گروه دیابت + ورزش و گروه کنترل تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($p \leq ۰/۰۰۱$، $F(۲،۱۵) = ۱۱۳/۸۷۲$). نتایج آزمون تعقیبی بونفرونی نشان داد که میزان بیان mRNA ژن MFN-2 در گروه‌های دیابت و دیابت + ورزش در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته است ($p \leq ۰/۰۰۱$). همچنین، گروه دیابت + ورزش در مقایسه با گروه دیابت مقادیر بالاتر میزان بیان mRNA ژن MFN-2 را نشان دادند ($p \leq ۰/۰۰۱$) (نمودار ۱).



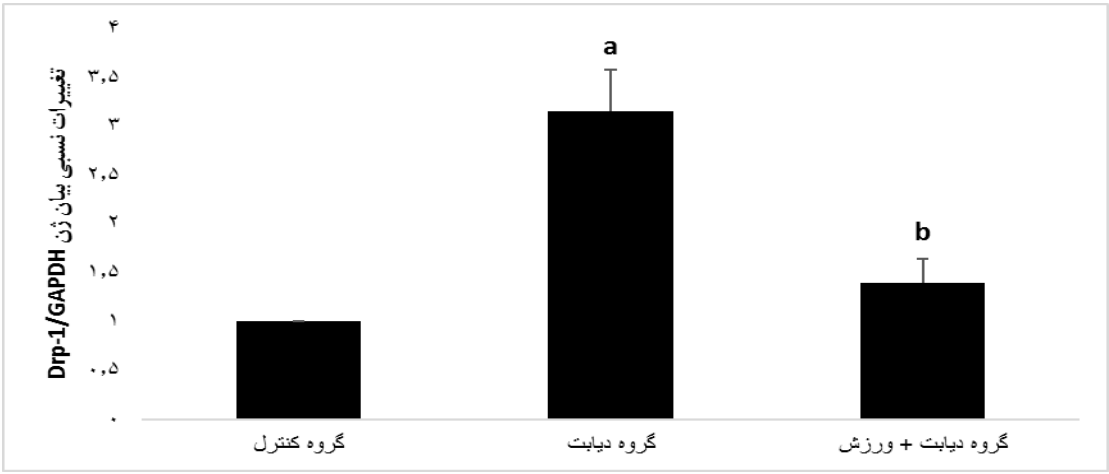
نمودار ۱. مقایسه میزان بیان mRNA ژن MNF-2 در بطن چپ گروه‌های مورد مطالعه. a: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل در سطح $P \leq ۰/۰۰۱$ ؛ b: تفاوت معنی‌دار با گروه دیابت در سطح $P \leq ۰/۰۰۱$

نتایج آزمون تحلیل واریانس یکراهه نشان داد که بین میزان بیان mRNA ژن OPA-1 در سه گروه دیابت، گروه دیابت + ورزش و گروه کنترل تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($p \leq ۰/۰۰۱$). نتایج آزمون تعقیبی بونفرونی نشان داد که میزان بیان mRNA ژن OPA-1 در گروه دیابت در مقایسه با گروه‌های کنترل و دیابت + ورزش کاهش یافته است ($p \leq ۰/۰۰۱$)؛ (نمودار ۲).



نمودار ۲. مقایسه میزان بیان mRNA ژن OPA-1 در بطن چپ گروه‌های مورد مطالعه.a : تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل در سطح $P \leq ۰/۰۰۱$ ؛ b : تفاوت معنی‌دار با گروه دیابت در سطح $P \leq ۰/۰۰۱$

نتایج آزمون تحلیل واریانس یکراهه نشان داد که بین میزان بیان mRNA ژن Drp-1 در سه گروه دیابت، گروه دیابت + ورزش و گروه کنترل تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($p \leq ۰/۰۰۱$). نتایج آزمون تعقیبی بونفرونی نشان داد که میزان بیان mRNA ژن Drp-1 در گروه دیابت در مقایسه با گروه‌های کنترل ($p \leq ۰/۰۰۱$) و دیابت + ورزش ($p \leq ۰/۰۱$) افزایش یافته است (نمودار ۳).



نمودار ۳. مقایسه میزان بیان mRNA ژن Drp-1 در بطن چپ گروه‌های مورد مطالعه.

a : تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل در سطح $P \leq ۰/۰۰۱$ ؛ b : تفاوت معنی‌دار با گروه دیابت در سطح $P \leq ۰/۰۱$

بحث و نتیجه‌گیری

هدف از انجام تحقیق حاضر، بررسی تأثیر ٦ هفته پیش‌آماده‌سازی تمرین مقاومتی بر پویایی میتوکندریایی در رت‌های دیابتی نوع ۲ بود. دیابت ملیتوس بیماری است که موجب کاهش ظرفیت لوزالمعده در ترشح انسولین در پاسخ به افزایش گلوکز یا کاهش ظرفیت سلول‌ها در پاسخ به انسولین می‌شود (۲۰). یکی از عوارض جانبی دیابت، تأثیر منفی آن بر سیستم قلبی-عروقی است. علاوه بر تغییرات ساختاری که با اختلال در انقباض سلول‌های عضله قلب همراه است، نقص عملکرد میتوکندریایی نیز می‌تواند با تضعیف انقباض منجر به کاردیومیوپاتی دیابتی شود. نشان داده شده است که اختلال در عملکرد میتوکندری عامل اصلی اختلالات متابولیکی و بیماری‌های قلبی مرتبط با مقاومت به انسولین است (۲). از این رو، به نظر می‌رسد که افزایش اندازه و تعداد میتوکندری‌ها به طور مستقیم و بهبود کیفیت عملکرد میتوکندری‌ها به طور غیرمستقیم در تعیین ساختار قلب نقش دارند.

از سوی دیگر، کم‌تحرکی با افزایش خطر ابتلا به دیابت نوع ۲ همراه است (۲۱) و شرکت منظم در فعالیت‌های ورزشی برای پیشگیری از ابتلای به آن پیشنهاد شده است (۱۲). ورزش‌های مقاومتی که امروزه طرفداران زیادی پیدا کرده‌اند، برای پیشگیری و کنترل عوارض متابولیکی دیابت نوع ۲ در نظر گرفته می‌شوند (۲۲). مزایای چند عاملی ناشی از تمرینات مقاومتی می‌تواند در اثر افزایش توده عضلانی رخ دهد که از آن جمله می‌توان افزایش کنترل گلیسمیک از طریق افزایش بیان پروتئین انتقال‌دهنده گلوکز ٤، افزایش هزینه انرژی استراحتی و نیازهای متابولیکی ناشی از افزایش بازسازی پروتئین عضلات را نام برد. همچنین، از دیگر مزایای ضددیابتی که بدنبال تمرینات مقاومتی به طور مستقل از افزایش توده عضلانی حاصل می‌شوند، می‌توان به افزایش پروتئین‌های کلیدی پیام‌رسانی انسولین که موجب بهبود عملکرد انسولین می‌شوند، افزایش مصرف اکسیژن بعد از ورزش که موجب کاهش توده بافت چربی می‌شود و بهبود هومئوستاز گلوکز به دلیل افزایش میزان سنتز گلیکوژن اشاره کرد (۲۳). بعلاوه، افزایش تراکم و عملکرد میتوکندری‌ها که اثر مثبت بر ظرفیت اکسیداسیون اسیدهای چرب دارد، یکی دیگر از سازگاری‌های حاصل از تمرین مقاومتی عنوان شده است (۱۵). با این حال، سازوکارهای مولکولی بهبود عملکرد میتوکندری، خصوصاً در شرایط کاردیومیوپاتی دیابتی هنوز به طور کامل آشکار نشده است.

در مطالعه حاضر، علیرغم اینکه افزایش غیرمعنی‌دار وزن حیوانات گروه دیابت و دیابت + ورزش با گروه کنترل وجود داشت، اما تفاوت چشمگیری بین گروه‌ها مشاهده نشد. این یافته با نتایج اویدمی و همکاران (۲۰۱۱) که کاهش ۳۳ – ۲۸ گرمی وزن رت‌های نر ویستار به دنبال تزریق STZ و القای دیابت را گزارش کردند، مغایرت دارد. این اختلاف در نتایج به احتمال زیاد می‌تواند به مدل القای بیماری دیابت مربوط باشد؛ در مطالعه مذکور از روش تزریق تک‌دوز STZ با غلظت بالای ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن حیوانات برای القای دیابت استفاده شده است، در حالی که القای دیابت در مطالعه حاضر از طریق رژیم غذایی پرچرب همراه با تزریق دوز پایین (۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) STZ صورت پذیرفت.

در مطالعه حاضر، بیان mRNA ژن‌های MNF-2 و OPA-1 در بافت بطن چپ رت‌های دیابتی کاهش یافت. به طور جالب، پیش‌آماده‌سازی تمرین مقاومتی در حیواناتی که القای دیابت را تجربه کردند، به طور چشمگیری از این حالت جلوگیری نمود. بر اساس جستجوهای ما، تاکنون مطالعه‌ای که تأثیر تمرین مقاومتی بر پویایی میتوکندریایی را مورد بررسی قرار داده باشد، یافت نشد. MNF-2 و OPA-1 که به ترتیب روی غشای بیرونی و داخلی میتوکندری قرار گرفته‌اند، تنظیم‌کننده‌های اصلی همجوشی میتوکندریایی به شمار می‌روند. کنترل کیفیت میتوکندری‌ها نقش بسیار مهمی در محافظت از قلب در برابر استرس ایفا می‌کند. نشان داده شده است که بیان کم پروتئین‌های همجوشی در سلول‌های غیر قلبی با قطعه قطعه شدن شبکه‌های میتوکندریایی همراه است (٢٤). با این حال، پاپانیکولا و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کرده‌اند موش‌هایی که MFN-2 سلول‌های عضله قلب آنها تخریب شده بود، میتوکندری‌های بزرگتری داشتند (۲۵). این امر در موش‌های فاقد OPA-1 نیز مشاهده شد که خوشه‌های بزرگی از میتوکندری‌های ترکیب شده با کریستای تغییر یافته را تشکیل دادند (٦). همچنین، مطالعه دیگری گزارش کرده است که موش‌های فاقد Mfn1/Mfn2 در سلول‌های عضله قلب، قطعه قطعه شدن شبکه میتوکندری را نشان دادند که به کاردیومیوپاتی گسترده پیشرفت کرد (٤). بنابراین، پویایی میتوکندریایی یک

فرایند پیچیده در قلب بزرگسال است و ممکن است به ساختار خاص سلولی بستگی داشته باشد. علاوه بر این، از لحاظ عملکرد انقباضی قلب، افزایش در حجم میتوکندری‌ها ناشی از تنظیم مثبت عوامل همجوشی ممکن است به طور مستقیم نیروی تولید شده توسط تارچه‌های عضلانی را متأثر سازد که این امر نشان‌دهنده ارتباط مستقیم بین مورفولوژی میتوکندریایی و عملکرد انقباضی قلب است.

نشان داده شده است که چاقی مرتبط با شرایط دیابتی، بیوژنز میتوکندریایی را از طریق افزایش بیش از حد شکافت مختل می‌سازد و ممکن است به نقص انقباضی مشاهده شده در سلول‌های عضله قلب کمک کند (١٤). از آنجایی که استرس اکسیداتیو ناشی از هیپرگلیسمی عامل اصلی کمک‌کننده به شروع کاردیومیوپاتی دیابتی به شمار می‌رود (٧)، و این حالت با افزایش شکافت میتوکندریایی همراه است (٢٦)، کنترل سطح Drp-1 برای کاهش شکافت میتوکندریایی از موضوعات مهم مطالعاتی در زمینه کاردیومیوپاتی دیابتی به شمار می‌رود. به طور جالب، برنامه پیش‌آماده‌سازی تمرین مقاومتی استفاده شده در مطالعه حاضر توانسته است سطح Drp-1 افزایش‌یافته در بافت قلب رت‌های دیابتی را به طور قابل توجهی کاهش دهد. ورانکی و همکاران (٢٠١٦) گزارش کرده‌اند که دویدن روی تردمیل با کاهش سطح Drp-1، از کاهش نسبت MFN-2/Drp-1 در قلب موش‌های چاق دیابتی جلوگیری می‌کند (١٤). با این حال، مطالعه حاضر برای اولین بار کاهش سطح Drp-1 در عضله قلب را به دنبال یک دوره پیش‌آماده‌سازی تمرین مقاومتی نشان داد. بهبود بیوژنز میتوکندریایی از طریق افزایش مسیرهای پیام‌رسانی PGC-1α و Akt بعد از ورزش گزارش شده است و ممکن است به طور بالقوه از طریق تعدیل پویایی میتوکندریایی به افزایش تراکم میتوکندری و سطح ATP پس از ورزش کمک نماید (٢٧).

نتیجه‌گیری

به طور کلی، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ٦ هفته پیش‌آماده‌سازی تمرین مقاومتی با تنظیم مثبت پروتئین‌های درگیر در همجوشی میتوکندریایی و تنظیم منفی شکافت میتوکندریایی افزایش‌یافته در بافت قلب می‌تواند خطر ابتلا به کاردیومیوپاتی دیابتی را کاهش دهد.

منابع

1. Battiprolu PK, Hojayev B, Jiang N, Wang ZV, Luo X, Iglewski M, et al. Metabolic stress–induced activation of FoxO1 triggers diabetic cardiomyopathy in mice. The Journal of Clinical Investigation. 2012;122(3):1109-18.
2. Boudina S, Abel ED. Diabetic cardiomyopathy, causes and effects. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders. 2010;11(1):31-9.
3. Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CD, Jaswal JS, Stanley WC. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. Physiological Reviews. 2010;90(1):207-58.
4. Chen L, Knowlton AA. Mitochondrial dynamics in heart failure. Congestive Heart Failure. 2011;17(6):257-61.
5. Ong S-B, Hall AR, Hausenloy DJ. Mitochondrial dynamics in cardiovascular health and disease. Antioxidants & Redox Signaling. 2013;19(4):400-14.
6. Piquereau J, Caffin F, Novotova M, Lemaire C, Veksler V, Garnier A, et al. Mitochondrial dynamics in the adult cardiomyocytes: which roles for a highly specialized cell? Frontiers in Physiology. 2013;4:102.
7. Kobayashi S, Liang Q. Autophagy and mitophagy in diabetic cardiomyopathy. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease. 2015;1852(2):252-61.
8. Westermeier F, Navarro-Marquez M, López-Crisosto C, Bravo-Sagua R, Quiroga C, Bustamante M, et al. Defective insulin signaling and mitochondrial dynamics in diabetic cardiomyopathy. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. 2015;1853(5):1113-8.
9. Del Campo M, Stargardt A, Veerhuis R, Reits E, Teunissen C. Accumulation of BRI2-BRICHOS ectodomain correlates with a decreased clearance of Aβ by insulin degrading enzyme (IDE) in Alzheimer's disease. Neuroscience Letters. 2015;589:47-51.
10. Givvimani S, Pushpakumar S, Veeranki S, Tyagi SC. Dysregulation of Mfn2 and Drp-1 proteins in heart failure. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. 2014;92(7):583-91.
11. Wang W, Wang Y, Long J, Wang J, Haudek SB, Overbeek P, et al. Mitochondrial fission triggered by hyperglycemia is mediated by ROCK1 activation in podocytes and endothelial cells. Cell Metabolism. 2012;15(2):186-200.
12. Praet SF, Van Loon LJ. Optimizing the therapeutic benefits of exercise in type 2 diabetes. Journal of Applied Physiology. 2007;103(4):1113-20.
13. Colberg SR, Sigal RJ, Fernhall B, Regensteiner JG, Blissmer BJ, Rubin RR, et al. Exercise and type 2 diabetes: the American College of Sports Medicine and the American Diabetes Association: joint position statement. Diabetes Care. 2010;33(12):e147-e67.

14. Veeranki S, Givvimani S, Kundu S, Metreveli N, Pushpakumar S, Tyagi SC. Moderate intensity exercise prevents diabetic cardiomyopathy associated contractile dysfunction through restoration of mitochondrial function and connexin 43 levels in db/db mice. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2016;92:163-73.
15. Tang JE, Hartman JW, Phillips SM. Increased muscle oxidative potential following resistance training induced fibre hypertrophy in young men. Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism. 2006;31(5):495-501.
16. Sparks LM, Johannsen NM, Church TS, Earnest CP, Moonen-Kornips E, Moro C, et al. Nine months of combined training improves ex vivo skeletal muscle metabolism in individuals with type 2 diabetes. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2013;98(4):1694-702.
17. Jaafari Sardoui SN, Rohollah; Sheibani, Vahid. The effect of time series of resistance training on TGF-β1 expression and muscle hypertrophy in male Wistar rats. Journal of Applied Exercise Physiology. 2015;11(22):23-32.
18. Guo X-x, Wang Y, Wang K, Ji B-p, Zhou F. Stability of a type 2 diabetes rat model induced by high-fat diet feeding with low-dose streptozotocin injection. Journal of Zhejiang University-Science B. 2018;19(7):559-69.
19. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. Nucleic Acids Research. 2001;29(9):e45-e.
20. Hildick-Smith D, Shapiro L. Echocardiographic differentiation of pathological and physiological left ventricular hypertrophy. Heart. 2001;85(6):615-9.
21. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. Physiological Reviews. 2013;93(1):137-88.
22. Castaneda C, Layne JE, Munoz-Orians L, Gordon PL, Walsmith J, Foldvari M, et al. A randomized controlled trial of resistance exercise training to improve glycemic control in older adults with type 2 diabetes. Diabetes Care. 2002;25(12):2335-41.
23. Pesta DH, Goncalves RL, Madiraju AK, Strasser B, Sparks LM. Resistance training to improve type 2 diabetes: working toward a prescription for the future. Nutrition & Metabolism. 2017;14(1):24.
24. Griparic L, Kanazawa T, van der Bliek AM. Regulation of the mitochondrial dynamin-like protein Opa1 by proteolytic cleavage. J Cell Biol. 2007;178(5):757-64.
25. Papanicolaou KN, Ngoh GA, Dabkowski ER, O'Connell KA, Ribeiro Jr RF, Stanley WC, et al. Cardiomyocyte deletion of mitofusin-1 leads to mitochondrial fragmentation and improves tolerance to ROS-induced mitochondrial dysfunction and cell death. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2011;302(1):H167-H79.
26. Makino A, Scott B, Dillmann W. Mitochondrial fragmentation and superoxide anion production in coronary endothelial cells from a mouse model of type 1 diabetes. Diabetologia. 2010;53(8):1783-94.
27. 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-1α and Akt activation. Cellular Physiology and Biochemistry. 2015;35(6):2159-68.

Effect of 6 weeks of resistance exercise preconditioning on mitochondrial dynamics in cardiac tissue of diabetic rats

Soghra Sujodi [1], Maghsoud Peeri [2*], Parvin Farzanegi [3], Maryam Delfan [4]

1. Ph.D Student of Exercise Physiology, Central Tehran Branch Islamic Azad University
2. Professor, Department of Exercise Physiology, Central Tehran Branch Islamic Azad University
3. Assistant Professor, Department of Exercise Physiology, Sari Branch Islamic Azad University
4. Assistant Professor, Department of Exercise Physiology, Al-Zahra University

Received: 2020/06/02 **Revised:** 20202/05/25 **Accepted:** 2020/09/15

∗Correspondence Email:

m.peeri@iauctb.ac.ir

Abstract

Introduction: Diabetic cardiomyopathy refers to changes in the heart as a result of altered glucose homeostasis, leading to ventricular dysfunction, and it is associated with mitochondrial abnormality. Since physical exercise has been known as cardioprotective, the aim of the present study was to investigate the effect of 6 weeks of resistance exercise preconditioning on mitochondrial fusion and fission processes in cardiac tissue of type 2 diabetic rats.

Methods: 18 male Westar rats were randomly divided into 3 groups: diabetes group (n=6), exercise + diabetes group (n=6) and control group (n=6); the exercise group performed resistance training (Carrying weights with 40 to 160 percent of body weight on the ladder) for 6 weeks and 5 sessions per week. To induce type 2 diabetes, a high-fat diet was administered concurrently with the start of the training program and continued until the end of the study, and 48 hours after the last training session, the injection of STZ was administered intraperitoneally at a dose of 25 mg/kg. Seven days after STZ injection, all rats were dissected and their left ventricular tissue extracted. Real-time-PCR was used to measure the mRNA expression of MFN-2, OPA-1 and Drp-1 genes. Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance at a significance level of $p \leq 0.05$.

Results: Decreased mRNA expression of MFN-2 and OPA-1 genes and increased mRNA expression of Drp-1 gene were observed in diabetic group animals compared to control ones ($p \geq 0.001$) .Also, trained diabetic rats showed higher MFN-2 and OPA-1 mRNA expression ($p \geq 0.001$), and lower Drp-1 mRNA expression ($p \geq 0.01$) compared to the diabetic group.

Conclusion: It seems that 6 weeks of resistance training preconditioning can reduce the risk of diabetic cardiomyopathy through the up-regulation of proteins involved in mitochondrial fusion and down-regulation of enhanced mitochondrial fission in the heart tissue.

Key Words: Diabetic cardiomyopathy, Resistance exercise preconditioning, MFN-2, OPA-1, Drp-1