مجله دیابت و لیپید ایران. بهمن- اسفند ۱۳۸۹؛ دوره ۱۰ (شماره ۳) ۲۵۰-۲۴۱

Archive of SID

تعدیل کاهش بیان ژن‌های MCT1 و MCT4 در عضلات اسکلتی رت‌های دیابتی نوع ۲ متعاقب تمرین استقامتی

حمید رجبی[۱]، روح‌اله نیکویی[۱]، رضا قراخانلو[۲]، کبری امیدفر[۳*]، امیرعباس منظمی، فرشته عتابی[۴]، آرش حسین‌نژاد[۳]، باقر لاریجانی[۳]

چکیده

مقدمه: هدف از مطالعه حاضر تعیین تاثیر تمرین استقامتی بر میزان بیان ژن‌های MCT1 و MCT4 در عضلات اسکلتی رت‌های دیابتی نوع ۲ بود.

روش‌ها: تعداد ۴۰ رت نژاد ویستار نر در سن ۴ هفتگی با میانگین وزن ۹/۸ ± ۹۳/۷ گرم انتخاب و به طور تصادفی به ۳ گروه کنترل سالم (n=۱۰)، کنترل دیابتی (n=۱۵) و تمرینی دیابتی (n=۱۵) تقسیم شدند. دیابت از طریق ترکیب تزریق درون صفاقی استرپتو زوتوسین و مصرف غذای پر چرب ایجاد و تمرین استقامتی (شروع با سرعت m/min ۲۰ و تدریجاً رسیدن به سرعت m/min ۳۰ در هفته آخر) به مدت ۷ هفته، بر گروه تمرینی دیابتی اعمال شد. جهت تأیید وقوع به مقاومت انسولین، از شاخص HOMA-IR استفاده گردید. ۲۴ ساعت پس از اتمام پروتکل تمرینی، رت‌ها تشریح و عضله نعلی و باز کننده طویل انگشتان (EDL) جدا شدند. اندازه‌گیری انسولین پلاسما به روش ELISA، غلظت گلوکز پلاسما با روش آنزیماتیک گلوکز اکسیداز و میزان بیان MCT1 و MCT4 با تکنیک Real time – PCR انجام گرفت. میزان بیان MCT1 و MCT4 هر ژن با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه گردید. جهت تعیین معنی‌دار بودن تفاوت متغیرها بین گروه‌های تحقیق از آزمون‌های آماری t-student، ONE-WAY ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد.

یافته‌ها: یافته‌های تحقیق نشان داد مقادیر HOMA-IR index در دو گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم بیشتر بود (P< ۰/۰۱)، همچنین اختلاف معنی‌دار بین میزان بیان MCT4 در عضله EDL بین گروه تمرین کرده دیابتی و کنترل دیابتی یافت شد (P< ۰/۰۱). میزان بیان MCT4 در عضله نعلی، بیان MCT1 در هر دو عضله نعلی و EDL در تمرین کرده دیابتی نسبت به گروه کنترل دیابتی افزایش غیر معنی‌دار داشت.

نتیجه‌گیری: به طور خلاصه نتایج تحقیق نشان داد که بیان ژن‌های MCT1 و MCT4 در شرایط دیابت نوع ۲ نسبت به شرایط نرمال کاهش قابل ملاحظه‌ای دارد و تمرین استقامتی می‌تواند این کاهش بیان را تعدیل و به سطوح نرمال نزدیک کند.

واژگان کلیدی: انتقال دهنده‌های لاکتات، لاکتات، دیابت نوع ۲، تمرین استقامتی

۱- دانشگاه تربیت معلم تهران

۲- دانشگاه تربیت مدرس تهران

۳- مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۴- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات

* ***نشانی:*** تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، طبقه پنجم، مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران، کد پستی ۱۴۱۱۴۱۳۱۳۷ تلفن: ۸۸۲۲۰۰۳۷ ، نمابر: ۸۸۲۲۰۰۵۲ ، پست الکترونیک: omidfar@tums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۹/۰۸/۰۴ **تاریخ درخواست اصلاح: ۸۹/۱۰/۱۷** **تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۱/۱۹**

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

مقاومت به انسولین یا عدم توانایی انسولین در تنظیم برداشت گلوکز، مهمترین مشخصه در شرایط دیابت غیر وابسته به انسولین (NIDDM[1]) است که سازوکارهای پاتو فیزیولوژیک آن چند عاملی است [۵-۱]. مطالعات متعدد تغییر در بکارگیری سوبسترا را در شرایط NIDDM گزارش و رقابت سوبسترایی بین گلوکز، اسیدهای چرب آزاد و لاکتات برای اکسیداسیون را از جمله عوامل سهیم در توسعه مقاومت به انسولین برشمرده‌اند [۷-۵]. به همین علت در تحقیقات اخیر به مطالعه متابولیسم لاکتات در شرایط NIDDM توجه زیادی شده است [۹-۶] . به طور کلی در شرایط NIDDM معمولاً افزایش در میزان غلظت لاکتات استراحت دیده می‌شود که دامنه افزایش آن از ۰/۶ mmol/l در افراد لاغر تا ۱/۱ mmol/l در افراد چاق متغیر است [۲،۶]، ضمن اینکه ارتباط منفی بین غلظت لاکتات استراحت و حساسیت به انسولین نیز گزارش گردیده است [۶]. در حقیقت افزایش میزان استراحتی لاکتات، برداشت گلوکز در بافت‌های مصرف کننده این سوبسترا مانند عضلات اسکلتی، عضله قلبی و ... را از طریق تنظیم منفی بیان GLUT4[2] سارکولمایی کاهش می‌دهد [۱۰،۱۱] که یکی از دلایل ایجاد NIDDM است. از طرف دیگر در مقایسه با گلوکز، لاکتات سوبسترای مفیدتری در تولید انرژی است و می‌تواند به طور مستقیم بوسیله کمپلکس پیروات دهیدروژناز اکسید شود [۱۱] و از این طریق میزان مصرف گلوکز در چرخه گلیکولیز را کاهش دهد [۱۰،۱۱]. بنابراین به نظر می‌رسد که تعدیل لاکتات استراحتی در شرایط NIDDM به کنترل این بیماری کمک می‌کند.

طبق نظریه بین سلولی لاکتات[3] [۱۴-۱۲]، انتقال لاکتات بین بافت‌های مختلف، عمدتاً از طریق کوترانسپورت با یون هیدروژن از طریق مونوکربوکیسلات ترانسپورترها (MCTs)[4] صورت می‌گیرد [۱۵] که تاکنون ۱۴ ایزوفرم مختلف از MCT ها در موش و ۹ نوع در انسان شناسایی شده‌اند که توزیعی وابسته به بافت دارند [۱۶]. در عضلات اسکلتی انسان و حیوان، دو ایزوفرم MCT1 و MCT4 و در عضله قلبی دو ایزوفرم MCT1 و MCT2 با خصوصیات کینتیکی و مکان‌های متفاوت بیان می‌شوند [۱۷] که MCT1 بیشتر در تارهای ST[5] و MCT4 بیشتر در تارهای FT[6] بیان می‌شوند [۷]. تنظیم محتوای این انتقال دهنده‌ها تحت تاثیر مستقیم غلظت لاکتات استراحت می‌باشد، چرا که تحقیقاتی که از افزایش مجازی لاکتات[7] استفاده نموده‌اند، اذعان داشته‌اند که در رت‌ها بالا بودن طولانی مدت لاکتات موجب تغییر در انتقال لاکتات و محتوی ناقل‌های آن در عضلات اسکلتی می‌شود [۱۸].

مطالعات دیگر نشان داده‌اند که در شرایط طبیعی، عوامل دیگر از قبیل فعالیت بدنی و تحریک الکتریکی نیز بیان MCT ها و انتقال لاکتات را افزایش می‌دهد [۲۱-۱۹]. MCT1 عمدتاً در اثر تمرینات استقامتی بیان می‌شود و با ظرفیت‌های اکسیداتیو عضله در ارتباط است [۲۲،۲۳] در حالی که MCT4 بیشتر متعاقب تمرینات شدید بیان می‌شود [۲۲،۲۳]. به دلیل بیان شدن MCT ها در مکان‌های مختلف بافت و تفاوت در کینتیک آنها، به MCT1 نقش برداشت کننده و به MCT4 نقش آزاد کننده لاکتات نسبت داده‌اند [۲۲،۲۴].

هر چند، تاثیرات مفید تمرینات استقامتی در بهبود عملکرد انسولین در شرایط مقاومت انسولین به خوبی مشخص شده است [۳-۱]؛ اما تاثیر اینگونه تمرینات بر بیان MCT ها به ویژه در شرایط هایپرلاکتاتمیا موجود در NIDDM به ندرت مورد مطالعه قرار گرفته است. Lore و همکاران تاثیر ۱۰ هفته تمرین استقامتی را بر محتوی پروتئینی MCT1 و MCT4 در عضلات رت‌های نژاد Zucker falfa مورد مطالعه قرار دادند و اثر تمرین بر افزایش محتوی MCT1 در سطح سارکولما و همچنین افزایش تبادل لاکتات را گزارش نمودند [۲۵]. Enoki و همکاران تأثیر تمرین بر محتوی MCT1 و MCT4 عضلات در موش‌های دیابتی نوع ۱ را مورد مطالعه قرار دادند و تنها تاثیر تعدیلی تمرین در محتوی کاهش یافته MCT1 و MCT4 را گزارش

1 -Non-insulin-dependent diabetes mellitus
2 -Glucose transfrase 4 down-regulation
3- Extracellular lactate shuttle
4- Monocarboxylate transporters
5- Slow twich fibers
6 -Fast twich fibers
7 –Lactate clamp

www.SID.ir

Archive of SID

نمودند [۲۶]. به هر حال مدل‌های حیوانی استفاده شده در این گونه تحقیقات، فاقد شرایط مقاومت به انسولین بوده‌اند، ضمن این که در این مطالعات تنها محتوی پروتئینی این انتقال دهنده‌ها بررسی گردیده است. از آنجایی که میزان بیان یک پروتئین خاص ماحصل سازوکارهای پیش و پس ترجمه‌ای است و تغیرات در سطح mRNA نیز می‌تواند بر میزان بیان پروتئین اثرگذار باشد و با توجه به این که تاکنون مطالعه‌ای تاثیر تمرین بر محتوی mRNA این انتقال دهنده‌ها در شرایط NIDDM را مورد بررسی قرار نداده است، تحقیق حاضر به منظور پاسخگویی به سوالات زیر به اجرا درآمد:

تغییرات محتوای mRNA انتقال دهنده‌های لاکتات در اثر ایجاد شرایط NIDDM چگونه و تاثیر تمرین استقامتی بر آن به چه شکل است؟

روش‌ها

حیوان و پروتکل تمرینی

تعداد ۴۰ رت نژاد ویستار نر در سن ۴ هفتگی با میانگین وزنی ۹/۸ ± ۹۳/۷ گرم از انستیتوی پاستور ایران تهیه و در شرایط دمایی ۴ ± ۲۲ درجه سانتیگراد تحت سیکل ۱۲:۱۲ساعت تاریکی- روشنایی نگهداری شدند. وزن بدن به طور روزانه ثبت و رت‌ها با غذای مخصوص رت و آب تغذیه شدند. بعد از گذشت ۲ هفته (سازگاری با محیط آزمایشگاه و رسیدن به وزن مطلوب)، رت‌ها (با میانگین وزن ۱۱/۴ ± ۱۸۳/۴۷) به طور تصادفی به ۳ گروه کنترل سالم (n=۱۰)، کنترل دیابتی(n=۱۵) و تمرینی دیابتی (n=۱۵) تقسیم، ضمن این که گروه‌ها بر اساس وزن همسان‌سازی شدند. دیابت در این تحقیق از طریق ترکیب مصرف غذای پر چرب و تزریق استرپتوزوتوسین[1] ایجاد شد [۲۷]. غذای مورد استفاده شامل ۵۸ در صد چربی، ۲۵ درصد پروتئین و ۱۷ درصد کربوهیدرات بود و عناصر تشکیل دهنده آن در جدول ۱ گزارش شده است. این ترکیب غذایی بوسیله محقق به صورت دست‌ساز و با همکاری شرکت کانی دام و مؤسسه واکسن‌سازی و سرم‌سازی رازی ایران انجام گرفت. رت‌های گروه دیابتی به مدت ۲ هفته تحت مصرف غذای پرچرب[2] قرارگرفتند در حالی که گروه کنترل سالم غذای طبیعی[3] مصرف می‌کردند. بعد از آن تزریق درون صفاقی استرپتوزوتوسین به میزان ۳۵ mg/kg در بافر سیترات ۰/۱ M (PH=۴/۵) بعد از ۶ ساعت ناشتایی در دو گروه دیابتی انجام گرفت [۲۷]. ۴۸ ساعت بعد از تزریق دارو، نمونه خونی از چشم حیوان جمع‌آوری و جداسازی سرم با ۴ C ،۱۰ min ،۳۰۰۰ g انجام و غلظت گلوکز با روش آنزیماتیک گلوکز اکسیداز با کیت شرکت پارس آزمون اندازه‌گیری گردید. غلظت گلوکز بالاتر از ۳۰۰ mg/dl به عنوان دیابت تعریف [۲۷] و رت‌های واجد شرایط وارد تحقیق شدند.

پروتکل تمرینی

تمرین استقامتی به مدت ۷ هفته، هر روز بر گروه تمرینی دیابتی اعمال شد که خلاصه آن در جدول ۲ گزارش شده است. به دلیل شرایط خاص رت‌های تحقیق (دیابت شدید)، اعمال مدت‌های طولانی‌تر تمرینی بیشتر از ۳۵ دقیقه امکان‌پذیر نبود و این مدت به عنوان مدت نهایی در اواخر تمرین درنظر گرفته شد. ضمن اینکه شدت نهایی نیز به گونه‌ای انتخاب گردید که سطوح لاکتات را در حین تمرین دستخوش تغییر قابل ملاحظه نماید. تمامی این اطلاعات با انجام pilot study روی ۴ رت بدست آمد. دو هفته آخر نیز تمامی متغیرهای تمرینی ثابت نگه داشته شدند تا سازگاری‌های انجام شده در زمان تشریح به حالت یکنواخت خود برسند.

تست HOMA-IR

۲۴ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی، بعد از ۸ ساعت ناشتایی نمونه خونی به میزان ۱ ml از چشم حیوان جمع‌آوری و جداسازی پلاسما با سانتریفیوژ کردن در ۴ C ،۱۰ min ،۳۰۰۰ g انجام و جهت اندازه‌گیری گلوکز و انسولین ناشتایی جهت تعیین HOMA-IR در ۸۰- نگهداری

1- Streptozotocin

2- High fat diet
3- Normal pellet diet

www.SID.ir

Archive of SID

شد. اندازه‌گیری انسولین به روش ELISA و با کیت ساخت شرکت Millipore با حساسیت اندازه‌گیری ng/ml ۱، catalog number: # EZRMI-13K و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. غلظت گلوکز با روش آنزیماتیک گلوکز اکسیداز با کیت شرکت پارس آزمون اندازه‌گیری گردید.

مقادیر HOMA-IR با استفاده از فرمول زیرمحاسبه گردید [۲۸]: HOMA-IR = Insulin [μU/ml] * Glucose [mmol/l]/22.5 و شرایط مقاومت به انسولین منوط به داشتن دو شرط زیر بود:

۱– مقادیر HOMA-IR بالاتر از ۲/۵ [۲۸] و ۲– مقادیر انسولین ناشتایی بالاتر از ۶۰ pmol [۲۸] و تنها رت‌هایی که شرایط فوق را دارا بودند در تجزیه و تحلیل نهایی وارد شدند.

استخراج نمونه

۲۴ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی، رت‌ها بوسیله تزریق درون صفاقی کتامین (۹۰ mg/kg) و زایلازین (۱۰ mg/kg) بی هوش و عضلات نعلی و EDL بلافاصله استخراج و در نیتروژن ۸۰– منجمد و برای تجزیه و تحلیل بعدی نگهداری شد.

Real time – PCR

حدود ۵۰ میلی‌گرم عضله با روش هاون کوبی پودر گردید و جهت استخراج total RNA به نسبت ۱ به ۱۰ در Isol RNA-Lysis reagent هموژن گردید. به منظور برداشتن اجزای پروتئینی محصول حاصل در ۱۲۰۰۰ g, 10min, 4 C سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت برداشته و با نسبت ۱ به ۰/۵ با Isol اولیه با کلروفورم مخلوط و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. محصول در ۱۲۰۰۰ g, 15 min, 4 C سانتریفیوژ و بخش معدنی و آبی از هم جدا شدند، بخش محتوی RNA برداشته و با نسبت ۱ به ۰/۵ با ایزوپروپانل مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق رها و سپس در ۱۲۰۰۰ g, 10 min, 4 C سانتریفیوژ شد. Pellet حاوی RNA در اتانول شستشو و در ۲۰μL آب RNAS-Free حل گردید. غلظت RNA با استفاده از دستگاه nono drop سنجیده و نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ به عنوان تخلیص مطلوب تعریف گردید [۲۸].

سنتز cDNA با استفاده از 1 μg از RNA و با استفاده از Random hexamer primer و آنزیم Mmulv Reverse transcriptase انجام گرفت. Real time – PCR با استفاده از Premix syber green II و با استفاده از غلظت ۱۰۰ ng از cDNA انجام گرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۳ گزارش شده است ضمن اینکه از 18 S به عنوان ژن کنترل استفاده گردید. برنامه مورد استفاده در Real time شامل: ۹۵° به مدت ۱۰ دقیقه –۹۵° به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰° به مدت ۱ دقیقه (تکرار ۴۰ سیکل) بود. میزان بیان ژن های مورد نظر با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری

بعد از این که نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون K – S تایید شد، جهت تعیین معنی‌دار بودن تفاوت متغیرها بین گروه‌های تحقیق از آزمون آماری ONE WAY ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey استفاده گردید. جهت تعیین معنی‌دار بودن تفاوت در مقایسه دو گانه از آزمون آماری t استیودنت استفاده شد. مقدار α درتمامی مراحل برابر با ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

وزن بدن

تغییرات وزن بدن در شکل ۱ گزارش شده است. کاهش اندک در وزن بدن در هفته بعد از تزریق STZ در گروه‌های دیابتی مشاهده و بعد از آن روند افزایش وزن در تمامی گروه‌ها به صورت طبیعی ادامه یافت. بعد از گذشت ۴ هفته از زمان شروع مصرف غذای پرچرب توسط گروه‌های دیابتی، اختلاف وزن بین گروه کنترل دیابتی و سایر گروه‌ها معنی‌دار شد و این اختلاف تا پایان تحقیق ادامه داشت.

www.SID.ir

Archive of SID

تاثیر STZ و غذای پر چرب بر متغیرهای متابولیک

جدول ۴ تاثیر STZ و غذای پرچرب بر متغیرهای متابولیک را نشان می‌دهد. نتایج گلوکز خون پلاسما قبل و بعد از اجرای پروتکل تمرینی در شکل ۲ آورده شده است. نتایج تست تایید دیابت قبل از شروع تحقیق افزایش معنی‌دار سطح گلوکز خون (Pre glucose) در گروه‌های دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم را نشان داد (P<۰/۰۰۱). نتایج آزمون HOMA-IR در پایان تحقیق نیز اختلاف معنی‌دار بین سطوح گلوکز خون پلاسما بین گروه‌های دیابتی و گروه کنترل سالم را نشان داد (P< ۰/۰۰۱).

اختلاف معنی‌دار بین سطوح انسولین پلاسمای گروه کنترل دیابتی و دو گروه دیگر (P<۰/۰۵) و گروه تمرین کرده دیابتی بدست آمد (P<۰/۰۵). مقادیر HOMA-IR index در دو گروه دیابتی نسبت گروه کنترل سالم افزایش معنی‌دار داشت (P<۰/۰۰۱)، ضمن اینکه بین دو گروه دیابتی نیز اختلاف معنی‌دار مشاهده شد (P<۰/۰۱).

بیان ژن MCT1 و MCT4

تمامی تغییرات بیان MCT1 و MCT4 در گروه‌های دیابتی مطالعه نسبت به گروه کنترل سالم استاندارد شدند. میزان کاهش بیان MCT1 در گروه کنترل دیابتی در عضله نعلی و EDL به ترتیب ۴۳ و ۴۴ درصد بود. این در حالی است که بیان MCT4 در عضله نعلی و EDL به ترتیب ۴۷ و ۲۷ درصد بود (شکل ۳ و ۴).

علی‌رغم افزایش در میزان بیان MCT1 در عضله نعلی و EDL در گروه تمرین کرده دیابتی نسبت به گروه کنترل دیابتی، تفاوت معنی‌داری بین این دو گروه مشاهده نشد (شکل ۳).

اختلاف معنی‌دار بین میزان بیان MCT4 در عضله نعلی بین گروه تمرین کرده دیابتی و کنترل دیابتی یافت شد (P<۰/۰۱، t= -۳/۳۸). این اختلاف برای بیان MCT4 در عضله EDL بین این دو گروه معنی‌دار نبود (شکل ۴).

جدول ۱- ترکیب غذای پر چرب و عناصر تشکیل دهنده آن

عناصرتشکیل دهنده	گرم / کیلوگرم
پودر غذای طبیعی رت	۳۶۵
روغن گیاهی	۳۱۰
کازئین	۲۵۰
کلسترول	۱۰
ویتامین و مواد معدنی	۶۰
متیونین	۳
کلراید سدیم	۱
جوش شیرین	۱

جدول ۲- مشخصات پروتکل تمرینی

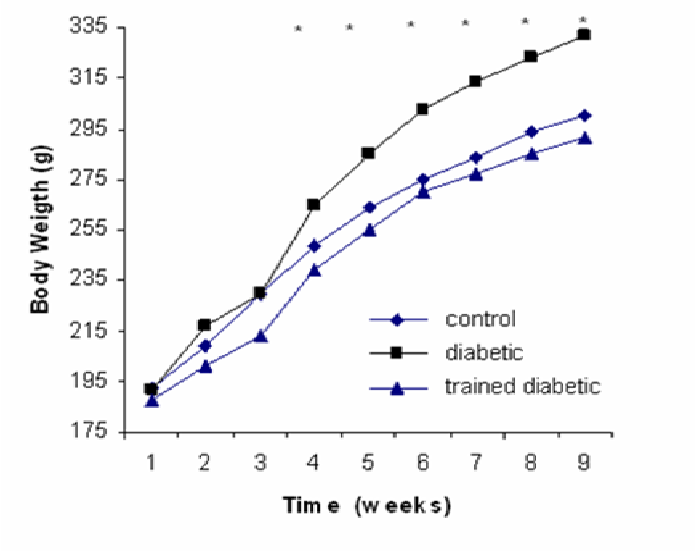
زمان	آشنا سازی ۵ روز	هفته ۱	هفته ۲	هفته۳	هفته۴	هفته۵	هفته ۶	هفته۷
سرعت (m/min)	۱۵	۲۰	۲۰	۲۵	۲۵	۳۰	۳۰	۳۰
مدت (min)	۲۰	۲۰	۲۵	۲۵	۳۰	۳۰	۳۵	۳۵

جدول ۳- توالی پرایمرهای مورد استفاده در تحقیق

ژن	Forward primer	primer Reverse	Genebank
MCT1	GCTGTCATGTATGCCGGA	CAATCATAGTCAGAGCTGGG	NM-012716
MCT4	GCTGGCTATGCTGTATGGC	TTGAGAGCCAGACCCAAGC	NM-030834
18 S	GTCGGCATCGTTTATGGTCG	GTTGGTTTTCGGAACTGAGGC	

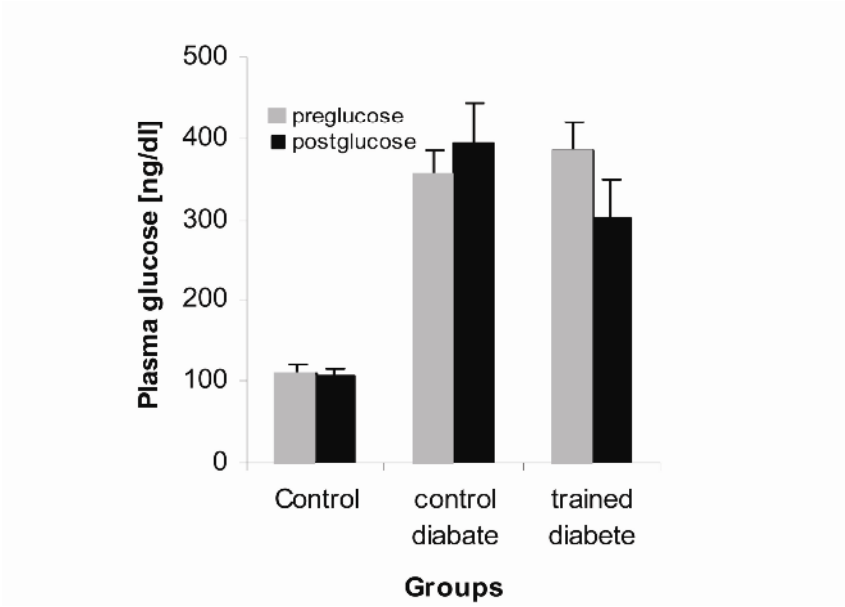
www.SID.ir

Archive of SID



* اختلاف معنی‌دار گروه کنترل دیابتی با سایر گروه‌ها (P<۰/۰۵)، کنترل سالم (n=۹)، دیابتی (n=۱۲)، تمرین دیابتی (n=۱۱)

شکل ۱- تغییرات وزن بدن در گروه‌های مختلف تحقیق



کنترل سالم (n=۷)، دیابتی (n=۹)، تمرین دیابتی (n=۹)

شکل۲- تغییرات گلوکز پلاسما قبل و بعد از پروتکل تمرینی

جدول ۴- مشخصات آنتروپومتریک و متابولیک گروه‌های تحقیق

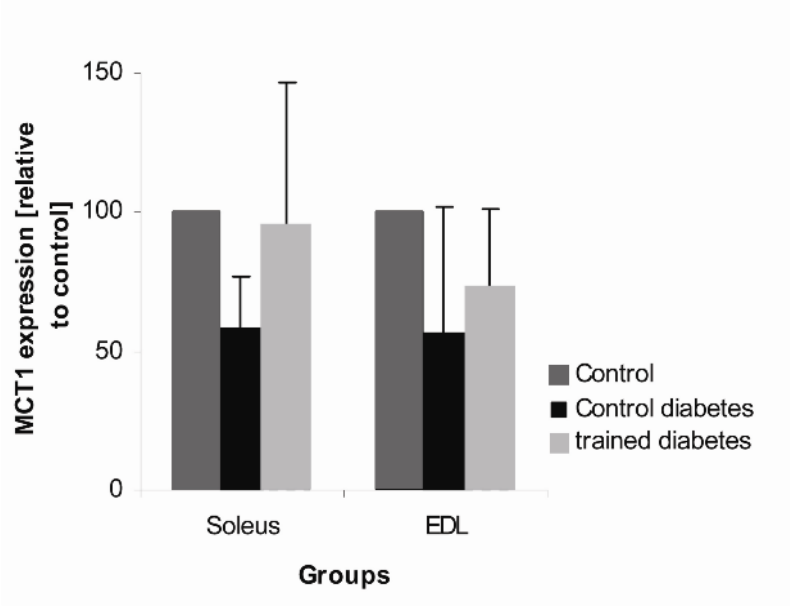
گروه‌ها	کنترل سالم	کنترل دیابتی	تمرین دیابتی
وزن [g]	۲۹۹/۷ ± ۳۰/۸۱**	۳۳۱/۷ ± ۱۸/۱۴ *	۲۹۱/۱۷ ± ۲۵/۲۱**
گلوکز (ng/dl)	۱۰۶/۴ ± ۹/۲۶ **	۳۹۴/۴۴ ± ۴۸/۷۴ *	۳۰۱/۷ ± ۴۷/۹۵ *,**
انسولین (µU/ml)	۶/۲۵ ± ۱/۱۵ **	۱۰/۵۵ ± ۱/۱۲*	۸/۹۵ ± ۰/۷۸ *,**
شاخص HOMA	۱/۶۲ ± ۰/۲۴**	۱۰/۴۸ ± ۱/۴۴ *	۶/۶۸ ± ۱/۳۱ *,**

* اختلاف معنی دار با گروه کنترل سالم (P<۰/۰۵)، ** اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل دیابتی (P<۰/۰۵)

کنترل سالم (n=۷)، دیابتی (n=۹)، تمرین دیابتی (n=۹)

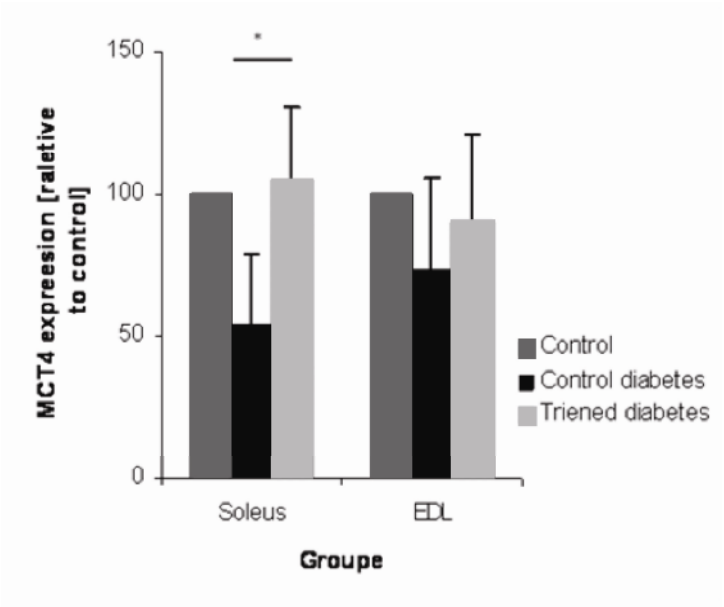
www.SID.ir

Archive of SID



کنترل سالم (n=۶)، دیابتی (n=۶)، تمرین دیابتی (n=۶)

شکل ۳- میزان بیان ژن MCT1 در عضلات اسکلتی گروه‌های تحقیق



* اختلاف معنی‌دار (P< ۰/۰۱)، کنترل سالم (n=۶)، دیابتی (n=۶)، تمرین دیابتی (n=۶)

شکل۴- میزان بیان MCT4 در عضلات اسکلتی گروه‌های تحقیق

بحث

مطالعه حاضر با ایجاد شرایط دیابت نوع ۲ در رت‌های آزمایشگاهی شروع و با پیاده کردن یک دوره تمرین استقامتی به منظور تعیین تغییرات در بیان ژن MCT1 و MCT4 در عضلات اسکلتی به پایان رسید. مهمترین یافته این تحقیق آن بود که بیان ژن MCT1 و MCT4 در شرایط دیابت نوع ۲ نسبت به شرایط طبیعی کاهش می‌یابد و تمرین استقامتی می‌تواند از میزان کاهش در بیان ژن MCT1 و MCT4 جلوگیری نماید.

نکته منحصر به فرد تحقیق حاضر این بود که این اولین مطالعه‌ای است که تاثیر بلند مدت تمرین استقامتی بر بیان ژن MCT1 و MCT4 را در شرایط دیابت نوع ۲ مورد بررسی قرار داده است. مطالعه تغییرات MCT1 و MCT4 در شرایط دیابت به تعداد معدودی تحقیق و آن هم در سطح

www.SID.ir

Archive of SID

پروتئین منتهی می‌شود [۷،۲۵] که مهمترین نکته در مورد این تحقیقات آنست که مدل‌های استفاده شده در آنها فاقد مقاومت انسولین بوده‌اند. استفاده از STZ در دوز بالا (۵۰ mg/kg) در تحقیق Bonen و همکاران [۷] منجر به کاهش وزن در گروه‌های دیابتی گردیده که این مدل با کاهش شدید بافت چربی همراه است که مغایر با شرایط دیابت نوع ۲ است. مشخصه‌های مربوط به رت‌های تحقیق حاضر به گونه‌ای است که با شرایط دیابت نوع ۲ همخوانی دارد. اختلاف معنی‌دار فاکتور وزن گروه کنترل دیابتی با سایر گروه‌ها، افزایش سطوح کلسترول و TG خون (داده‌ها ارائه نشده‌اند)، وقوع هایپرگلیسمیا و از همه مهمتر افزایش سطوح انسولین همگی دلالت بر این دارد که در تحقیق حاضر مدل دیابت نوع ۲ به درستی اعمال گردیده است. وجود انسولین در خون، نشان از تخریب ناکامل پانکراس دارد که امکان ایجاد مقاومت انسولین را مهیا می‌سازد. ضمن اینکه داده‌های مربوط به HOMA-IR index نیز رخداد مقاومت انسولین در گروه‌های دیابتی را تبیین می‌کند.

مطالعه حاضر نشان داد که MCT1 و MCT4 به آن دسته از ژن‌هایی تعلق دارند که در پاسخ به تمرین افزایش می‌یابند هر چند که کاهش معنی‌دار در بیان MCT1 و MCT4 در گروه کنترل دیابتی نسبت به گروه کنترل دلالت بر این دارد که بیان MCT1 و MCT4 تحت تاثیر تغییرات متابولیکی نیز واقع می‌شود. مورد اخیر در تحقیق Bonen و همکاران [۲۸] نیز تایید شد که طی آن تجویز یک هفته‌ای تستوسترون بیان MCT1 و MCT4 را در عضله پلانتاریس و محتوی پروتئینی MCT1 و MCT4 را در ۵ عضله متفاوت افزایش داد.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که الگوی تغییرات بیان MCT1 و MCT4 تا حدودی بین خود عضله و در مقایسه با عضلات دیگر متفاوت است که امکان پاسخ مختص هر ژن و مختص به ترکیب تار را گوشزد می‌کند. این نتیجه با تحقیق Pilegaard و همکاران [۲۹،۳۰] هم راستاست که نشان دادند در مقایسه با عضلات تند انقباض، میزان نسخه‌برداری یک ژن خاص (به عنوان مثال HO-1) در عضلات کند انقباض بیشتر است. شرایط برعکس نیز در مورد بعضی ار ژن‌ها (از قبیل USP3) صادق می‌باشد. زمانی که میزان بیان MCT1 در دو عضله نعلی و EDL با هم مقایسه شد، نتایج حاکی از افزایش بیشتر بیان MCT1 در عضله EDL بود. این نتیجه در ظاهر متناقض به نظر می‌رسد چرا که با توجه به ماهیت استقامتی پروتکل تمرینی مورد استفاده در تحقیق حاضر و با توجه به خصوصیات اکسیداتیو عضله نعلی، افزایش بیشتر بیان MCT1 در این عضله مورد انتظار است. این نتیجه با اصل بیان کمتر- فراهمی بیشتر [۲۹] قابل تفسیر است که طبق آن هر چه محتوی یک پروتئین در بافت مشخص کمتر باشد، به نیازهای متابولیکی، تنظیمی و سیگنالینگ با افزایش در بیان ژن و فراهمی بیشتر mRNA پاسخ می‌دهد. به دلیل اینکه تحقیق ما در جهت پاسخگویی به این امر طراحی نشده بود و ملزومات اظهار نظر در مورد این امر با داده‌های ما فراهم نیست، نمی‌توان دراین مورد اظهار نظر نهایی نمود. مطالعه با روش سریال زمانی در پاسخ به یک جلسه تمرینی حاد، جهت مشخص شدن این موضوع به محققان آینده پیشنهاد می‌شود.

در تحقیق حاضر کاهش قابل توجه در بیان MCT1 و MCT4 در عضلات اسکلتی گروه کنترل دیابتی دیده شد. میزان کاهش در بیان MCT1 در عضله نعلی و EDL به ترتیب ۴۳ و ۴۴ درصد بود. این در حالی است که بیان MCT4 در عضله نعلی و EDL به ترتیب ۴۷ و ۲۷ درصد بود. در پاسخ به تمرین بیان MCT4 در عضله نعلی و EDL در گروه تمرین کرده دیابتی تا حدود سطوح نرمال افزایش پیدا کرد هر چند تمایل به پایین بودن آن درعضله EDL حفظ شد. کاهش در بیان MCT1 و MCT4 در گروه کنترل دیابتی نسبت به گروه کنترل سالم وجبران این کاهش تا حدود سطوح نرمال در گروه تمرین کرده دیابتی دلالت بر این دارد که بیان MCT1 و MCT4 به ترتیب تحت هر دوی تاثیر تغییرات متابولیکی (افزایش لاکتات، انسولین و گلوکز) و افزایش فعالیت انقباضی (تمرین استقامتی) واقع می‌شود، لیکن تمرین استقامتی می‌تواند بر اثرات سایر متغیرها فائق آید. اینکه تمرین باعث افزایش بیان MCT1 و MCT4 می‌شود یا اینکه از کاهش بیان این انتقال دهنده‌ها جلوگیری می‌کند با روش تحقیق حاضر قابل استناد نیست و اجرای مطالعه به صورت سریال زمانی و سنجش بیان MCT1 و MCT4 در طول یک دوره زمانی به محققان بعدی پیشنهاد می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

بیان MCT1 در پاسخ به تمرین در هر دو عضله اسکلتی پایین‌تر از سطوح نرمال بود. زمانی که میزان بیان MCT1 و MCT4 در عضلات اسکلتی گروه تمرینی دیابتی با هم مقایسه شدند، MCT4 در پاسخ به تمرین افزایش بیان بیشتری را از خود نشان داد. اگر چه ما دراین تحقیق میزان تبادل لاکتات را اندازه‌گیری نکردیم، اما تحقیقات پیشین افزایش نرخ تبادل لاکتات را پس از سازگاری با تمرین استقامتی گزارش کرده‌اند [۳۰،۳۱]. MCT1 و MCT4 هر دو در تبادل لاکتات نقش ایفا می‌کنند [۳۲-۳۰] و میزان تبادل لاکتات به محتوی MCT1 و MCT4 وابسته است. محتوی MCT4 تنها به مقادیر آن در سطح سارکولما محدود است [۳۳،۳۴] در حالی که MCT1 هم مقادیر سارکولمایی را شامل می‌شود و هم دارای ذخایر درون سلولی است که امکان انتقال به سطح سارکولما را داراست. Bonen و همکاران [۳۵] در تحقیق خود نشان دادند که بلافاصله بعد از یک جلسه تمرین حاد، میزان بیان MCT1 و MCT4 افزایش می‌یابد ضمن اینکه افزایش در محتوی MCT1 و MCT4 در این دوره نیز اتفاق می‌افتد. این احتمال وجود دارد که به دلیل عدم وجود ذخایر درون سلولی MCT4، اهمیت سازوکارهای پس ترجمه‌ای در تنظیم محتوایی MCT4 نسبت به MCT1 از اهمیت بیشتری برخوردار باشد. موجود بودن اطلاعات در مورد تغییرات محتوای پروتئینی این انتقال دهنده‌ها به همراه اطلاعات بیان ژن آنها می‌تواند صحت این قضیه را مشخص سازد.

اطلاعات در مورد تاثیرات بلند مدت تمرین بر بیان MCT1 و MCT4 در شرایط دیابت نوع ۲ به تحقیق حاضر خلاصه می‌شود و این امکان وجود ندارد که تغییرات بیان MCT1 و MCT4 و پاسخ آن به تمرین با تحقیقات دیگر مقایسه شود. به طور خلاصه نتایج ما نشان داد که بیان MCT1 و MCT4 پیامد در شرایط دیابت نوع ۲ کاهش قابل ملاحظه دارد و تمرین استقامتی می‌تواند این کاهش بیان را تعدیل و به سطوح نرمال نزدیک کند. بیان MCT1 و MCT4 درعضلات اسکلتی الگویی مختص به ژن و فیبر عضلانی دارد و در عضلاتی که به لحاظ متابولیکی متفاوت از یکدیگرند، به روش‌های مختلف تنظیم می‌شود.

سپاسگزاری

نویسندگان بدینوسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران به جهت حمایت مالی از تحقیق حاضر، شرکت دام و طیور کانی دام و مؤسسه واکسن‌سازی و سرم‌سازی رازی کرج به جهت همکاری در تهیه غذای پر چرب ابراز می‌دارند.

منابع

1. Susan LM, Bonen A, Vusse GL. Cardiac substrate uptake and metabolism in obesity and type-2 diabetes: Role of sarcolemmal substrate transporters. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2007; 299: 5–18.
2. Guillaume P, Karen L, Antonia PM, Raynaud E, Pre faut C, Mercier J. Impaired sarcolemmal vesicle lactate uptake and skeletal muscle MCT1 and MCT4 expression in obese Zucke rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 281: E1308–E1315.
3. Bouche C, Serdy S, Kahn C R, Goldfine AB. The Cellular Fate of Glucose and Its Relevance in Type 2 Diabetes. *Endocrine Reviews* 2004; 25(5): 807–830.
4. Bloomgarden MD. Concepts of Insulin Resistance. *Metabolic Syndrome and Related Disorders* 2005; 3(4): 284–293.
5. Metza TL, Sirventa P, Pya G, Brunb JF, Fedoub C, Raynaudb E, Merciera J. Relationship between blood lactate concentration and substrate utilization during exercise in type 2 diabetic postmenopausal women. *Metabolism Clinical and Experimental* 2005; 54: 1102- 1107.
6. Ghanassia E, Brun JF, Fedou C, Raynaud E, Mercier J. Substrate oxidation during exercise: type 2 diabetes is associated with a decrease in lipid oxidationand an earlier shift towards carbohydrate utilization. *Diabetes Metab* 2006; 32: 604-610.
7. Taisuke E, YoshidaY, Hatta H, Bonen A. Exercise training alleviates MCT1 and MCT4 reductions in heart and skeletal muscles of STZinduced diabetic rats. *J Appl Physiol* 2003; 94: 2433-2438.
8. Kiens B. Skeletal Muscle Lipid Metabolism in Exercise and Insulin Resistance. *Physiol Rev* 2006; 86: 205-243.
9. Jonathan B, Browm P, Pedula MK, Barziay M, Herson MK, Latare PE. Lactic Acidosis Rates in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 1998; 21: 1659-1663.

www.SID.ir

Archive of SID

10. Pendergrass M, Bertoldo A, Bonadonna RG, Nucci L, Mandarino C, Cobelli RA. Muscle glucose transport and phosphorylation in type 2 diabetic, obese nondiabetic, and genetically predisposed individuals. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 292: E92-E100.
11. Lombardi A, Fabris M R, Bassetto F, Serra R, Leturque A, Federspil G et al. Hyperlactatemia reduces muscle glucose uptake and GLUT-4 mRNA while increasing (E1a) PDH gene expression in rat. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* 1999; 39: E922–E929.
12. Brooks GA. Lactate shuttle - between but not within cells? *J Physiol* 2002; 541: 333.
13. Brooks GA. Lactate shuttles in Nature. *Biochemical Society Transactions* 2002; 30: part 2.
14. Brooks GA. Intra- and extra-cellular lactate shuttles. *Med Sci Sports Exerc* 2000; 32(4): 790-799.
15. Carsten J, Halestrap AP. Lactate transport in skeletal muscle - role and regulation of the monocarboxylate transporter. *Journal of Physiology* 1999; 517(3) 633-642.
16. Andrew PH, Nigel TP. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J* 1999; 343: 281-299.
17. Brooks GA, Marcia A, Brown CE, Sicurello JP, Herve D. Cardiac and skeletal muscle mitochondria have a monocarpboxylate transporter MCT1. *J Appl Physiol* 1999; 87(5): 1713-1718.
18. Kelley KM, Jason JH, Navarre C, Gladden LB. Lactate metabolism in resting and contracting canine skeletal muscle with elevated lactate concentrationn. *J Appl Physiol* 2002; 93: 865-872.
19. Thomas C, Perrey S, Lambert K, Hugon G, Mornet D, Mercier J. Monocarboxylate transporters, blood lactate removal after supramaximal exercise, and fatigue indexes in humans. *J Appl Physiol* 2005; 98: 804-809.
20. Sahlin K, Fernström M, Svensson M, Tonkonogi M. No evidence of an intracellular lactate shuttle in rat skeletal muscle. *J Physiol* 2002; 541: 569-574.
21. Thomas C, Sirvent P, Perrey S, Raynaud E, Mercier J. Relationships between maximal muscle oxidative capacity and blood lactate removal after supramaximal exercise and fatigue indexes in humans. *J Appl Physiol* 2004; 97: 2132-2138.
22. Bonen A, Miskovic D, Tonouchi M, Lemieux K, Wilson MC, Marette A, et al. Abundance and subcellular distribution of MCT1 and MCT4 in heart and fasttwitch skeletal muscles. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278: E1067-E1077.
23. Bonen A. The expression of lactate transporters (MCT1 and MCT4) in heart and muscle. *Eur J Appl Physiol* 2001; 86: 6-11.
24. Brooks GA, Dubouchaud H, Brown M, Sicurello JP, Butz CE. Role of mitochondrial lactate dehydrogenase and lactate oxidation in the intracellular lactate shuttle. *J Physiol* 1999; 96: 1129-1134.
25. Lore M, ermaelen MV. Endurance training increases lactate transporter in male Zucker falfa rats. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 2005; 331: 1338-1345.
26. Enoki T, Yuko Y, Lally J, Hideo H, Bonen A. Testosterone increases lactate transport, monocarboxylate transporter MCT1 and MCT4 in rat skeletal muscle. *J Physiol* 2006; 577(1) 433-443.
27. Sharma AK, Srinivasan BP. Triple verses glimepiride plus metformin therapy on cardiovascular risk biomarkers and diabetic cardiomyopathy in insulin resistance type 2 diabetes mellitus rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009; 38: 433-444.
28. Viswanad KB, Lydia A, Kaul CL, Ramarao P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening Srinivasan. *Pharmacological Research* 2005; 52: 313-320.
29. Hildebrandt AL, Pilegaard HP, Neufer D. Differential transcriptional activation of selectmetabolic genes in response to variations in exercise intensity and duration. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285: E1021-E1027.
30. Ferguson C, Rossiter HB, Whipp BJ, Cathcart AJ, Murgatroyd SR, Ward SA. Effect of recovery duration from prior exhaustive exercise on the parameters of the power-duration relationship. *J Appl Physiol* 2010; 108: 866-874.
31. Susan LM, Bonen A, Vander GJ, Glatz1 FC, Luiken JFP. Cardiac substrate uptake and metabolism in obesity and type-2 diabetes: Role of sarcolemmal substrate transporters. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2007; 299: 5-18.
32. Bishop D, Edge J, Thomas C, Mercier J. High-intensity exercise acutely decreases the membrane content of MCT1 andMCT4 and buffer capacity in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2007; 102: 616-621.
33. Marcinek DJ, Kushmerick MJ, Conley KE. Lactic acidosis in vivo: testing the link between lactate generation and H^+ accumulation in ischemic mouse muscle. *J Appl Physiol* 2010; 108: 1479-1486.
34. Metz L, Mercier J, Tremblay A, Alméras N, Denis R. Effect of weight loss on lactate transporter expression in skeletal muscle of obese subjects. *J Appl Physiol* 2008; 104: 633-638.
35. Coles L, Litt J, Hatta H, Bonen A. Exercise rapidly increases expression of the monocarboxylate transporters MCT1 and MCT4 in rat muscle. *J Physiol* 2004; 561 (1): 253-261.

www.SID.ir