

علوم زیستی ورزشی - زمستان ۱۳۹۹
دوره ۱۳، شماره ۴، ص: ۴۷۱ - ۴۵۳
تاریخ دریافت: ۹۹/۰۵/۰۲
تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۹/۰۹

بررسی تغییرات محتوای پروتئین Cas3، فیبرونکتین و Col4a1 در پی دو شیوه تمرین هوازی و اینتروال همراه با مصرف مکمل آستاگزانتین در بافت قلب رت‌های دیابتی نوع ۲

نسرين عبادی^۱ - محمدرضا ذوالفقاری^{۲*} - فیروز قادری پاکدل^۳

۱. دانش‌آموخته دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. ۲. استادیار فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. ۳. دانشیار فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

چکیده

دیابت به‌عنوان نوعی اختلال متابولیک مزمن با شیوع گسترده، اهمیت تحقیقات مداوم و نیاز به روش‌های نوین را برای پیشگیری و درمان این بیماری همه‌گیر برجسته می‌کند. هدف از تحقیق حاضر بررسی تغییرات فیبروزی و آپوتوزی بافت قلبی در رت‌های دیابتی در پی اجرای دو شیوه تمرینی هوازی و اینتروال با مصرف مکمل آستاگزانتین بود. ۳۵ سر موش صحرایی نر پس از القای دیابت به‌طور تصادفی در ۷ گروه شامل دیابتی کنترل، دیابتی شم، دیابت+ هوازی+ مکمل، دیابت+ اینترول+ مکمل، دیابت+ اینتروال، دیابت+ هوازی، دیابت+ مکمل قرار گرفتند. تمرینات اینتروال به مدت ۸ هفته با ۵ جلسه در هفته با شدت ۸۰ درصد Vo2max و تمرینات هوازی با شدت ۶۵ تا ۷۵ درصد Vo2max روی نوار گردان اجرا شد. محتوای پروتئین Cas3، COL4a1 و فیبرونکتین با تکنیک وسترن بلات اندازه‌گیری شد. محتوای پروتئین COL4a1 در هر دو گروه تمرینی و ترکیبی و گروه مکمل کاهش معناداری نسبت به گروه کنترل نشان داد. محتوای پروتئین Cas3 و فیبرونکتین گروه‌های ترکیبی و هوازی نیز نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری داشت، اما در مقایسه محتوای این پروتئین‌ها بین گروه‌های مکمل و اینتروال نسبت به گروه کنترل اختلاف معناداری وجود نداشت. به‌نظر می‌رسد تأثیرات هم‌افزای تمرینات ورزشی با شدت‌های مختلف همراه با مکمل‌سازی آستاگزانتین از روند صعودی آپوتوز و فیبروز در بافت قلبی رت‌های دیابتی و عوارض متعاقب آن همچون کاردیومیوپاتی دیابتی پیشگیری می‌کند.

واژه‌های کلیدی

آستاگزانتین، تمرین، دیابت، رت، کاردیومیوپاتی دیابتی.

مقدمه

آسیب‌های قلبی عروقی از علل متداول مرگ‌ومیر در سرتاسر جهان است و دیابت ملیتوس از عوامل خطر عمده برای توسعه این بیماری‌هاست. یکی از عوارض قلبی عروقی عمده دیابت گسترش کاردیومیوپاتی دیابتی است که با فیبروز بینابینی مشخص می‌شود (۱). در دیابت چندین مکانیسم همانند هایپرگلیسمی، هایپرلیپیدمی، استرس اکسیداتیو، افزایش سیتوکین‌های التهابی، اختلالات میتوکندریایی، فعال‌سازی کاسپازها، بیان متغیر پروتئین‌های پروآپوپتوزی و ضدآپوپتوزی و استرس شبکه اندوپلاسمی می‌توانند میزان آپوپتوز کاردیومیوسیت‌ها را افزایش دهند (۲). آپوپتوز ناشی از هایپرگلیسمی از طریق فعال‌سازی مسیر کاسپاز ۳ تحریک‌شده به‌واسطه سیتوکروم c میتوکندریایی به‌واسطه تولید گونه‌های اکسیژن واکنشی ناشی از گلوکز بالا ایجاد می‌شود (۳).

کاسپاز ۳ فعال‌شده می‌تواند از طریق فعال‌سازی DNase^۱ فعال‌شده با نوکلئاز کاسپاز ۳ (CAD) و ورود آن به هسته موجب قطعه‌قطعه شدن DNA شود (۴). براساس یافته‌های اخیر بین افزایش آپوپتوز و گسترش هایپرتروفی قلبی همبستگی وجود دارد و از میان برداشتن CAD فیبروز قلبی و بیان چندین واسطه فیبروتیک ناشی از اضافه‌بار فشاری مزمن را کاهش می‌دهد. این یافته‌ها به نقش مخرب CAD در هایپرتروفی پاتولوژیکال قلبی و ارتباط آن با مسیر سیگنالینگ Smad اشاره دارند (۴). مسیر سیگنالینگ TGF-B/Smad به‌عنوان مسیر مهم دخیل در فیبروز قلبی با پیوند TGF-B به گیرنده‌های نوع I و II^۲ سبب فعال‌سازی مسیر Smad2/3 و تحریک فرایند فیبروز قلبی می‌شود (۵).

فیبروز قلبی به‌عنوان شاخص مهم کاردیومیوپاتی دیابتی با کاهش کارایی انقباضی و نیاز به نیروی انقباضی قلبی بزرگ‌تر موجب نارسایی قلبی شده و در نهایت به مرگ سلول منجر می‌شود. تعیین‌کننده‌های مهم فیبروز بافت قلبی آبشار سیگنالی فاکتور رشد تراپختی بتا و تجمع پروتئین‌های ماتریکس خارج‌سلولی همانند فیبرونکتین ۱ و کلاژن نوع ۴ زنجیره آلفا^۱ است که این تجمع پروتئین‌ها در دیابت به‌علت تأثیرات هم‌افزای تحریک‌گیرنده فاکتور رشد بافتی B^۶، فعال‌سازی پایین‌دست اندوتلین ۱ و مسیر آنژیونانتسین II به تولید کلاژن منجر می‌شود و آسیب بافتی غیرقابل بازگشتی را ایجاد

- 1 . Deoxyribonuclease
- 2 . TβRI, TβRII
- 3 . Transforming Growth Factor Beta (TGF-β)
- 4 . Fibronectin 1 (FN1)
- 5 . Collagen Type IV Alpha 1 Chain
- 6 . Transforming Growth Factor Beta Receptor

می‌کند (۶). تحقیقات نشان داده‌اند که فعال‌سازی TGF به‌عنوان عامل کلیدی توسعه فیبروز قلبی به‌واسطه تولید گونه‌های اکسیژن واکنشی پیامد دیابت می‌تواند سنتز بیشتر Col4 به‌عنوان پروتئین مازاد ماتریکس خارج سلولی را موجب شود (۷). در نهایت رسوب بیشتر پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی به اختلال عملکرد قلب، آریتمی و نارسایی قلبی متعاقب آن منجر می‌شود (۸).

مداخلات غیردارویی همانند افزایش فعالیت جسمانی و تمرین منظم در شدت‌های بالا و متوسط سلامت و کیفیت زندگی را در افراد مبتلا به چاقی و بیماران دیابتی و عوارض وابسته به آن بهبود می‌بخشد (۹، ۱۰). اخیراً مطالعه‌ای نشان داده که اثر کاهشی تمرینات با شدت بالا در آپوپتوز کاردیومیوسیت‌ها با مهار بیشتر کاسپاز ۳ در مقایسه با تمرینات با شدت کم بیانگر این موضوع است که تمرینات ورزشی در یک شیوه وابسته به شدت می‌تواند با کاهش استرس شبکه اندوپلاسمیک ناشی از دیابت در موش‌ها، کاردیومیوپاتی را کاهش دهد (۱۱). همچنین تمرین می‌تواند میزان فیبروز میوکاردی را به‌واسطه عواملی همانند کاهش استرس اکسیداتیو در میوکارد دیابتی‌ها و کاهش فعالیت رنین آنژیوتانسین و مهار محصولات نهایی گلیکوزاسیون پیشرفته بکاهد (۱۲، ۱۳). نووو و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که تمرینات دائمی با شدت زیاد اثر مثبتی بر کاهش تغییرات ساختاری قلبی به‌واسطه کاهش هایپرتروفی میوسیت‌ها و کاهش رسوب کلاژن دارد و بدین‌وسیله فیبروز میوکاردی را بهبود می‌بخشد (۱۴). از طرف دیگر، تأثیر ورزش شدید در مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول در تحقیقات پاورز و همکاران گزارش شده است (۱۵). آستاگزانتین، یک کارتینوئید از خانواده زانتوفیل‌هاست که در ارگان‌های دریایی همانند سالمون، میگو، سخت‌پوستان و جلبک یافت می‌شود (۱۶). تنظیم التهاب، استرس اکسیداتیو و آپوپتوز با کاهش تولید گونه‌های اکسیژن واکنشی و مهار تولید محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته به‌عنوان سازوکارهای حفاظتی آستاگزانتین در برابر عوارض قلبی عروقی دیابت بیان شده است (۱۷). براساس یافته‌های مطالعات قبلی آستاگزانتین نفوذ ماکروفاژها و آپوپتوز را در آترومای خرگوش‌های هایپرلیپیدمیک کاهش می‌دهد (۱۸). همچنین در مطالعه‌ای درمان رت‌های دچار هایپرتروفی قلبی و نارسایی قلبی ناشی از ایزوپروتنول با آستاگزانتین، از افزایش وزن تر قلب پیشگیری کرده و نفوذ سلول‌های التهابی و فیبروز را کاهش داد (۱۹).

بنابراین بیان شد، نتایج تحقیقات از تأثیرات سودمند فعالیت‌های ورزشی و نقش حفاظتی آستاگزانتین در شرایط گوناگون آسیب‌های قلبی عروقی حمایت می‌کنند که می‌تواند به‌عنوان چشم‌انداز درمانی بی‌خطری برای افراد دیابتی در نظر گرفته شود. اما تاکنون مطالعه‌ای به مقایسه تأثیرات ترکیبی تمرینات با شدت‌ها و مدت‌های مختلف همراه با مکمل‌دهی آستاگزانتین بر شرایط کاردیومیوپاتی در

نمونه‌های حیوانی و انسانی مبتلا به دیابت نوع ۲ نپرداخته است. بنابراین لازم می‌نماید پژوهش‌های بیشتری صورت بگیرد تا نتایج قابل استناد گردد. از این رو هدف پژوهش حاضر پاسخ به این پرسش اساسی است که آیا تمرینات هوازی مداوم و اینتروال به همراه مکمل‌دهی آستاگزانتین می‌تواند روند آپوپتوز و فیبروز را به‌عنوان شاخص‌های اصلی کاردیومیوپاتی دیابتی کاهش دهد؟

روش کار

در این پژوهش تجربی که در آزمایشگاه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی ارومیه و براساس قوانین بین‌المللی حمایت از حیوانات آزمایشگاهی انجام گرفته و با کد IR.UMSU.REC.1399.068 توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی ارومیه تأیید شده است، از ۳۵ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با میانگین وزنی $197/46 \pm 15/55$ گرم استفاده شد که موش‌ها پس از القای دیابت به‌طور تصادفی در ۷ گروه (با ۵ سر موش در هر گروه) شامل دیابتی کنترل، دیابتی شم، دیابت+ تمرین هوازی+ مکمل، دیابت+ تمرین اینتروال+ مکمل، دیابت+ اینتروال، دیابت+ هوازی، دیابت+ مکمل قرار گرفتند. برای القای دیابت نوع ۲ از تزریق نیکوتین آمید و استرپتوزوتوسین استفاده شد. ابتدا نیکوتین آمید (۱۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن موش محلول در سالین) به‌صورت درون‌صفاقی تزریق شده و پس از ۱۵ دقیقه، ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم استرپتوزوتوسین که در محلول بافر سیترات ۰/۱ مولار با $4/5$ pH حل شده بود، به‌صورت درون‌صفاقی تزریق شد. برای تشخیص دیابتی بودن موش‌ها، ۵ روز پس از تزریق با ایجاد جراحت کوچک به‌وسیله لانس در دم حیوان یک قطره خون روی نوار گلوکومتری قرار داده شد و مقدار قند خون اندازه‌گیری و قند خون بالای ۲۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر به‌عنوان معیاری برای دیابتی شدن آنها بود (۲۰). رت‌های گروه تمرین اینتروال و مکمل اینتروال در یک پروتکل ۸ هفته‌ای با ۵ جلسه در هفته با شدت ۸۰ درصد VO_{2max} بر روی نوار گردان شروع به فعالیت کردند (جدول ۱). شایان ذکر است یک هفته قبل از شروع تمرینات به‌منظور آشنایی حیوانات با نوار گردان آنها با سرعت ۵ متر بر دقیقه و شیب صفر درجه و مدت زمان ۱۰ دقیقه شروع به فعالیت کرده و در پایان جلسه آشنایی به سرعت ۱۰ متر بر دقیقه و مدت زمان ۱۵ دقیقه رسیدند. در آغاز هر جلسه تمرینی با ۴ ست دودقیقه‌ای با سرعت ۱۸ متر بر دقیقه و با ۱ دقیقه استراحت فعال با سرعت ۶ متر بر دقیقه شروع شد و با افزایش ۱۰ درصدی در هر هفته ادامه یافت، به‌طوری‌که در آخرین جلسه تمرینی موش‌ها با نسبت سرعت ۲۰-۳۲ و زمان کل ۲۹ دقیقه به آزمون خاتمه دادند (۲۱). تعداد تکرارها (دوره) نیز هر هشت جلسه با یک تکرار بیشتر ادامه یافت. رت‌های گروه تمرین هوازی نیز در یک پروتکل ۸ هفته‌ای دویدن فزاینده روی نوار گردان و به مدت ۵ روز متوالی در

هفته با شدت حدود ۶۵ تا ۷۵ درصد Vo_{2max} شرکت کردند (جدول ۲). هفته اول موش‌ها با سرعت ۱۲ متر بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه شروع به فعالیت کردند و هر دو هفته شدت فعالیت ۴ متر بر دقیقه و مدت فعالیت ۵ دقیقه افزایش یافت تا در دو هفته آخر موش‌ها با سرعت ۲۴ متر بر دقیقه و زمان کل ۳۶ دقیقه به دویدن پرداختند. شیب نوار گردان به‌طور ثابت ۵ درصد در نظر گرفته شد. موش‌های گروه دیابتی کنترل نیز در طول دوره هشت هفته بر روی نوار گردان قرار گرفتند، ولی هیچ فعالیتی انجام ندادند (۲۲). در هر دو پروتکل سه دقیقه برای گرم کردن و سرد کردن با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه اختصاص یافت. هر دو پروتکل تمرینی مذکور براساس تلفیقی از پژوهش‌های انجام‌گرفته قبلی و تجربیات استادان دانشگاه طراحی شد. بعد از هر جلسه تمرینی گروه‌های مکمل روزانه ۳ میلی‌گرم آستاگزانتین به ازای هر کیلوگرم وزن بدن محلول در ۰/۳ میلی‌لیتر روغن زیتون به‌صورت گاوژ دریافت می‌کردند (۲۳) و در این مدت گروه شم روغن زیتون به‌عنوان دارونما دریافت کردند. مقایسه تمامی تغییرات گروه‌ها با گروه کنترل انجام گرفت. ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی (ناشتایی شبانه) موش‌های مورد مطالعه به‌واسطه تزریق داخل‌صفاقی مخلوط کتامین با دوز ۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و زایلوزین با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بی‌هوش شدند. سپس قفسه سینه حیوان شکافته شده و نمونه خونی به‌طور مستقیم از قلب گرفته شد. به‌منظور تهیه سرم مورد نیاز برای اندازه‌گیری‌های بعدی، نمونه‌های خونی با سرعت ۴۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از پرفیوژ قلب، بافت قلبی بطن چپ برداشته شده و در نیتروژن مایع فریز شده و برای آنالیزهای بعدی بعد از شست‌وشو در سالین نگه‌داشته شد.

با استفاده از تکنیک آزمایشگاهی وسترن بلات متغیرهای پژوهش اندازه‌گیری شدند. برای استخراج پروتئین‌های بافت قلب از بافر RIPA حاوی ۰/۰۵ میلی‌مولار بافر تریس با $PH=8$ ، ۱۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، ۰/۰۱ درصد اتیلن‌گلیکول تتراسدیک اسید و یک درصد سدیم دودسیل سولفات به اضافه ۰/۱ درصد آنتی پروتئاز کوکتیل استفاده شد. به این ترتیب که ۱۰۰ میلی‌گرم بافت بطن چپ در ۵۰۰ میکرولیتر بافر حاوی آنتی پروتئاز از طریق یک هموژنایزر دستی هموژن و نیم ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. سپس در یک سانتریفیوژ یخچال‌دار (Eppendorph 5415 R) در دور ۱۲۰۰۰ و ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس مایع رویی جمع‌آوری شد و غلظت آن با روش بردفورد در طول موج ۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در نهایت در ۲۰ درجه زیر صفر نگهداری شد، سپس هموژن به‌دست‌آمده به نسبت ۱:۱ با نمونه لودینگ بافر (۵۰ mM تریس کلرید هیدروژن، دو درصد سدیم دودسیل سولفات، ۱۰ درصد گلیسرول، پنج درصد بتا مرکاپتول و ۰/۰۰۵ درصد برموفنول آبی) مخلوط

شد. در ادامه نمونه‌ها به مدت پنج دقیقه جوشانده شد تا تمام پروتئین‌ها کاملاً دناتوره شوند. پروتئین‌ها با استفاده از الکتروفورز ژل SDS-Polyacrylamide جدا و به غشای نیترو سلولز منتقل شدند. غشا به مدت یک ساعت در پنج درصد سرم آلبومین گاوی در بافر تریس سالین و ۰/۱ درصد بافر تریس سالین توئین ۲۰ مسدود و در آنتی‌بادی اولیه Anti-Collagen IV antibody ab6586، Caspase-3 (D3R6Y)، Rabbit mAb Anti-Fibronectin antibody ab2413، β -Actin (C4): sc-47778، و انکو باسیون در آنتی‌بادی ثانویه Anti Rabbit با غلظت (۱:۱۰۰۰) روز بعد به مدت یک ساعت در دمای اتاق در چهار درصد TBST انجام گرفت. پروتئین‌ها (بعد از یک واکنش شیمیایی لومینسانس و تجزیه و تحلیل چگالی سنجی) با نرم‌افزار Image J اندازه‌گیری شدند (۲۴).

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Graph Pad Prism8 آنالیز شد و از آزمون تحلیل واریانس یک‌راهه به‌منظور بررسی اختلاف معناداری میانگین‌های بین گروه‌ها و در صورت معنادار بودن نتایج از آزمون تعقیبی توکی برای مقایسه زوج‌ها استفاده شد. سطح معناداری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

جدول ۱. پروتکل تمرین اینتروال

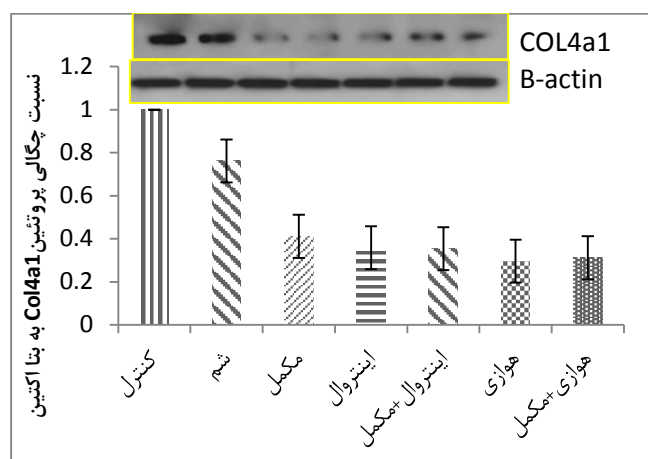
هفته	اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم	هفتم	هشتم
دامنه سرعت (متر بر دقیقه)	۶-۱۸	۸-۲۰	-۲۲	۱۲-۲۴	۱۴-۲۶	۱۶-۲۸	۱۸-۳۰	۲۰-۳۲
مدت اینتروال (دقیقه)	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲
مدت استراحت (دقیقه)	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
تعداد تکرار (دوره)	۴	۴-۵	۵	۵-۶	۶-۷	۷	۷-۸	۸

جدول ۲. پروتکل تمرین هوازی

هفته	اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم	هفتم	هشتم
سرعت (متر بر دقیقه)	۱۲	۱۲	۱۶	۱۶	۲۰	۲۰	۲۴	۲۴
مدت (دقیقه)	۱۵	۱۵	۲۰	۲۰	۲۵	۲۵	۳۰	۳۰
شیب (درصد)	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵

یافته‌ها

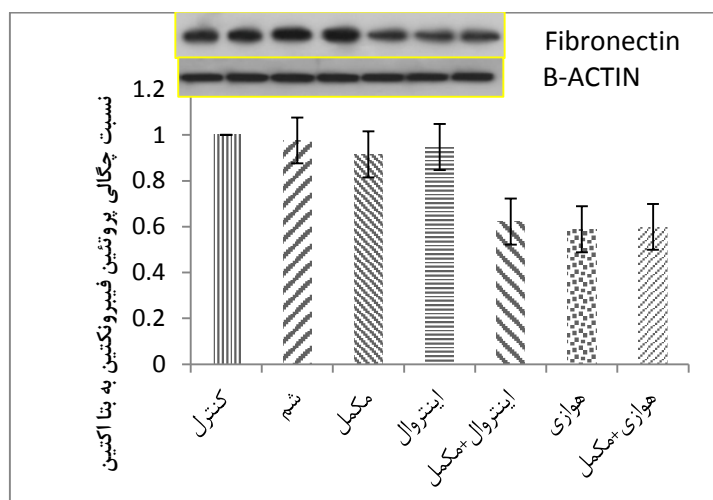
براساس نتایج آنالیز واریانس سطوح COL4a1 تفاوت معناداری را بین گروه‌ها نشان داد (شکل ۱). با توجه به نتایج آزمون تعقیبی توکی بین میانگین محتوای پروتئین COL4a1 قلبی گروه شم با گروه کنترل تفاوتی وجود نداشت ($P=0/07$). در مقایسه میانگین گروه مکمل با گروه کنترل کاهش معناداری وجود داشت ($P < 0/0001$). همچنین میانگین این شاخص در هر دو گروه تمرینی هوازی و اینتروال نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری را نشان داد (به ترتیب $P < 0/0001$ ، $P < 0/0001$) اما نسبت به میانگین گروه مکمل در هر دو گروه تفاوتی وجود نداشت (به ترتیب $P=0/72$ ، $P=0/99$). میانگین سطوح COL4a1 در هر دو گروه تمرین هوازی مکمل و اینتروال مکمل نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری داشت (به ترتیب $P < 0/0001$ ، $P < 0/0001$)، اما نسبت به گروه مکمل تفاوتی نداشتند (به ترتیب $P=0/83$ ، $P=0/98$).



شکل ۱. مقادیر کمی شده باندهای پروتئین COL4a1 در مقابل کنترل داخلی (بتا-اکتین)

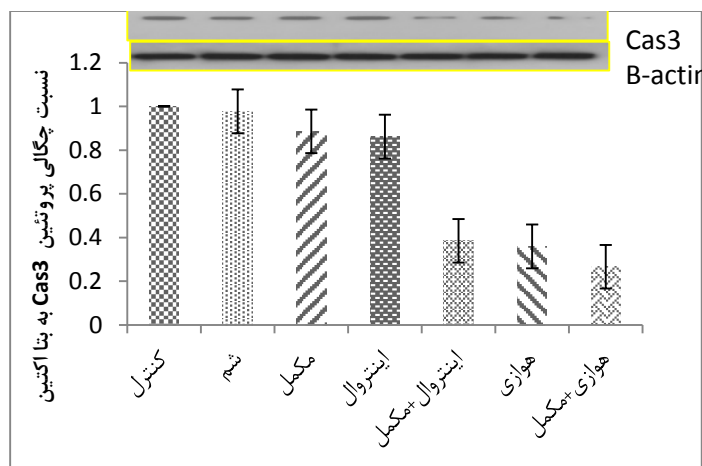
با توجه به نتایج آنالیز واریانس بین میانگین سطوح فیبرونکتین در گروه‌ها تفاوت معناداری وجود داشت (شکل ۲). براساس نتایج آزمون تعقیبی توکی بین میانگین محتوای پروتئین فیبرونکتین گروه شم با گروه کنترل تفاوتی مشاهده نشد ($P=0/99$). در مقایسه میانگین گروه مکمل با گروه کنترل نیز اختلافی وجود نداشت ($P=0/91$). میانگین این شاخص در گروه تمرینی هوازی نسبت به گروه کنترل و مکمل کاهش معناداری را نشان داد (به ترتیب $P=0/0001$ ، $P=0/009$)، اما بین میانگین گروه اینتروال با گروه

کنترل و مکمل تفاوتی وجود نداشت (به ترتیب $P=0/99$ ، $P=0/99$). میانگین سطوح فیبرونکتین در هر دو گروه تمرین هوازی مکمل و اینتروال مکمل نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری داشت (به ترتیب $P=0/002$ ، $P=0/001$). همچنین هر دو گروه ترکیبی نسبت به گروه مکمل کاهش معناداری را نشان دادند (به ترتیب $P=0/02$ ، $P=0/01$).



شکل ۲. مقادیر کمی شده باندهای پروتئین فیبرونکتین در مقابل کنترل داخلی (بتا-اکتین)

براساس نتایج آنالیز واریانس سطوح Cas3 نیز تفاوت معناداری را بین گروه‌ها نشان داد (شکل ۳). با توجه به نتایج آزمون تعقیبی توکی بین میانگین محتوای پروتئین cas3 گروه شم با گروه کنترل تفاوتی وجود نداشت ($P>0/99$). همچنین در مقایسه میانگین گروه مکمل با گروه کنترل اختلافی وجود نداشت ($P=0/73$). میانگین این شاخص در گروه تمرینی هوازی نسبت به گروه کنترل و مکمل کاهش معناداری را نشان داد (به ترتیب $P<0/0001$ ، $P=0/0001$)، اما بین میانگین گروه اینتروال با گروه کنترل و مکمل تفاوتی وجود نداشت (به ترتیب $P=0/55$ ، $P=0/99$). میانگین سطوح Cas3 در هر دو گروه تمرین هوازی مکمل و اینتروال مکمل نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری را نشان داد (به ترتیب $P<0/0001$ ، $P<0/0001$). همچنین در مقایسه میانگین هر دو گروه ترکیبی نسبت به گروه مکمل نیز کاهش معناداری مشاهده شد (به ترتیب $P<0/0001$ ، $P=0/0002$).



شکل ۳. مقادیر کمی شده باندهای پروتئین Cas3 در مقابل کنترل داخلی (بتا-اکتین)

بحث

در شرایط دیابتی محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته (AGEs) می‌توانند با مواجهه پروتئین‌ها و لیپیدها با سطوح گلوکز بالا و تعامل با پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی (ECM) تولید شده و با مختل کردن تجزیه ECM به وسیله ماتریکس متالوپروتئیناز موجب سفتی قلب شوند. همچنین تمایز فیبروبلاست‌ها را به میوفیبروبلاست‌ها بهبود بخشند که اختلال هموستاز ECM را با ترشح سایتوکین‌های التهابی و پروتئین‌های ماتریکس موجب می‌شود. علاوه بر این اختلال مکانیک قلبی به رهایش TGFβ، TNFα، آنژیوتانسین II منجر می‌شود که پاسخ‌های پروفیبروتیک را در فیبروبلاست‌ها و میوفیبروبلاست‌ها فعال می‌کند. فعال‌سازی سیگنالینگ TGFβ و Smad در میوفیبروبلاست‌ها افزایش رسوب پروتئین‌های ECM و ماکرومولکول‌های چندسلولی را موجب می‌شود که در اختلال عملکرد انقباضی قلب و اختلال سیستمیک تأخیری مشارکت دارد (۲۵).

مطالعات متعددی نشان داده‌اند که تمرینات ورزشی می‌تواند فیبروز میوکاردی را کاهش دهد و تغییرات ساختاری قلب و در نهایت عملکرد قلبی را در کاردیومیوپاتی دیابتی بهبود بخشد. تمرینات ورزشی همچنین فیبروز میوکاردی را با کاهش فشار خون کاهش می‌دهند. بنابراین کاهش ناشی از ورزش

- 1 . Extracellular matrix proteins
- 2 . Transforming Growth Factor Beta Receptor
- 3 . Tumor Necrosisi Factor Alpha

در فیبروز میوکاردی همبستگی بالایی با متابولیسم انرژی که شامل کاهش قند خون و رسوب گلیکوژن در قلب است، دارد (۲۶، ۲۷). به‌کارگیری مناسب‌ترین روش تمرین ورزشی به‌عنوان روش درمانی غیردارویی برای بیماران مستعد کاردیومیوپاتی دیابتی امر مهمی است، زیرا ممکن است شدت و حجم زیاد تمرین نتواند سازگاری لازم با استرس ناشی از دیابت نوع ۲ داشته باشد (۱۴). همان‌گونه که تمرینات کوتاه‌مدت استرس اکسیداتیو و فیبروز میوکاردی دیابتی را ممکن است وخیم‌تر کند (۲۸). در مقابل تمرینات هوازی طولانی‌مدت فیبروز میوکاردی ناشی از دیابت نوع ۲ را کاهش می‌دهد. همان‌طور که تمرینات شنا می‌تواند فیبروز میوکاردی را در رت‌ها با بهبود کامپلینس میوکاردی و تسهیل اختلال عملکردی میوکاردی ناشی از دیابت کاهش دهد (۲۹). در مطالعه حاضر محتوای پروتئین کلاژن و فیبرونکتین بافت قلبی در هر دو گروه تمرینی نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری داشت. در مطالعه وانگ و همکاران (۲۰۱۹) بر رت‌های دیابتی نوع ۲ در پی اجرای تمرینات هوازی طولانی‌مدت روی نوار گردان کسر حجم کلاژن (VCF)^۱ و فیبروز میوکاردی ۳۶ درصد کاهش یافت که همزمان با آن اختلال عملکرد قلبی ناشی از دیابت نوع ۲ معکوس شد. TGFβ سلولی با هورمون‌های فوق کلیه تنظیم می‌شود و تمرینات ورزشی با شدت پایین به‌طور معناداری سطوح آدرنالین را در جریان خون افراد دچار پرفشاری خونی و دیابت کاهش می‌دهد. علاوه بر این آنها کاهش بیان TGFβ1 را در میوکارد رت‌های دیابتی بعد از تمرین مشاهده کردند که موجب کاهش میزان فیبروز میوکاردی به‌واسطه مهار ترشح آدرنالین در رت‌های دیابتی می‌شود (۳۰، ۳۱).

همسو با یافته‌های ما هولووی و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که تمرینات استقامتی در مدل‌های حیوانی دچار پرفشاری خونی موجب کاهش ۴۰ درصدی فیبروز بطن چپ و افزایش ۲۰ درصدی در نسبت مویرگ به تار بطن چپ شد. در مقابل تمرینات تناوبی با شدت بالا نه‌تنها موجب کاهش فیبروز نشد، بلکه ۲۰ درصد افزایش در توده بطن چپ و ۲۰ درصد کاهش در ناحیه سطح مقطع عرضی نشان داد که با آنچه در یافته‌های ما نشان داده شد، در تناقض بود. با وجود تأثیرات مثبت تمرینات استقامتی، تمرینات اینتروال بطن چپ را به سازگاری‌های پاتولوژیک با افزایش فشار سوق می‌دهد (۳۲). شاید بتوان علت این تناقض یافته‌ها را در شدت تمرین اینتروال و جامعه مورد هدف بیان کرد.

1 . Collagen Volume Fraction

مطالعات با افزایش فیبرونکتین سلولی به عنوان فاکتور مهم اختلال عملکرد اندوتلیالی در دیابتی‌ها بیان کرده‌اند که فیبرونکتین سلولی جریان یافته ممکن است به عنوان پروتئین مارکر برای فعال سازی سلول‌های اندوتلیال به خصوص در دیابتی‌ها باشد (۳۳). در مطالعه‌ای که به بررسی تأثیر ۱۲ هفته تمرین هوازی بر فیبرونکتین سلولی و ارتباط آن با مقاومت انسولینی و وزن بدن در ۵۰ مرد دیابتی نوع ۲ با میانگین سنی ۴۸/۸ سال پرداخته بودند، کاهش فیبرونکتین سلولی و هموگلوبین گلیکوزیله، کاهش مقاومت انسولینی و کاهش توده بدنی دیده شد. همچنین همبستگی مثبت معناداری بین فیبرونکتین با شاخص توده بدنی وجود داشت. آنها بهبود سطوح فیبرونکتین را تأثیر تمرینات ورزشی بر تحریک تغییرات هموستاتیک در مقابل تغییرات ترومبوتیک بیان کردند. همچنین فیبرونکتین سلولی با اتصال به IGFBP-5 با تنظیم منفی عملکرد لیگاند وابسته به IGFBP-5 به واسطه تحریک پروتئولیز آن، مقاومت انسولینی را کاهش می‌دهد (۳۴). همراستا با این مطالعه در مطالعه حاضر نیز سطوح پروتئین فیبرونکتین در رت‌های دیابتی نوع ۲ کاهش معناداری را بعد از ۸ هفته تمرین هوازی نشان داد که موازی با کاهش مقاومت انسولینی بود.

بر اساس یافته‌های نووا و همکاران (۲۰۱۷) تمرینات اینتروال تأثیرات مثبتی بر تغییرات ساختاری قلبی که به وسیله کاهش در هایپرتروفی میوسیت‌ها و رسوب کلاژن (فیبروز) مشخص می‌شود، دارد، اما قادر به بازسازی محیط ردوکس نیتروزی نبود که می‌تواند به واسطه دستکاری‌های دارویی همانند آنتی‌اکسیدان‌ها و تترا هیدروبیوپتین بازسازی شود (۱۴). گل‌باشی و همکاران (۲۰۱۸) نیز در پی اجرای ۸ هفته تمرینات اینتروال بر رت‌های دچار ایسکمی رپرفیوژن دریافتند که بیان کلاژن ۱ و TGFB در گروه تمرین کاهش معناداری نشان داد. همچنین کسر تزریقی و کسر کوتاه‌شدگی در گروه تمرین ایسکمی افزایش یافت (۳۵). هافستاد و همکاران (۲۰۱۳) در مطالعه روی قلب رت‌های دیابتی نشان دادند که ۸ تا ۱۰ هفته تمرینات اینتروال و تمرینات با شدت متوسط با کاهش فیبروز و شاخص‌های استرس اکسیداتیو و نیز بهبود عملکرد انقباضی قلب موجب کاهش میزان کاردیومیوپاتی رت‌های دیابتی چاق شده با غذای چرب می‌شود که این اثر در تمرینات با شدت متوسط بیشتر بود (۳۶). اکبری و همکاران (۲۰۱۹) و بهپور و همکاران (۲۰۱۸) نیز کاهش فیبروز قلبی را گزارش کردند (۳۷، ۳۸). یافته‌های مطالعه حاضر همسو با مطالعات ذکر شده کاهش فیبروز بافت قلبی را بعد از هر دو شیوه تمرینی نشان دادند، با این تفاوت که این کاهش در گروه تمرینات هوازی نسبتاً بیشتر بود. تمرینات ورزشی می‌توانند میزان فیبروز

میوکاردی را با کاهش عواملی همانند استرس اکسیداتیو در میوکارد دیابتی‌ها و کاهش فعالیت رنین آنژیوتانسین و مهار AGEs کاهش دهند (۱۳، ۱۲).

یافته‌های مطالعه‌ای نشان داد که فعالیت ورزشی با کاهش فعال‌سازی کاسپاز ۹ آغازگر و کاسپاز ۳ می‌تواند از آپوپتوز و تخریب DNA از هر دو مسیر داخلی و خارجی پیشگیری کند (۳۹). در مطالعه حاضر سطوح کاسپاز ۳ متعاقب هر دو شیوه تمرینی بیان کاهشی را نشان داد، اما این تغییرات در گروه تمرینات اینتروال معنادار نبود. همسو با یافته‌های ما حبیبی و همکاران (۲۰۲۰) با مطالعه تأثیر برنامه تمرینی شنا و دیابت نوع ۲ بر بیان تعدادی فاکتورهای آنتی‌آپوپتوزی و آپوپتوزی و تغییرات کلیگوزن در بافت قلبی موش‌های اوواریکتومی شده دریافتند که تمرینات ورزشی از اختلالات قلبی پیشگیری می‌کند و بیان مارکرهای ضدآپوپتوزی *bcl2* و *mir-133* را افزایش و بیان *bax*، کاسپاز ۳ و کاسپاز ۸ را در قلب موش‌های اوواریکتومی شده کاهش می‌دهد. با توجه به این یافته‌ها می‌توان گفت که تمرینات ورزشی از طریق تعدیل *microRNA*ها می‌تواند افزایش استرس اکسیداتیو و تعدادی پروتئین‌های هدف در حیوانات دیابتی با چندین مسیر مولکولی را مهار کند و بدین ترتیب واسطه حفاظت قلبی باشد. از این‌رو تمرینات ورزشی به کاهش آپوپتوز و تغییرات ساختاری قلبی منجر می‌شود (۴۰). ورنکی و همکاران (۲۰۱۶) نیز دریافتند که تمرینات ورزشی با افزایش پتانسیل درون‌غشایی میتوکندریایی موجب کاهش رهایش سیتوکروم c به سیتوپلاسم می‌شود و بدین طریق از آپوپتوز کاردیومیوسیت‌ها پیشگیری می‌کند (۴۱). علاوه بر تعدیل مسیر داخلی آپوپتوز به واسطه تمرینات ورزشی، کاهش شاخص‌های آپوپتوزی کاسپاز ۳ موازی با کاسپاز ۸ به‌عنوان واسطه مسیر خارجی آپوپتوز در بافت کلیه رت‌های دیابتی در پی تمرینات ورزشی با شدت متوسط گزارش شد که علت آن کاهش بیان فاکتور التهابی *TNFa* و اثرگذاری مستقیم آن بر کاسپاز ۸ به‌دلیل تأثیرات ضدالتهابی کاهش وزن بدن متعاقب تمرینات ورزشی در موش‌های تمرین‌کرده بود (۴۲). نتایج تحقیقات کانتر و همکاران (۲۰۱۷) حاکی از آن بود که تمرینات با شدت کم تأثیرات درمانی روی تغییرات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی و آپوپتوزی ناشی از دیابت دارد (۴۳). در پی استرس و محرک خارجی آبشار سیگنالی متقابلی رخ می‌دهد. پروتئین کیناز b عامل اساسی در مسیر سیگنالینگ *PI3K* است که نقش اساسی در بسیاری از فرایندهای سلولی دارد. افزایش بیان این پروتئین مسیر آپوپتوز را با فسفوریلاسیون پروتئین‌های آنتی‌آپوپتوزی *bcl2* و غیرفعال کردن پروتئین‌های آپوپتوزی *bax* یا با کنترل مستقیم فعالیت کاسپاز مهار می‌کند. مطالعات از کاهش سطوح پروتئین کیناز b در نمونه‌های حیوانی دیابتی حکایت دارند (۴۴). علاوه بر این ورزش به‌عنوان مکانیسم حفاظت سلولی در برابر آپوپتوز نشان داد

که موجب افزایش بیان این پروتئین به ویژه در تمرینات هوازی می شود (۴۵). جی و همکاران (۲۰۱۳) نیز در مطالعه بر روی شبکه‌ی موش‌های صحرایی دیابتی، مهار و کاهش کاسپاز ۳ و سلول‌های آپوپتیک (TUNEL) را در پی اجرای تمرینات هوازی شش هفته‌ای بر روی نوار گردان نشان دادند (۴۶).

یافته‌ها حاکی از آن است که به دام انداختن گونه‌های اکسیژن واکنشی توسط کارتنوئیدها با افزایش پتانسیل آنتی‌اکسیدانی کارتنوئیدها افزایش می‌یابد. پتانسیل اکسیداسیونی آستاگزانتین به‌طور معناداری نسبت به بتا کاروتن بالاتر است، بنابراین میزان پاکسازی رادیکال‌های آزاد توسط آستاگزانتین بالاتر است و ویژگی پرواکسیداتیو را با کاهش Fe^{2+} به Fe^{3+} نشان می‌دهد (۴۷، ۴۸). در مطالعه‌ای نشان داده شد که آستاگزانتین از آپوپتوز پریسایت‌ها و تأخیر در توسعه و پیشرفت رتینوپاتی دیابتی در رت‌های دیابتی به‌واسطه کاهش تولید AGEs و رهایش سیتوکین‌های التهابی و شکستن کاسپاز ۳ به‌عنوان واسطه آپوپتوز پریسایت‌ها محافظت می‌کند (۴۹). Guo و همکاران (۲۰۱۸) در مطالعه‌ای نشان دادند که مکمل آستاگزانتین می‌تواند میانجی مسیر سیگنالینگ Nrf2 شود و بیان HO-1 و Nrf2 را بالا ببرد و بدین‌وسیله فعالیت SOD و T-AOC را افزایش دهد و سطح استرس اکسیداتیو و آپوپتوز میوکاردی ناشی از شش هفته تمرینات ورزشی شدید را کاهش دهد (۵۰) که همسو با این تحقیقات زو و همکاران (۲۰۱۹) نیز کاهش آپوپتوز کاردیومیوسیت‌ها را بعد از میکروامبولیزاسیون کرونری^۱ در پی مصرف آستاگزانتین در رت‌ها نشان دادند (۵۱). همچنین تأثیر حفاظت قلبی آستاگزانتین در کاردیومیوبلاست‌های H9c2 تیمار شده با گلوکز بالا با کاهش تولید گونه‌های واکنشی و کاهش فعالیت کاسپاز ۹ و ۳ به‌واسطه فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ Akt محقق می‌شود (۵۲). علاوه بر تأثیرات حفاظتی قلبی آستاگزانتین تأثیرات آنتی‌آپوپتوزی آن در قشر مغزی و هیپوکامپ رت‌های دیابتی با کاهش iNOS و کاسپاز ۹ و ۳ به بهبود عملکرد شناختی منجر شد (۵۳). اما ناهمسو با مطالعات انجام‌گرفته در مطالعه حاضر تأثیر مجزای مصرف مکمل بر کاهش سطوح کاسپاز ۳ دیده نشد که در بیان علت آن می‌توان دوز مصرفی مکمل و جامعه مورد مطالعه را هدف قرار داد که با نتایج تحقیقات کلیکنبرگ و همکاران همسو بود (۵۴).

در مطالعه حاضر محتوای پروتئین COL4A1 در گروه مکمل کاهش معناداری را نسبت به گروه کنترل نشان داد. آستاگزانتین با مهار مسیر فعال‌سازی Smad3 ناشی از TGF β در سلول‌های ستاره‌ای کبدی انسان (1x2) و همچنین ممانعت از فعال‌سازی سلول‌های ستاره‌ای کبدی موش‌ها از بیان ژن‌های

۱. میکروامبولیزاسیون کرونری با انسداد فیزیکی در مسیر ریزگردش عروق کرونری ایجاد می‌شود.

پروفیبروزنیک پیشگیری می‌کند (۵۵). مطالعات شن و همکاران نیز بر فیبروز کبدی ایجاد شده در موش‌ها با استفاده از CCL4 و در پی مصرف دوزهای مختلف آستاگزانتین (۲۰،۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) نشان داد که آستاگزانتین با مهار فعال‌سازی سلول‌های ستاره‌ای کبدی و تشکیل پروتئین‌های ماتریکس خارج‌سلولی با کاهش بیان NF-KB و TGFβ1 و حفظ تعادل بین MMP2 و TIMP1 و با کاهش پاسخ اتوفازی به کاهش فیبروز کبدی منجر می‌شود (۵۶). همچنین در مطالعه‌ای روی رت‌های دیابتی، ۱۲ هفته مصرف آستاگزانتین تغییرات مورفولوژیکی در کلیه را به‌واسطه کاهش بیان پروتئین فیبرونکتین و کلاژن IV از طریق مسیر سیگنالینگ Nrf2-ARE بهبود بخشید (۵۷). مطالعه حاضر نیز در بخشی همسو با مطالعه زو و همکاران کاهش کلاژن IV را در پی مصرف آستاگزانتین نشان داد، اما ناهمسو با مطالعه زو و همکاران مصرف مکمل در تغییر محتوای پروتئین فیبرونکتین با گروه کنترل تفاوت معناداری ایجاد نکرد که می‌توان علت این ناهمسوئی را در مدت زمان و دوز مصرفی مکمل و بافت مورد مطالعه جست‌وجو کرد.

همسو با پژوهش حاضر در مطالعه‌ای بر روی موش‌ها با ایجاد فیبروز قلبی به‌وسیله انقباض عرضی آئورت، مصرف آستاگزانتین به مدت ۱۲ هفته سبب بهبود عملکرد قلبی شد و فیبروز قلبی را به‌واسطه کاهش فسفوریلاسیون و داستیلاسیون R-SMADs کاهش داد. SIRT1 که بیان آن از طریق آستاگزانتین افزایش می‌یابد، در عملکرد حفاظتی آستاگزانتین با کاهش داستیلاسیون R-SMADs مشارکت دارد (۵۸). علاوه بر تأثیر مجزای هر یک از متغیرهای مستقل بر میزان فیبروز بافت قلبی، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تأثیر ترکیبی تمرین با مکمل نیز کاهش فاکتورهای آپوپتوزی و فیبروزی را در بافت قلب به‌همراه دارد که احتمالاً به‌دلیل تأثیرات هم‌افزایی هر دو عامل تمرین و مکمل نسبت به اثر مجزای هر کدام از عوامل است. با توجه به اثرگذاری متغیر تمرینات ورزشی با شدت‌های متفاوت بر فیبروز بافت قلبی که در برخی مواقع بروز استرس اکسیداتیو را به‌دنبال دارد، لزوم به‌کارگیری مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی قوی همانند آستاگزانتین بیش از پیش احساس می‌شد تا این اثر احتمالی مخرب را خنثی کند، همان‌گونه که عدم تأثیرگذاری معنادار مکمل آستاگزانتین بر محتوای پروتئین کاسپاز ۳ و فیبرونکتین و کاهش معنادار مشهود هر دو شاخص در گروه ترکیبی، می‌تواند تأییدی بر تأثیر هم‌افزایی هر دو عامل تمرین و مکمل باشد.

1 . Transverse aortic constriction(TAC)

منابع و مأخذ

1. Miki T, Yuda S, Kouzu H, Miura T. Diabetic cardiomyopathy: pathophysiology and clinical features. *Heart failure reviews*. 2013;18(2):149-66.
2. Huynh K, Kiriazis H, Du X-J, Love JE, Gray SP, Jandeleit-Dahm KA, et al. Targeting the upregulation of reactive oxygen species subsequent to hyperglycemia prevents type 1 diabetic cardiomyopathy in mice. *Free Radical Biology and Medicine*. 2013;60:307-17.
3. Sari FR, Watanabe K, Thandavarayan RA, Harima M, Zhang S, Muslin AJ, et al. 14-3-3 protein protects against cardiac endoplasmic reticulum stress (ERS) and ERS-initiated apoptosis in experimental diabetes. *Journal of pharmacological sciences*. 2010;113(4):325-34.
4. Gao L, Huang K, Jiang D-S, Liu X, Huang D, Li H, et al. Novel role for caspase-activated DNase in the regulation of pathological cardiac hypertrophy. *Hypertension*. 2015;65(4):871-81.
5. Byrne NM, Hills AP. The importance of physical activity in the growth and development of children. *Children, obesity and exercise Prevention, treatment and management of childhood and adolescent obesity*. 2007:50-60.
6. Chen S, Puthanveetil P, Feng B, Matkovich SJ, Dorn GW, Chakrabarti S. Cardiac miR-133a overexpression prevents early cardiac fibrosis in diabetes. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2014;18(3):415-21.
7. Li Y, Zhong Y, Gong W, Gao X, Qi H, Liu K, et al. C-peptide prevents SMAD3 binding to alpha promoters to inhibit collagen type IV synthesis. *Journal of molecular endocrinology*. 2018;61(1):47-56.
8. Russo I, Frangogiannis NG. Diabetes-associated cardiac fibrosis: cellular effectors, molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2016;90:84-93.
9. Marwick TH, Hordern MD, Miller T, Chyun DA, Bertoni AG, Blumenthal RS, et al. Exercise training for type 2 diabetes mellitus: impact on cardiovascular risk: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2009;119(25):3244-62.
10. Douairon Lahaye SL, Rannou Bekono F, Broderick T. Physical activity and diabetic cardiomyopathy: myocardial adaptation depending on exercise load. *Current Diabetes Reviews*. 2014;10(6):371-90.
11. Chengji W, Xianjin F. Exercise protects against diabetic cardiomyopathy by the inhibition of the endoplasmic reticulum stress pathway in rats. *Journal of cellular physiology*. 2019;234(2):1682-8.
12. Bostick B, Aroor AR, Habibi J, Durante W, Ma L, DeMarco VG, et al. Daily exercise prevents diastolic dysfunction and oxidative stress in a female mouse model of western diet induced obesity by maintaining cardiac heme oxygenase-1 levels. *Metabolism*. 2017;66:14-22.
13. Kemuriyama T, Tandai-Hiruma M, Kato K, Ohta H, Maruyama S, Sato Y, et al. Endogenous angiotensin II has fewer effects but neuronal nitric oxide synthase has

- excitatory effects on renal sympathetic nerve activity in salt-sensitive hypertension-induced heart failure. *The Journal of Physiological Sciences*. 2009;59(4):275-81.
14. Novoa U, Arauna D, Moran M, Nuñez M, Zagmutt S, Saldivia S, et al. High-intensity exercise reduces cardiac fibrosis and hypertrophy but does not restore the nitroso-redox imbalance in diabetic cardiomyopathy. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2017;2017.
 15. Powers SK, Quindry JC, Kavazis AN. Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radical Biology and Medicine*. 2008;44(2):193-201.
 16. Ambati RR, Phang S-M, Ravi S, Aswathanarayana RG. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications—a review. *Marine drugs*. 2014;12(1):128-52.
 17. Park CH, Xu FH, Roh S-S, Song YO, Uebaba K, Noh JS, et al. Astaxanthin and Corni Fructus protect against diabetes-induced oxidative stress, inflammation, and advanced glycation end product in livers of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Medicinal Food*. 2015;18(3):337-44.
 18. Li W, Hellsten A, Jacobsson LS, Blomqvist HM, Olsson AG, Yuan X-M. Alpha-tocopherol and astaxanthin decrease macrophage infiltration, apoptosis and vulnerability in atheroma of hyperlipidaemic rabbits. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2004;37(5):969-78.
 19. Alam MN, Hossain MM, Rahman MM, Subhan N, Mamun MAA, Ulla A, et al. Astaxanthin prevented oxidative stress in heart and kidneys of isoproterenol-administered aged rats. *Journal of Dietary Supplements*. 2018;15(1):42-54.
 20. Eizadi M, Ravasi A, Soori R, Baesi K, Choubineh S. Effect of three months aerobic training on TCF7L2 expression in pancreatic tissue in type 2 diabetes rats induced by streptozotocin-nicotinamide. *Feyz Journal of Kashan University of Medical Sciences*. 2017;21.
 21. Fattahi Bafghi A, Homae HM, Azarbayjani MA. Effects of high intensity interval training and curcumin supplement on antioxidant enzyme in heart tissue of diabetic rats. *Iranian Journal of Diabetes and Obesity*. 2016;8(3):135-41.
 22. Kazemi F, Zahedi Asl S. Atni-inflammation effect of 8-week aerobic training on apelin plasma concentration in diabetic male rats. *Iranian Journal of Diabetes and Metabolism*. 2017;16(2):85-93.
 23. Yeh P-T, Huang H-W, Yang C-M, Yang W-S, Yang C-H. Astaxanthin inhibits expression of retinal oxidative stress and inflammatory mediators in streptozotocin-induced diabetic rats. *PLoS One*. 2016;11(1):e0146438.
 24. SherafatiMoghadam M, Salesi M, Daryanoosh F, HematiNafar M, Fallahi A. The effect of 4 weeks of high intensity interval training on the content of AKT1, mTOR, P70S6K1 and 4E-BP1 in soleus skeletal muscle of rats with type 2 diabetes: An experimental study. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*. 2018;17(9):843-54.
 25. Tan Y, Zhang Z, Zheng C, Wintergerst KA, Keller BB, Cai L. Mechanisms of diabetic cardiomyopathy and potential therapeutic strategies: preclinical and clinical evidence.

- Nature Reviews Cardiology. 2020;1-23.
26. 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-1 α and Akt activation. *Cellular physiology and biochemistry*. 2015;35(6):2159-68.
 27. Zheng J, Cheng J, Zheng S, Zhang L, Guo X, Zhang J, et al. Physical exercise and its protective effects on diabetic cardiomyopathy: what is the evidence? *Frontiers in endocrinology*. 2018;9:729.
 28. Laher I, Beam J, Botta A, Barendregt R, Sulistyoningrum D, Devlin A, et al. Short-term exercise worsens cardiac oxidative stress and fibrosis in 8-month-old db/db mice by depleting cardiac glutathione. *Free radical research*. 2013;47(1):44-54.
 29. da Silva E, Natali AJ, da Silva MF, de Jesus Gomes G, da Cunha DNQ, Toledo MM, et al. Swimming training attenuates the morphological reorganization of the myocardium and local inflammation in the left ventricle of growing rats with untreated experimental diabetes. *Pathology-Research and Practice*. 2016;212(4):325-34.
 30. Qin Q, Feng J, Hu C, Chen X, Qin L, Li Y. Low-intensity aerobic exercise mitigates exercise-induced bronchoconstriction by improving the function of adrenal medullary chromaffin cells in asthmatic rats. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2014;234(2):99-110.
 31. Wang S-Q, Li D, Yuan Y. Long-term moderate intensity exercise alleviates myocardial fibrosis in type 2 diabetic rats via inhibitions of oxidative stress and TGF- β 1/Smad pathway. *The Journal of Physiological Sciences*. 2019;69(6):861-73.
 32. Holloway TM, Bloemberg D, da Silva ML, Simpson JA, Quadrilatero J, Spriet LL. High intensity interval and endurance training have opposing effects on markers of heart failure and cardiac remodeling in hypertensive rats. *PloS one*. 2015;10(3):e0121138.
 33. Lockwood CJ, Peters JH. Increased plasma levels of ED1+ cellular fibronectin precede the clinical signs of preeclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1990;162(2):358-62.
 34. Alghadir AH, Gabr SA, Al-Eisa E. Cellular fibronectin response to supervised moderate aerobic training in patients with type 2 diabetes. *Journal of physical therapy science*. 2016;28(4):1092-9.
 35. Golbashi R, Gaeini A, Kordi MR, Aboutaleb N, Ghardashi Afousi A. Effect of one period of high-intensity interval training on myocardial collagen-1 and TGF- β 1 and cardiac function in post ischemia-reperfusion rats. *Daneshvar*. 2018;25(135):65-74.
 36. Hafstad AD, Lund J, Hadler-Olsen E, Höper AC, Larsen TS, Aasum E. High-and moderate-intensity training normalizes ventricular function and mechanoenergetics in mice with diet-induced obesity. *Diabetes*. 2013;62(7):2287-94.
 37. Akbari N, Azarbayjani MA, Delfan M. Comparison of the effect of 8 weeks of continuous and high intensity interval training on the gene expression of TIMP-2 and MMP-2 in male diabetic rats. *Razi Journal of Medical Sciences*. 2019;26(10):0-.
 38. Samiei A, Behpour N, Tadibi V, Fathi R. Effect of eight weeks of aerobic training on some myocardial fibrosis indices in cardiac muscle of diabetic rats. *Annals of Applied Sport*

- Science. 2018;6(4):1-8.
39. Chen K-C, Peng C-C, Hsieh C-L, 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;2013.
40. Habibi P, Alihemmati A, Ahmadiasl N, Fateh A, Anvari E. Exercise training attenuates diabetes-induced cardiac injury through increasing miR-133a and improving pro-apoptosis/anti-apoptosis balance in ovariectomized rats. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2020;23(1):79-85.
41. 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.
42. Ghosh S, Khazaei M, Moien-Afshari F, Ang LS, Granville DJ, Verchere C, et al. Moderate exercise attenuates caspase-3 activity, oxidative stress, and inhibits progression of diabetic renal disease in db/db mice. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2009;296(4):F700-F8.
43. Kanter M, Aksu F, Takir M, Kostek O, Kanter B, Oymagil A. Effects of low intensity exercise against apoptosis and oxidative stress in Streptozotocin-induced diabetic rat heart. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*. 2017;125(09):583-91.
44. 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.
45. Libonati JR. Cardiac effects of exercise training in hypertension. *ISRN Hypertension*. 2013;2013.
46. Ji E-S, Ko I-G, Cho J-W, Davis RW, Hwang G-Y, Jee Y-S, et al. Treadmill exercise inhibits apoptotic neuronal cell death with suppressed vascular endothelial growth factor expression in the retinas of the diabetic rats. *Journal of exercise rehabilitation*. 2013;9(3):348.
47. Polyakov NE, Leshina TV, Konovalova TA, Kispert LD. Carotenoids as scavengers of free radicals in a Fenton reaction: antioxidants or pro-oxidants? *Free Radical Biology and Medicine*. 2001;31(3):398-404.
48. Focsan AL, Pan S, Kispert LD. Electrochemical study of astaxanthin and astaxanthin n-octanoic monoester and diester: Tendency to form radicals. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2014;118(9):2331-9.
49. Yang M, Zhao T, Deng T, Wang Z. Protective effects of astaxanthin against diabetic retinal vessels and pro-inflammatory cytokine synthesis. *Int J Clin Exp Med*. 2019;12(5):4725-34.
50. Guo X, Cao J, Wang Y, Zhou H, Zhang J, Niu Y, et al. PL-011 astaxanthin reduces high intensity training induced myocardial cell apoptosis via activating Nrf2 in rats. *Exercise Biochemistry Review*. 2018;1(1).
51. Xue Y, Sun C, Hao Q, Cheng J. Astaxanthin ameliorates cardiomyocyte apoptosis after coronary microembolization by inhibiting oxidative stress via Nrf2/HO-1 pathway in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2019;392(3):341-8.
52. Hu Y, Shen L, Li L, Li M, Yin W, Liu W, et al. Astaxanthin protects against diabetic

- cardiomyopathy via activation of Akt pathway in H9c2 cells. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2018;17(11):2151-6.
53. Li X, Qi Z, Zhao L, Yu Z. Astaxanthin reduces type 2 diabetic-associated cognitive decline in rats via activation of PI3K/Akt and attenuation of oxidative stress. *Molecular medicine reports*. 2016;13(1):973-9.
54. Klinkenberg LJ, Res PT, Haenen GR, Bast A, van Loon LJ, van Diejen-Visser MP, et al. Effect of antioxidant supplementation on exercise-induced cardiac troponin release in cyclists: a randomized trial. *PLoS One*. 2013;8(11).
55. Yang Y, Kim B, Park Y-K, Koo SI, Lee J-Y. Astaxanthin prevents TGF β 1-induced pro-fibrogenic gene expression by inhibiting Smad3 activation in hepatic stellate cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2015;1850(1):178-85.
56. Shen M, Chen K, Lu J, Cheng P, Xu L, Dai W, et al. Protective effect of astaxanthin on liver fibrosis through modulation of TGF-1 expression and autophagy. *Mediators of inflammation*. 2014;2014.
57. Zhu X, Chen Y, Chen Q, Yang H, Xie X. Astaxanthin promotes Nrf2/ARE signaling to alleviate renal fibronectin and collagen IV accumulation in diabetic rats. *Journal of diabetes research*. 2018;2018.
58. Zhang J, Wang Q-z, Zhao S-h, Ji X, Qiu J, Wang J, et al. Astaxanthin attenuated pressure overload-induced cardiac dysfunction and myocardial fibrosis: Partially by activating SIRT1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2017;1861(7):1715-28.

An Evaluation of Changes in Cas3, Fibronectin and CoL4a1 Protein Contents following Aerobic and Interval Training with Astaxanthin Supplementation in Heart Tissue of Type 2 Diabetic Rats

Nasrin Ebadi¹ - Mohammad Reza Zolfaghari^{*2} - Firouz Ghaderi Pakdel³

1.PhD of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Urmia University, Urmia, Iran 2. Assistant Professor of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Urmia University, Urmia, Iran 3. Associate Professor of Physiology, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

(Received: 2020/07/23; Accepted: 2020/11/29)

Abstract

Diabetes, as a chronic metabolic disorder with a high prevalence, highlights the importance of ongoing research and the need for new methods to prevent and treat this epidemic disease. The aim of this study was to evaluate the changes in fibrosis and apoptosis of heart tissue in diabetic rats following two types of aerobic and interval training with astaxanthin supplementation. 35 male rats were randomly divided into 7 groups after induction of diabetes: diabetes control, diabetes sham, diabetes+aerobic training+supplement, diabetes+interval training+supplement, diabetes+interval training, diabetes+aerobic training, diabetes+supplement. Interval training was performed on the treadmill for 8 weeks, 5 sessions per week with an intensity of 80% vo2max and aerobic training was performed on a treadmill with an intensity of 65-75% Vo2max. The protein contents of Cas3, COL4a1 and fibronectin were measured by Western blotting technique. COL4a1 protein content in both training and combined groups and supplement group showed a significant decrease compared with the control group. Also, the protein contents of Cas3 and fibronectin in the combined and aerobic groups significantly reduced compared to the control group, but there was no significant difference in the content of these proteins between the supplement and interval groups compared to the control group. It seems that the synergistic effects of training with different intensities along with astaxanthin supplementation prevent the upward trend of apoptosis and fibrosis in the heart tissue of diabetic rats and its subsequent complications such as diabetic cardiomyopathy.

Keywords

astaxanthin, diabetes, diabetic cardiomyopathy, rat, training.

* Corresponding Author: Email: zolfaghari60@gmail.com ; Tel: +989143413941