دوفصلنامه سوخت و ساز و فعالیت ورزشی
سال نهم، جلد نهم، شماره ۲

تاثیر ۸ هفته تمرینات مقاومتی بر سطوح مارکرهای آپوپتوز قلبی رت‌های دیابتی

حمیده منتظری طالقانی[۱]، نادر شاکری[۲*]،خسرو ابراهیم[۳]، رحمن سوری[۴]، ماندانا غلامی[۲]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۵/۳۰

چکیده

هدف: علت عمده مرگ‌ومیر مربوط به دیابت، بیماریهای قلبی عروقی است که در این فرآیند آپوپتوز نقش عمده ای ایفا می کند. با توجه به اینکه فعالیت بدنی میتواند از قلب در برابر آسیب های ناشی از آپوپتوز حفاظت کند، این مطالعه اثر ۸ هفته تمرین مقاومتی بر مارکرهای آپوپتوز سلول های قلب رت های دیابتی شده را مورد بررسی قرار داده است.

روش‌شناسی: تعداد۲۰ سر رت صحرایی نر نژاد ویستار، با سن تقریبی ۸ هفته، محدوده وزنی ۲۵۰-۲۱۰ گرم به دو گروه مساوی تقسیم شدند. دیابت با تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین (۵۰ kg/mg) در گروه های دیابتی ایجاد گردید. گروه تمرین مقاومتی روی نردبانی با شیب ۸۰ درجه و با وزنه ای برابر ۳۰-۱۰۰ ٪ وزن بدنشان، تمرین کردند. در مقابل گروه کنترل بدون تمرین ماندند. برای بررسی سازگاری تمرین مقاومتی، نمونه خون و بافت قلب رتها جمع آوری شد. مقادیر گلوکز، انسولین، شاخص مقاومت به انسولین سرمی و سطوح بیان ژن Bax caspase 8, Bcl-2 و نسبت Baxبه Bcl-2 ارزیابی شد.

یافته‌ها: در رتهای دیابتی ۸ هفته تمرین مقاومتی منجر به کاهش معنی داری در بیان ژن Baxو نسبت bax به Bcl-2 (p=0/000) وافزایش معنی داری در Bcl-2 (p=0/000) و caspase 8 (p=0/004) نسبت به گروه کنترل شد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان می دهد تمرینات مقاومتی می تواند به عنوان یک راه کار غیر دارویی برای کاهش عوارض آپوپتوز سلول های قلبی در افراد دیابتی مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: دیابت نوع ۲، آپوپتوز، تمرین مقاومتی ، بیان ژن.

۱. دانشجوی دکترای فیزیولوژی ورزشی، ۲. استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ۳. استاد دانشگاه شهید بهشتی، ۴. دانشیار دانشگاه تهران

*نشانی الکترونیک نویسندهٔ مسئول: nsprofsport@gmail.com

مقدمه

دیابت ملیتوس شایعترین بیماری متابولیکی است که علت وقوع آن کمبود مطلق یا نسبی انسولین می باشد(۱) از رخدادهای متعاقب این بیماری می‌توان به بیماری‌های قلبی عروقی (CVD)[1](۲) کلیوی، سکته مغزی، آسیب شبکیه، نوروپاتی محیطی، اختلالات روانشناختی و کاهش کیفیت زندگی اشاره کرد(۳). CVD علت اصلی مرگ و میر مرتبط با دیابت است که شیوع آن در میان افراد دیابتی ۲ تا ۵ برابر افراد سالم است(۴) آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی نوعی فرآیند تحت کنترل ژن ها است که در حذف سلول‌های ناخواسته یا غیرضروری در موجودات زنده نقش دارد(۵) یافته های متون علمی حاکی از آن است که القاء آپوپتوز به عنوان یکی از آسیب های دیابت به دنبال فعال سازی اجزاء مسیر آپوپتوز و فعالیت کاسپازها[2]در میوکارد پدید می آید. بر همین اساس مرگ سلول های میوکارد به عنوان یک اتفاق مهم در پیشرفت آسیب قلبی ناشی از دیابت شناخته شده است(۶).

میتوکندری محل استقرار بسیاری از پروتئین-های درگیر در مراحل اولیه آپوپتوز (مسیر داخلی) از جمله اعضای خانواده Bcl-2 است(۷) پروتئین‌های خانواده Bcl-2[3]و Bax[4] به ترتیب نقش بازدارنده و آغازگر در وقوع آپوپتوز دارند. Bcl-2 در مهار رهایش سیتوکروم C از میتوکندری نقش دارد. سطوح بالای Bcl-2 نسبت به Bax بقاء سلول را افزایش می‌دهد، درحالی‌که نسبت معکوس آنها مرگ سلولی را به دنبال دارد(۸). مطالعات نشان می دهد فعالیت بدنی به عنوان بخش کلیدی برنامه توانبخشی قلبی (CR)[5] در بیماران CVD تجویز می شود چرا که با حفاظت از قلب در برابر آسیب های جدی و بهبود عملکرد قلب، به عنوان یک درمان غیر دارویی خطر ابتلا به CVD را کاهش می دهد(۹) .در مطالعه ای که به بررسی آپوپتوز افزایش یافته قلب رت های دیابتی انجام شده بود مشاهده شد ۱۰ هفته تمرین هوازی روی تردمیل می تواند قلب را در برابر وقوع آپوپتوز محافظت کند(۱۰) یونگ کیم و همکاران از تمرینات هوازی به عنوان یک استراتژی مؤثر برای تأخیر یا جلوگیری از شروع آپوپتوز سلول های عصبی شبکیه چشم بیماران دیابتی یاد کردند. آنها مشاهده کردند تمرین استقامتی می تواند فعالیت Bax و کاسپاز- ۳را سرکوب کند و بواسطه افزایش Bcl-2 ، در رتین ها آپوپتوز به طور چشمگیری کاهش می یابد(۱۱). نووا و همکاران نشان دادند تمرین ورزشی با شدت بالا تاثیرات مثبتی روی ریمادلینگ قلبی در کاهش هایپرتروفی و فیبروز میوسیتها دارد و موجب افزایش آپوپتوز در میوکارد می گردند(۱۲). دوستار و همکاران نیز گزارش کردند ۴ هفته تمرین مقاومتی (۱۲ تکرار، ۵ روز در هفته) به قلب رت های صحرایی آسیب نمی رساند، چراکه سطح آپوپتوز در آن مطالعه تغییر چندانی نکرد(۱۳) با وجود اینکه مطالعات متعددی اثربخشی تمرینات ورزشی را بر کاهش آپوپتوز (۱۴)، بهبود متابولیسم گلوکز (۱۵) همچنین

[1] Cardiovascular disease
[2] Caspase
[3] B-cell lymphoma2
[4] BCL2-associated X protein
[5] Cardiac Rehabilitation

کاهش خطر ابتلا به CVD (۱۶) تایید نموده اند ولی کمتر مطالعه ای اثر تمرینات مقاومتی بر مسیرهای سیگنالینگ داخلی و خارجی مؤثر در آپوپتوز بافت قلب مبتلایان به دیابت را بررسی کرده است. لذا مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر تمرین مقاومتی روی سطوح برخی مارکرهای آپوپتوز قلبی دررت های دیابتی پرداخت.

روش پژوهش

نمونه های مورد مطالعه و محیط پژوهش: جامعه آماری مطالعه تجربی حاضر رت های صحرایی نر نژاد ویستار بودند که از محل تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه بقیه الله خریداری شدند. از میان آنها ۲۰ سر رت ۱۰-۸ هفته‌ای با وزن ۲۵۰-۲۱۰ گرم به عنوان آزمودنی انتخاب شدند. کلیه آزمودنی ها در قفس‌هایی از جنس پلی کربنات شفاف ساخت شرکت رازی راد و در محیطی با دمای ۲±۲۲ درجه سانتی گراد و چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته و رطوبت بین ۲۵-۳۰ درصد نگه داری شدند. پس از انتقال آزمودنی ها به آزمایشگاه و آشنایی با راه رفتن روی نردبان مخصوص جوندگان، به صورت تصادفی در دو گروه دیابتی (کنترل) و گروه دیابتی با تمرین مقاومتی (آزمایش) جایگزین شدند.

روش دیابتی کردن رت ها: در ابتدا اقدامات لازم برای دیابتی کردن آزمودنی ها انجام شد. القای دیابت با استفاده از داروی نیکوتین آمید (۹۵میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن رت) که در محلول سالین حل شده بود، و سپس پس از۱۵ دقیقه استرپتوزوتوسین stz (۵۵ میلی گرم بر کیلوگرم) تهیه شده از شرکت Sigma-Aldrich کشور آلمان که در محلول بافر سیترات ۰/۱ مولار با ph برابر۴/۵ حل شده بود به شکل درون صفاقی تزریق شد. ۵ روز پس از تزریق به منظور تشخیص دیابتی بودن رت ها، با ایجاد جراحت کوچک توسط لانست در دم حیوان یک قطره خون بر روی نوار گلوکومتری(ساخت شرکت Medisignکره جنوبی) قرار داده شد و غلظت گلوکز خون اندازه گیری گردید. غلظت گلوکز خون ناشتا برابر ۲۵۰-۴۰۰ میلی گرم بر دسی لیتر حاکی از دیابتی شدن آن‌ها است.(۱۷)

پروتکل تمرین مقاومتی: برنامه تمرینی گروه آزمایش شامل ۸ هفته و هر هفته ۵ روز تمرین مقاومتی بود. ابتدا به منظور آشنایی آزمودنی های این گروه با نردبان مقاومتی، ۱ هفته در شرایطی که وزنه به قاعده دم رت ها بسته شده بود با وزنه‌ای برابر ۳۰٪ وزن بدن شان شروع به صعود از نردبان مقاومتی با ارتفاع یک متر، شیب ۸۵ درجه و فاصله بین پله‌های نردبان ۳ سانتی متر کردند. به گونه ای که روزانه ۱۰ تکرار با فواصل استراحتی ۹۰ ثانیه‌ای تمرین را اجرا می-کردند. وزن اضافه بار بدون تغییر در تعداد نوبت‌ها و تکرارها به ۱۰۰٪ وزن بدنشان رسید. به منظور گرم کردن و سرد کردن، ۳ تکرار بدون وزنه اجرا می شد(۱۸)

تشریح رت ها و نمونه برداری بافت ها: 48ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، رت های هر گروه پس از ۱۰ تا ۱۲ ساعت ناشتایی ابتدا وزن کشی شدند و سپس با تزریق داخل صفاقی مخلوط کتامین(۱۰ ٪ و دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و زایلوزین(2٪ و دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) بی هوش شدند. پس از ایجاد شکاف در قسمت قدامی قفسه سینه بافت قلب

استخراج و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد و سپس در یخچال ۸۰- نگهداری شد. نمونه های خونی گرفته شد و برای جلوگیری از همولیز شدن بلافاصله در لوله‌های حاوی EDATA ریخته شده و به آرامی مخلوط شدند و بخش دیگر نمونه های خونی در لوله های لخته برای اندازه گیری مقادیر انسولین و گلوکز ریخته شدند در ادامه بافت بطن قلب رت ها نمونه برداری شده و پس از شستشو در سرم فیزیولوژیک در میکروتیوب های ۸/۱ حاوی مایع[1] RNAlater^{TM} با نسبت ۲۰ درصد غوطه ور گردید و جهت انجام آزمایش های ژنتیک به آزمایشگاه انتقال داده شد. مقادیر پلاسمایی انسولین با استفاده از کیتELISA (ZELBIO ساخت آلمان حساسیت ۰/۱۵ میوگرم در لیتر) , تعیین شدند. برای تعیین شاخص مقاومت انسولین از فرمول HOMA-IR استفاده شد.(۱۹)

$$\text{HOMA-R} = \frac{\text{Fasting Insulin (}\mu\text{U/ml) X Fasting Glucose (mmol/l)}}{22.5}$$

طراحی , آماده سازی پرایمر

پرایمر Reverse در کیت وجود دارد.اما پرایمر Forward باید طراحی شود. در واقع پرایمر Forward همان توالی بالغ میکرو RNA است لیکن باید از لحاظ ذوب (Tm) بررسی گردد و در صورت هماهنگ نبودن دمای ذوب آن با پرایمر Reverse تغییراتی در ساختار آن داده شود. پس از طراحی پرایمر توسط متخصص ژنتیک نتایج پس از یک هفته آماده شد. جدول ۱ الگوی پرایمرها را نمایش می دهد.

[1] RNA Stabilization reagent 50 mL

جدول ۱. الگوی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش

Genes	Primer sequence	Scale	purification
Bax	For:ACAGGGTTTCATCCAGGATCGAG Rev:AGCTCCATGTTGTTGTCCAGTTC	2	**BioRP**
caspase8	CAATGATGTCCTGGTGCTATTTCAG GGCTGCTTTTTAGGACTCTGCTC	2	**BioRP**
Bcl-2	GGATTGTGGCCTTCTTTGAGTTC AGAGCGATGTTGTCCACCAG	2	**BioRP**

استخراج RNA

۵۰ میلی گرم از بافت به وسیله اسکالتر خرد و وارد میکروتیوپ شد. سپس RNA با استفاده از کیت Rneasy protect mini kit (QIAGEN) و مطابق دستورالعمل شرکت ازبافت قلب استخراج شد.

فرآیند Real Time-Pcr

پس از استخراج RNA برای اطمینان از کافی بودن غلظت RNA در تهیهcDNA , OD آن توسط دستگاه نانودراپ چک شد. TCF mRNA با روش RT-Real time PCR به وسیله دستگاه روتوژن ۶۰۰۰ و با استفاده از کیت تک مرحله ای One Step SYBR TAKARA ساخت شرکت تاکارا مطابق دستورالعمل شرکت تعیین شد. تجزیه و تحلیل منحنی ذوب در پایان چرخه PCR به منظور تعیین اعتبار محصول PCR مورد انتظار انجام شد. پروتکل چرخه حرارتی دستگاه روتوژن شامل: ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه، ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه و ۴۰ سیکل با ۹۴ به مدت ۱۰ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه بود. پس از مرحله PCR برای مزالعه ویژگی های پرایمر از دماهای ۵۰ تا ۹۹ درجه سانتی گراد برای تهیه منحنی ذوب استفاده گردید. از RNA Polymrasell به عنوان ژن کنترل برای تعیین بیان Bcl-2 ، Bax، caspase8 استفاده شد. CT های مربوط به واکنش توسط نرم افزار دستگاه RT-Real time PCR استخراج و ثبت گردید. برای کمی سازی بیان ،TCFmRNA از روش ΔΔCT مقایسه ای استفاده شد.

روش تجزیه و تحلیل اطلاعات آماری: لازم به ذکر است پژوهش حاضر در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران (شناسه IR.IAU.REC.1397.033)تایید شد. داده های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (سطح معنی داری ۰/۰۵ ≥P). به منظور بررسی نرمال بودن داده ها از آزمون شپیروویلک استفاده شد و به دلیل نرمال نبودن توزیع داده ها، از روش های ناپارامتری استفاده شد. در صورت مشاهده تفاوت معنی دار جهت تعیین محل تفاوت از آزمون تعقیبی استفاده شد(P≤0.05).

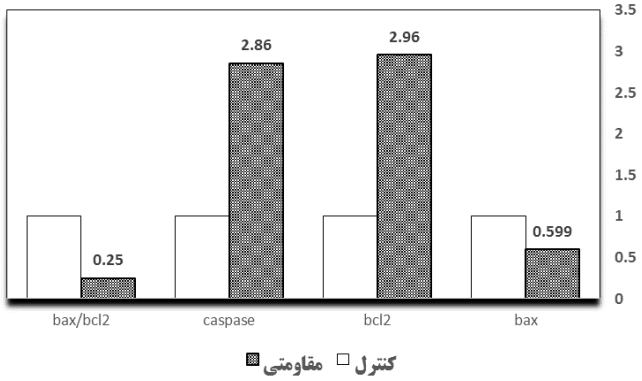
یافته ها:

جدول ۲ شاخص های توصیفی متغییرهای پژوهش را نشان می‌دهد.

جدول ۲. شاخص های توصیفی متغییر پژوهش

متغیر/گروه	کنترل	تمرین مقاومتی
گلوکز (mg/dl)	۳۲۴± ۱۶	۲۳۴/۸±۴۸/۹
انسولین(µ u/ml)	۶/۷±۰/۶۶	۵/۵±۱/۰۶
HOMA-IR Index	۶/۸±۰/۷۵	۴/۶۹±۱/۰۳
Bax	۱/۰۰۰±۰/۰۰	۰/۵۹۹±۰/۲۸
Bcl-2	۱/۰۰۰±۰/۰۰	۲/۱±۹۶۷/۳۲
caspase8	۱/۰۰۰±۰/۰۰	۲/۱±۸۶۶/۹۵۹

یافته های مطالعه حاضر نشان داد تمرین مقاومتی بر عوامل مهاری آپوپتوز در مسیر سیگنالینگ داخلی و مسیرهای خارجی اثر گذار بوده است(شکل ۱).



شکل ۱. بیان نسبی Bax , Bcl-2 , caspase8 و نسبتBax بهBcl-2 در قلب دیابتی گروه تمرینی و گروه کنترل

بررسی توزیع داده ها با استفاده از آزمون شاپیرو ویلک نشان داد فرض نرمال بودن تایید نشده است لذا از روش های ناپارامتری برای بررسی فرضیات استفاده شد. جدول ۳میانگین رتبه ای فاکتور آپوپتوزی Bax ، و فاکتورهای ضد آپوپتوزی Bcl-2 و caspase8را بعد از رتبه دهی به مقادیر در دو گروه کنترل و آزمایش نشان می دهد. نتایج آزمون یومان ویتنی حاکی از وجود اختلاف معنی دار بین تمامی فاکتورهای

آپوپتوزی در گروه تمرینی و کنترل بود (۰/۰۵ ≥P).

جدول ۳. مقایسه تغییرات فاکتورهای آپوپتوزی دو گروه

متغیرها	گروه	میانگین رتبه ای	آماره یومان ویتنی	تقریب Z	P value	E.F	توان
Bax	کنترل	۱۴	۰/۰۰۰	-۳/۸۲۱	۰/۰۰۰	۰/۸۵۹	۰/۹۶۸
	آزمایش	۵					
Bcl-2	کنترل	۵	۰/۰۰۰	-۳/۸۲۱	۰/۰۰۰	۰/۸۵۹	۰/۹۶۸
	آزمایش	۱۴					
Caspase8	کنترل	۶	۹	-۲/۹۷۳	۰/۰۰۴	۰/۵۲۰	۰/۸۴۵
	آزمایش	۱۳					
نسبت Bax به Bcl-2	کنترل	۱۴	۰/۰۰۰	-۳/۸۲۱	۰/۰۰۰	۰/۸۵۹	۰/۹۶۸
	آزمایش	۵					

بحث و نتیجه‌گیری

دیابت با افزایش استرس اکسیداتیو وکاهش عملکرد قلب، شرایط وقوع آپوپتوز و اختلال در عملکرد میتوکندریایی را فراهم می آورد(۲۰) مطالعات نشان داده اند که افزایش غوطه وری سلول های قلبی در گلوکز با آسیب DNA بافت قلب همراه است که به اختلال در زنجیرهٔ انتقال الکترون و افزایشROS میتوکندریایی و درنهایت، آپوپتوز سلولهای قلبی منجر می شود(۲۱). آپوپتوز بر اثر بر هم‌کنش پروتئینهای خانواده Bcl-2 که شامل پروتئین آنتی آپوپتوتیکBcl-2 و پروتئین پرو آپوپتوتیکBax ایجاد میشود که میزان غلظت آنها مانند یک تنظیم کننده قوی برنامه مرگ سلولی است(۲۲). علت وقوع آپوپتوز سلولهای قلبی پس از دیابت بجز استرس اکسیداتیو، وقوع فرآیند التهابی و حضور سایتوکاینهایی نظیر IL-1β،TNF-α و IFN.γ می باشد همچنین آنها در تولید نیتریک اکساید و افزایش Fas لیگاند به وسیله سلول های التهابی و قلبی اثرگذار می باشند(۲۳)افزایش استرس اکسیداتیو متعاقب بیماری دیابت باعث افزایش میزان گونه های فعال اکسیژنی و کاهش ظرفیت دفاع آنتی اکسیدانی و درنتیجه مرگ برنامه ریزی شده سلولهای قلبی یا الگوی آپوپتوز می گردد(۲۴) با توجه به این مطالب می توان بیان کرد نوع و شدت مختلف فعالیت های بدنی با تولید مقادیر متفاوتی از فشار اکسایشی در بدن همراه است که منجر به تغییر در ظرفیت تعادل بین گونه های فعال اکسیژن و سیستم دفاعی بدن می شود که نتیجه آن نقش تعیین کننده ای در القا یا مهار آپوپتوز دارد(۲۰). بنابراین یکی از مکانیسم‌های مهم احتمالی در زمینه محافظت سلولی ناشی از تمرین ورزشی می تواند ظرفیت مسدود کردن تشکیل رادیکالهای آزاد در بافت های مختلف باشد(۲۵) در تایید این موضوع، گزارش محققان حاکی از آن بود فعالیت منظم مقاومتی با شدت متوسط، سبب افزایش فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانی گلوتاتیون پراکسیداز،

کاهش ترشح کاسپاز و ایجاد اثرات آنتی اکسیدانی می گردد(۲۶) لذا مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر ۸ هفته تمرین مقاومتی بر سطوح برخی مارکرهای آپوپتوز قلبی در رت های دیابتی انجام شد.

مطالعات متعددی به بررسی اثرات فعالیت بدنی بر سطوح فاکتورهای آپوپتوزی قلب دیابتی پرداخته اند. در مطالعه لو و همکاران(۲۰۱۵) مشخص شد در میوکارد رت های مبتلا به سکته ی قلبی تمرینات اینتروال با شدت بالا و تمرینات تداومی با شدت متوسط میزان Bcl-2 را بطور یکسان افزایش می دهد (۲۷). در مطالعه دیگری مشاهده شد هشت هفته تمرین مقاومتی با شدت ۶۰ درصد یک تکرار بیشینه بیان Bcl-2، Bcl-xl و کاسپاز-۳ ، همچنین نسبت Bad به Bcl-2 در سلولهای تک هسته ای خون عروق محیطی را به میزان قابل توجهی کاهش می دهد و این نوع تمرینی می تواند فرآیند آپوپتوز در افراد سالمند را به تآخیر اندازد (۲۸) بنابر این به نظر می رسد تمرینات ورزشی با اثراتی متفاوت در افزایش یا کاهش عوامل آپوپتوزی در روند القا یا ممانعت از مرگ برنامه ریزی شده مؤثر هستند. یافته های این مطالعه با نتایج برخی مطالعات در تناقض بود (دیمار و همکاران، دوستار و همکاران)(۱۳, ۲۹) دیمارو و همکاران نشان دادند که 12 هفته تمرین مقاومتی در زنان و مردان مسن با وجود افزایش طول تلومر، تأثیری بر میزان کاسپاز- ۳ ،Bcl-2، Bax ندارد. دلایل مغایرت نتایج پژوهش حاضر با مطالعهٔ دیمارو و همکاران می تواند بافت موردبررسی، نوع آزمودنیها و تعداد جلسات فعالیت مقاومتی باشد. علاوه بر این آنها تعادل بین استرس اکسیداتیو و راندمان آنتی اکسیدانی را مانند (MnSoD , TrxR1) که با فعالیت ورزشی ایجاد می شود در نتایج مطالعات خود مؤثر دانستند همچنین بیان کردند تمرینات مقاومتی در کاهش متیلاسیون DNA می تواند اثرات مثبتی داشته باشد. یافته های پژوهش دوستار و همکاران(۲۰۱۱) نشان داد ۴ هفته تمرین مقاومتی اثری بر آپوپتوز قلبی ندارد و اظهار داشتند تمرینات مقاومتی نمی تواند اثر محافظت کننده بر قلب افرادی که دچار سکته قلبی شده اند تاثیرگذار باشد.

یافته های برخی محققان حاکی از آن است که Bcl-2 همیشه و در تمامی بافت ها نتیجه مشابهی از خود نشان نمی دهد(۳۲)در یک مطالعه تمرین شنا با شدت بالا میزان Bcl-2 را تغییر نداد(۳۰) این رخداد در شرایطی بود که تمرین با همان شدت روی تردمیل میزان Bcl-2 را افزایش داد(۳۱). لذا تناقض در نتایج را می توان به درصد انقباضات برون گرا در کل فعالیت نیز مرتبط دانست. دلچی و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که تمرینات ورزشی موجب افزایش Bcl-2 می شود و نتیجه گیری کردند که تمرینات ورزشی از طریق مسیری غیر از مسیر میتوکندری، موجب فعال شدن فرایند آپوپتوز می شود(۳۲).

در تآیید این موضوع سهیلی و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که 12هفته تمرین مقاومتی با شدت متوسط سبب کاهش سطوح سرمی TNF-αدر زنان غیرفعال می شود با توجه به اینکه عوامل سلولی و مولکولی از طریق سیگنالینگ آبشاری با هم در ارتباط هستند(۳۳) احتمالاً یکی دیگر از مکانیسمهای محافظت سلولی ناشی از تمرینات منظم ورزشی در برابر آپوپتوز با اثرات مهم ورزش در افزایش بیان پروتئین کیناز

Bمرتبط است، چراکه نشان داده شده است که پروتئین کیناز B با فعالیت ورزشی هوازی با تنظیم افزایشی مواجه میشود(۳۴) تحقیق حاضر، نشان داد که تمرین مقاومتی می تواند خواص حمایتی و ضد آپوپتوتیک خود را از طریق تنظیم مثبتBcl-2 با تحکیم دیواره ی میتوکندری، سرکوب Bax و جلوگیری از رهاسازی سیتوکروم C و با تنظیم کلسیم رها شده ازشبکه ی سارکوپوسمیک حیات سلول را بالا ببرد.

یافته مهم دیگر مطالعه حاضر افزایش کاسپاز-۸ پس از هشت هفته تمرین مقاومتی در رت های دیابتی بود. کاسپاز -۸ یک کاسپاز آغازگر در مسیر خارجی آپوپتوز معرفی شده است که می تواند موجب فعال شدن کاسپاز-۳ یعنی کاسپاز اجرایی پایین دست شود. (۳۵). بنابر این کاهش میزان پروکاسپازها می تواند نشان دهنده فعال شدن کاسپازها باشد. مسیر اصلی برای فعال شدن کاسپاز-۸ از طریق گیرنده های مرگ و با دخالت مولکول FADD می باشد(۳۶) اما شواهد مطالعات دیگر نشان داده اند که فعال شدن کاسپاز-۸ می تواند بصورت مستقل توسط میانجی های درون سلولی مانند رادیکال آزاد صورت گیرد(۳۷). فعال شدن کاسپاز-۸ در سلول های مختلف در پاسخ به انواع استرس اکسیداتیو بررسی شده و ساز وکار متنوعی برای آن پیشنهاد شده است. به طور مثال استرس اکسیداتیو نفوذ پذیری غشای لیزوزوم را افزایش داده و کاسپاز-۸ را فعال می کند(۳۸). مسیرهای سیگنالی وابسته به پروتئین کینازهایی از خانواده MAPK مانند JNK,P38, ERK نیز در فعال شدن کاسپاز-۸ ناشی از استرس اکسیداتیو نقش دارند.(۳۹) فیلیپس و همکاران(۲۰۱۰) گزارش کردند که 10هفته تمرین مقاومتی با شدت متوسط سبب کاهش مقادیر سرمی TNF-αدر زنان مسن می شود؛ بنابراین، به نظر میرسد که سازوکار دیگری در کاهش بیان کاسپاز- سه و افزایش محتوای آنزیم تلومراز در بافت قلب مؤثر واقع شده است و در پایان اظهار داشتند تمرین مقاومتی موجب سرکوب مسیر خارج سلولی آپوپتوز می شود و از اختلالات قلبی در زنان مسن جلوگیری می نماید(۴۰). در مطالعه ای که تمرین مقاومتی موجب افزایش کاسپاز-۸ متناسب با کاسپاز -۳ در کلیه موشهای دیابتی شده بود مشاهده شد TNF-α مستقیما کاسپاز-۸ را فعال می کند(۴۱) و تمرین بدنی با شدت متوسط به مدت ۷ هفته, فعالیت کاسپاز-۸ و به دنبال آن کاسپاز-۳ را کاهش می دهد. لازم به ذکر است نتایج این مطالعه با یافته های مطالعه حاضر متناقض بود چراکه پروتکل تمرینی و شدت فعالیت بدنی تفاوت چشمگیری داشتند. علاوه بر این بهبود کاسپاز -۸ ناشی از بهبود بیانSOD (سوپر اکسید دسموتاز) بیان شده است و چنین نتیجه گیری شد که اگر چه تولید سوپراکسیدها با ورزش در موش ها بیشتر می شود اما تقویت استرس اکسیداتیو منجر به افزایش SOD می شود که می تواند ظرفیت بیشتری برای کاهش چالشهای اکسیداتیو ناشی از هر گونه تغییر رادیکال های آزاد خارج یا درون سلولی ایجاد کند و در نهایت بیان شد ورزش کم شدت مستقل از تغییر در هایپرگلیسمی باعث افزایش وضعیت آنتی اکسیدانی می شود(۴۲)

در سالهای اخیر محققان به این نتیجه رسیده اند که در میان اعضای خانواده کاسپاز، کاسپاز-۸ نقش اسرارامیزی دارد چرا که کاسپاز-۸

علاوه بر القا مرگ سلولی در مهار مرگ سلولی نیز می تواند مؤثر باشد. این دانشمندان یک مسیر مرگ سلولی به نام نکروپتوزیس را معرفی کرده اند که معتقدند کاسپاز- ۸ در ساختارهای مهار کننده نکروپتوزیس قرار می گیرد و به واسطه توقف در عملکرد پروتئین کینازهای مقابل گیرنده ای مرگ سلول نکروپتوز را مهار میکند.کاسپاز- ۸ با قرار گرفتن در کامپلکس (RIPK3, RIPK1) مثلثی را تشکیل می دهند که MLKL[1] نام دارد و از فعال شدن نکروپتوز ممانعت می کند(۴۴). در مطالعه ای که به بررسی اثر فعالیت بدنی بر مسیرهای سیگنالینگ آپوپتوز داخلی و خارجی پرداخته بود مشاهده شد ۸ هفته فعالیت بدنی بر روی تردمیل کاسپاز ۸ را در رتهای تمرین کرده کاهش داده است در حالی که بر عوامل مسیر درونی آپوپتوزی مانند Baxو Bcl-2 هیچ تاثیری نداشت. بنابراین در خصوص افزایش کاسپاز- ۸می توان تا حدودی احتمال داد که افزایش کاسپاز- ۸می تواند تایید کننده نقش نوین آن در فرآیند مهار مرگ سلولی باشد.

جمع بندی

نتیجه‌گیری می‌شود که اجرای ۸ هفته تمرین مقاومتی با تاثیر بر عوامل ضد آپوپتوزی و پیش آپوپتوزی با اثر بر هر دو مسیر سیگنالینگ داخلی و خارجی از شدت آپوپتوز ناشی از دیابت در سلولهای عضلانی قلب می کاهد. پژوهش حاضر با محدودیت کم بودن پیشینه پژوهشهای انجام شده درزمینه ورزش مقاومتی و شاخصهای تحقیق مواجه بود که این موضوع علاوه بر اعلام داشتن محدودیت یک مزیت نیز محسوب میشود که نوین بودن موضوع تحقیق را می‌رساند. از نقاط ضعف پژوهش می توان به عدم اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی درون زا و تصویر برداری سطحی و عمقی از بافت قلب دیابتی اشاره کرد تا بتوان نتیجه واضح تری در خصوص تغییرات بافتی با تغییرات عوامل آپوپتوزی دست یافت. لذا پیشنهاد می شود مطالعات گسترده تری در زمینه اثربخشی تمرینات مقاومتی با شدت ها و مدت های مختلف، مسیرهای سیگنالینگ فاکتورهای مرتبط با وقوع آپوپتوز را همراه با روش های دیگر اندازه گیری و تصویربرداری بررسی نماید.

تقدیر و تشکر

از اساتید راهنما و مشاور این پژوهش کمال تشکر را دارم. این مقاله از رساله دکتری استخراج گردیده است

.

1 mixed lineage kinase domain-like

منابع

1. Atalay M, Laaksonen DE. (2002). Diabetes, oxidative stress and physical exercise. Journal of sports science & medicine. 1(1):1-14.
2. Shao C-H, Wehrens XH, Wyatt TA, Parbhu S, Rozanski GJ, Patel KP, et al. (2009). Exercise training during diabetes attenuates cardiac ryanodine receptor dysregulation. Journal of applied physiology. 106 (4): 1280-1292.
3. Bruce DG, Davis WA, Davis TM. (2005). Longitudinal predictors of reduced mobility and physical disability in patients with type ۲diabetes: the Fremantle Diabetes Study. Diabetes care. 28 (10):2441-2447.
4. Boyer BA, Paharia MI. (2008). Comprehensive handbook of clinical health psychology. John Wiley & Sons.pp.179-200.
5. hashemi m, ghavami s, karami tehrani f. (1382).apoptos marge barnemerizi shode cellule.zahedan journal of research in medical sciences.(1) 5:71-75.
6. Wencker D, Chandra M, Nguyen K, Miao W, Garantziotis S, Factor SM, et al. (2003). A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. The Journal of clinical investigation. 111 (10):1497-504.
7. Kwak H-B.Effects of aging and exercise training on apoptosis in the heart. (2013). Journal of exercise rehabilitation. 9 (2): 212-219.
8. Kourtis A, Adamopoulos PG, Papalois A, Iliopoulos DC, Babis GC, Scorilas A. (2018).Quantitative analysis and study of the mRNA expression levels of apoptotic genes BCL2, BAX and BCL2L12 in the articular cartilage of an animal model of osteoarthritis. Annals of Translational Medicine.6(12):243-255.
9. Gielen S, Laughlin MH, O'Conner C, Duncker DJ. (2015). Exercise training in patients with heart disease: review of beneficial effects and clinical recommendations. Progress in cardiovascular diseases. 57 (4): 347-355.
10. Cheng S-M, Ho T-J, Yang A-L, Chen I-J, Kao C-L, Wu F-N, et al. (2013).Exercise training enhances cardiac IGFI-R/PI۳K/Akt and Bcl- ۲family associated pro-survival pathways in streptozotocin-induced diabetic rats. International journal of cardiology. 167 (2):478-485.
11. Kim K-B, Kim Y-A, Park J-J. (2010).Effects of ۸-week Exercise on Bcl-۲, Bax, Caspase-8, Caspase-3and HSP ۷۰in Mouse Gastrocnemius Muscle. Journal of Life Science.20 (۹):1409-1414.
12. Novoa U, Arauna D, Moran M, Nuñez M, Zagmutt S, Saldivia S, et al. (2017). High-intensity exercise reduces cardiac fibrosis and hypertrophy but does not restore the nitroso-redox imbalance in diabetic cardiomyopathy .Oxidative medicine and cellular longevity.2017:1-11.
13. Yousef D, Farhad GS, Ghiassie R, Saeid S. (2011). Effect of resistance exercise on cardiac apoptosis following of ischemic/reperfusion. Journal of Animal and Veterinary Advances. 10(19):2561-2566.
14. Kanter M, Aksu F, Takir M, Kostek O, Kanter B, Oymagil A. (2017).Effects of low intensity exercise against apoptosis and oxidative stress in Streptozotocin-induced diabetic rat heart. Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes. 125(09):583-591.
15. Broderick TL, Poirier P, Gillis M. (2005). Exercise training restores abnormal myocardial glucose utilization and cardiac function in diabetes. Diabetes/metabolism research and reviews. 21:44-50.

16. Marwick TH, Hordern MD, Miller T, Chyun DA, Bertoni AG, Blumenthal RS, et al. (2009).Exercise training for type 2 diabetes mellitus: impact on cardiovascular risk: a scientific statement from the American Heart Association. Circulation. 119: 3244-4262.
17. kovsø, S., Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. Journal of diabetes investigation, 2014. 5(4): p. 349-358
18. Hosseini S, Azarbayjani M. (2013).The effect of aqua extract of saffron with resistance training on glycemic indexes of streptozotocin induced diabetic rats. Armaghane danesh. 18:284-294.
19. Lutz TA, Woods SC. (2012). Overview of animal models of obesity. Current protocols in pharmacology. 58:5-61.
20. Podesta F, Romeo G, Liu W-H, Krajewski S, Reed JC, Gerhardinger C, et al. (2000).Bax is increased in the retina of diabetic subjects and is associated with pericyte apoptosis in vivo and in vitro. The American journal of pathology. 156:1025-1032.
21. Cosulich SC, Savory PJ, Clarke PR. (1999). Bcl-2 regulates amplification of caspase activation by cytochrome c. Current Biology. 9:147-50.
22. Joussen AM, Doehmen S, Le ML, Koizumi K, Radetzky S, Krohne TU, et al. (2009). TNF-α mediated apoptosis plays an important role in the development of early diabetic retinopathy and long-term histopathological alterations. Molecular vision.15,1418.
23. Mauricio DM, Orlinick JR, Ak V. (1998).Role of Fas-FasL in insulitis in nonobes diabetic mouse. DiabetesChinese Medical Journal. 47:615-17.
24. Wang J, Song Y, Wang Q, Kralik PM, Epstein PN. (2006). Causes and characteristics of diabetic cardiomyopathy. The Review of Diabetic Studies. 3:108-117.
25. Hong J-H, Kim M-J, Park M-R, Kwag O-G, Lee I-S, Byun BH, et al. (2004). Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. Clinica chimica acta. 340:107-115.
26. Ghiasi R, Mohammadi M, Helan JA, Jozani SRJ, Mohammadi S, Ghiasi A, et al. (2015).Influence of two various durations of resistance exercise on oxidative stress in the male rat's hearts. Journal of cardiovascular and thoracic research. 7:۱۴۹-۱۵۳.
27. Lu K, Wang L, Wang C, Yang Y, Hu D, Ding R. (2015).Effects of high-intensity interval versus continuous moderate-intensity aerobic exercise on apoptosis, oxidative stress and metabolism of the infarcted myocardium in a rat model. Molecular medicine reports. 12: 2374-82.
28. Mejías-Peña Y, Estébanez B, Rodriguez-Miguelez P, Fernandez-Gonzalo R, Almar M, de Paz JA, et al. (2017). Impact of resistance training on the autophagy-inflammation-apoptosis crosstalk in elderly subjects. Aging (Albany NY). 9:408-418.
29. Dimauro I, Scalabrin M, Fantini C, Grazioli E, Valls MRB, Mercatelli N, et al. (2016).Resistance training and redox homeostasis: Correlation with age-associated genomic changes. Redox biology. 1(10):34-44.

30. Roberts CJ, Campbell IC, Troop N. (2014).Increases in weight during chronic stress are partially associated with a switch in food choice towards increased carbohydrate and saturated fat intake. European Eating Disorders Review. 22:77-82.
31. Kim DY, Jung SY, Kim CJ, Sung YH, Kim JD. (2013).Treadmill exercise ameliorates apoptotic cell death in the retinas of diabetic rats. Molecular medicine reports. 7:1745-50.
32. Delchev S, Georgieva K, Koeva Y ,Atanassova P. (2006). Bcl-۲/Bax ratio, mitochondrial membranes and aerobic enzyme activity in cardiomyocytes of rats after submaximal training. Folia medica. 48:50-56.
33. soheili S, yadegari hemat abadi E, shakeri n. (2016).The Effect of Endurance and Resistance Training on Interleukin- ٦and Tumor Necrosis Factor-α in Overweight Young Women. Journal of Sport Biosciences.8(2):263-276.
34. Libonati JR. Cardiac effects of exercise training in hypertension.(2013). ISRN Hypertension. 2013:1-9.
35. Creagh E, Martin S.(2002). Caspases: cellular demolition experts. Portland Press Ltd.29(6):696-702.
36. Barnhart BC, Lee JC, Alappat EC, Peter ME.(2003).The death effector domain protein family. Oncogene.22:8634-8644.
37. von Haefen C, Wieder T, Essmann F, Schulze-Osthoff K, Dörken B, Daniel PT. (2003).Paclitaxel-induced apoptosis in BJAB cells proceeds via a death receptor-independent, caspases-۳/-۸-driven mitochondrial amplification loop. Oncogene. 22: ۲۲۳٦-2247.
38. Baumgartner HK, Gerasimenko JV, Thorne C, Ashurst LH, Barrow SL, Chvanov MA ,et al. (2007). Caspase-۸-mediated apoptosis induced by oxidative stress is independent of the intrinsic pathway and dependent on cathepsins. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 293(1):296-307.
39. Sumbayev VV, Yasinska IM .(2005).Regulation of MAP kinase-dependent apoptotic pathway: implication of reactive oxygen and nitrogen species. Archives of biochemistry and biophysics. 436:406-412.
40. Phillips MD, Flynn MG, McFarlin BK, Stewart LK, Timmerman KL. (2010).Resistance training at eight-repetition maximum reduces the inflammatory milieu in elderly women. Medicine & Science in Sports & Exercise. 42:314-325.
41. Wang L, Du F, Wang X. (2008).TNF-α induces two distinct caspase- ۸activation pathways. Cell. 133:693-703.
42. Lin C-L, Wang F-S, Kuo Y-R, Huang Y-T, Huang H-C, Sun Y-C, et al. (2006).Ras modulation of superoxide activates ERK-dependent fibronectin expression in diabetes-induced renal injuries. Kidney international. 69(9):1593-600.
43. Kwak H-B, Kim J-H, Lawler JM. (2008). Responses of cleaved caspase-8 and−12 apoptotic pathways to 12 week treadmill exercise in aging rat skeletal muscle. Federation of American Societies for Experimental Biology. 753-757.
44. Someda M, Kuroki S, Miyachi H, Tachibana M, Yonehara S. (2019).Caspase-8, receptor-interacting protein kinase 1 (RIPK1), and 3 regulate retinoic acid-induced cell differentiation and necroptosis. Cell Death & Differentiation.1539-1553.

Metabolism and Exercise
A bioannual journal

Vol 9, Number 2, 2019-2020

University Of Guilan

The effect of 8 weeks resistance exercise training on cardaic apoptosis biomarkers in diabetic rats

Montazery Taleghani H[1], Shakeri N[2*], Ebrahim kh[3], Soori R[4], Gholami M[2]

Received: 7/1/2020 Accepted: 20/8/2020

Abstract

Aim: A main reason of death in diabetes is cardiovascular diseases, which apoptosis plays a critical role through the progress. As known, physical activity can protect human heart from damaging induced by apoptosis. This study was investigate the effects of eight weeks of resistance exercises on cardiomyocyte apoptosis markers in diabetic rats.

Method: twenty male wistar rats (8 weeks old and 210-250 g weight) were randomly allocated into two groups. Diabetes was induced by a single intraperitoneal injection of STZ (50 mg/kg) in diabetic groups. The resistance training carried out on a step ladder, with an 80% slope and a load of 30-100 percentage of subjects weight, whereas control group remained sedentary. To determine training adaptations, blood and heart tissue samples were taken. The level of the serum glucose, insulin, insulin resistance index, and gene expression levels *Bcl-2*, Bax, caspase8 and the ratio of Bax/ *Bcl-2* were assessed.

Results: Implementation of 8 weeks of resistance exercise resulted significant decrease in gene expression levels Bax and the ratio of bax/ Bcl-2 (p=0/000) and a significant increase in Bcl-2 (p=0/000) and caspase 8 (p=0/004) compare to control group.

Conclusion: The results show that resistance exercise may be used as a non-pharmacological strategy to reduce side effects of apoptosis in the heart cells in diabetes .

Keywords: Type 2 diabetes, Apoptosis, Resistance exercise, Gene expression.

1. Ph.D student in exercise physiology, 2. Assistant Professor, Science and Research Branch, Islamic Azad University, 3. Professor in Exercise physiology, Shahid Beheshti University, 4. Associate professor in Exercise Physiology, Tehran university
*****Email: nsprofsport@gmail.com