

Research Paper

Effect of a 6-week Aerobic Exercise Program on High-mobility Group Box 1 Gene Expression in Aortic Tissue of Diabetic Rats



Samira Hassanpour Soleimani¹, *Asiyeh Abbassi Daloi¹, Ahmed Abdi¹, Sheerin Zilaei Bori²

1. Department of Exercise Physiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.

2. Department of Physical Education & Sport Sciences, Masjed-Soliman Branch, Islamic Azad University, Masjed-Soleiman, Iran.



Citation Hassanpour Soleimani S, Abbassi Daloi A, Abdi A, Zilaei Bori Sh. [Effect of a 6-week Aerobic Exercise Program on High-mobility Group Box 1 Gene Expression in Aortic Tissue of Diabetic Rats (Persian)]. Quarterly of "The Horizon of Medical Sciences". 2021; 27(1):82-97. <https://doi.org/10.32598/hms.27.1.2378.1>

doi <https://doi.org/10.32598/hms.27.1.2378.1>



Received: 04 Jul 2016

Accepted: 18 Feb 2017

Available Online: 01 Jan 2021

Key words:

Diabetes, Regular aerobic exercise, Pyroptosis, HMGB1 gene

ABSTRACT

Aims Type 2 diabetes is a rising problem and a significant risk factor for small and large vessel disease. The present study aims to investigate the effect of a 6-week aerobic exercise program on High-mobility Group Box 1 (HMGB1) gene expression in aortic tissue of diabetic rats.

Methods & Materials In this experimental study, 40 male rats aged 8 weeks were randomly selected. Once familiarized with the exercise protocol, they were divided into four groups of healthy-control (n=10), diabetic-control (n=10), healthy-exercise (n=10), and diabetic-exercise (n=10). Type 2 diabetes was first induced, and then the rats run on a treadmill for 6 weeks, 5 sessions per week. After 12-14 h of fasting and 72 h after the last session, aortic tissue sampling was performed for HMGB1 analysis by quantitative real-time polymerase chain reaction (q-RT PCR) technique. Data analysis was performed using 1-way ANOVA and Tukey post hoc test at the significant level of $P < 0.05$.

Findings Induction of type 2 diabetes led to a significant increase in HMGB1 gene expression in rats ($P = 0.001$), significantly reduced following aerobic exercise ($P = 0.003$). Aerobic exercise also reduced the expression of the HMGB1 gene in healthy rats ($P = 0.000$).

Conclusion Aerobic exercise may have a protective effect by reducing the HMGB1 gene expression in the aortic tissue of diabetic rats. It can be used as an effective non-pharmacological method to improve diabetes-induced inflammation and prevent vascular disorders.

Extended Abstract

1. Introduction

Type 2 diabetes is a rising problem and a significant risk factor for small and large vessel disease [1]. Currently, inflammatory processes play a key role in all complications of diabetes. It has now been shown that inflammation is not limited to the host's pathogen control but occurs

in the absence of viral or bacterial pathogens and is associated with hyperglycemia complications [2]. One study has shown that diabetes is a significant risk factor for atherosclerosis, with an incidence of 2-4 times higher than that in the non-diabetic population [3]. Adhesion and plaque formation in the arteries causes endothelial dysfunction. There are several reports on the role of systemic inflammation in the development of atherosclerosis. In these patients, the expression and plasma concentration of inflammatory factors and their mediators increase [4]. Data from analysis of rodent and human atherosclerotic plaques have shown that

* Corresponding Author:

Asiyeh Abbassi Daloi, PhD.

Address: Department of Physical Education and Sport Science, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.

Tel: +98 (911) 1274366

E-mail: abbasi.daloi@gmail.com

interleukin (IL)-1 β and IL-18, both are NLRP3 inflammatory activation products, play a vital role in the initiation and progression of atherosclerosis. Deficiency of IL-1 β or IL-18 and delivery of the antagonist to the IL-1 β receptor reduces the amount of atherosclerotic lesion [5].

Pyroptosis is a pre-inflammatory form of regulated cell death. It is dependent on the enzymatic activity of inflammatory proteases belonging to the family of cysteine-dependent aspartate-directed proteases (caspases). Pyroptosis is morphologically, mechanically, and pathophysiologically distinct from other cell death forms, apoptosis, and necrosis. It is characterized by rapid rupture of the plasma membrane, resulting in the release of intracellular contents and proinflammatory mediators, including IL-1 β , IL-18, and HMGB1. Recent studies have shown that pyroptosis may be involved in atherosclerosis and play an essential role in the instability of atherosclerotic lesions [6]. HMGB1, one of the higher members of the HMG protein family, was initially considered an essential mediator for maintaining chromosome structure and stability in various cells, including eukaryotic cells [7]. As a proinflammatory cytokine, the extracellular transmission of HMGB1 during inflammatory responses significantly increases serum levels in patients with inflammatory disorders [8]. Diabetes mellitus is also associated with inflammatory dysfunction, and HMGB1 has been reported to be associated with diabetes mellitus or high glucose conditions [9, 10]. HMGB1 levels increase in vitreous fluid and extraretinal membranes of diabetic retinopathy [7].

Studies have shown that exercise positively affects metabolic parameters such as insulin sensitivity, lipid profile, and endothelial function [11, 12]. These metabolic parameters and endothelial dysfunction are useful in developing coronary artery disease and stroke [13]. Exercise plays an essential role in controlling inflammatory diseases such as diabetes by reducing the secretion of inflammatory cytokines and increasing the secretion of anti-inflammatory cytokines [14]. Aerobic exercise reduces HMGB1 levels in the blood and tissue of diabetic rats [15] and blocks the middle cerebral artery in an experimental model of rats [16]. However, finding the exact mechanisms of aerobic exercise effects on HMGB1 gene expression and related mechanisms requires further studies in diabetic patients. Therefore, this study aimed to investigate the impact of 6 weeks of aerobic exercise on the expression of the HMGB1 gene in the aortic tissue of healthy and diabetic rats.

2. Materials and Methods

Study samples

This experimental study was performed on 40 male Wistar rats aged 8 weeks with a Mean \pm SD of weight of 200 \pm 20 g. They were prepared from the Physiology Research Center in Ahvaz, Iran. They were randomly divided into four groups: healthy-control, diabetic-control, healthy-exercise, and diabetic-exercise. They were kept in the Animal Laboratory of the Physiology Department of Ahvaz University of Medical Sciences under controlled conditions: 12:12 light-dark cycle (light on at 6 AM, light off at 6 PM), a temperature of 22 $^{\circ}$ C \pm 3 $^{\circ}$ C, and humidity of about 45%. Three to five rats were kept in Plexiglas cages with mesh doors and a dimension of 25 \times 27 \times 43 cm such that they had free access to water and food. All experiments on rats were performed according to the guidelines of the Animal Ethics Committee of Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences. Throughout the study, the rats were moved and manipulated only by one person.

Induction of diabetes

To induce type 2 diabetes, the rats were first injected intraperitoneally with nicotinamide 120 (mg/kg). Fifteen minutes later, 60 mg/kg streptozotocin (STZ) dissolved in normal 0.1 M citrate buffer was injected intraperitoneally. Then, to ensure that the animal had become diabetic, the amount of blood glucose was assessed 72 h after STZ injection using a glucometer. Rats with a fasting blood sugar greater than 250 mg/dL were considered diabetic [17]. Due to the risk of STZ-induced hypoglycemia, the rats received 10% glucose solution 6 h after STZ administration until 24 h later [18].

Exercise protocol

One week after the induction of diabetes, the rats in the exercise groups performed exercise on a treadmill for 6 weeks, 5 days a week. Before starting the main exercise and for familiarization, the rats started running on the treadmill for 10-15 min at a speed of 5-7 m/min and zero inclines for two consecutive days. Two days after familiarization, the main exercise began, and the rats run on the treadmill for 6 weeks. The exercise in the first week was performed at a speed of 10 m/min for 10 minutes. In the next few weeks, the speed and duration of running on the treadmill increased: 10 m/min for 20 minutes in the second week, 14-15 m/min for 20 minutes in the third week, 14-15 m/min for 30 minutes in the fourth week, and 18 m/min for 30 minutes in the fifth and sixth weeks (Table 1) [19].

Total RNA extraction

For molecular studies of the gene expression level, RNA was extracted from tissues in all study groups using an RNA kit (QIAGEN, Germany) according to the manufacturer's instruction. First, 200-300 Landa Kiazol QIAzol was added to the tissue and kept at -80°C for 24 h. After 24 h, the cryotube's plaque was crushed in a semi-frozen state by a sampler and was then slightly pipetted. About 100 Landa chloroforms were then added to the sample to lys the cells. This solution should be in contact with the cells for about 1 minute. After 1 minute, the solution was centrifuged at 12,000 rpm for 10 minutes (Hettich, Germany). After centrifugation, the solution was divided into three parts: 1) upper part of the tube, which was clear and contained RNA, 2) middle part of the tube, which was white and included the tissue cell lysis, and 3) lower part of the tube was pink that contained QIAzol.

The clear liquid at the top of the tube containing the RNA was gently removed and placed in a DEPC-treated microtube. ICC of isopropanol was then poured onto clear RNA and stirred by hand for 1 minute. Isopropanol is clear and RNA is clear, but when the two are mixed together, they form a turbid liquid. It is better to put the obtained solution at -80 degrees overnight. After adding isopropanol, the samples were centrifuged at 12000 rpm for 10 min. After removing the centrifuge, the supernatant was drained, and 1 mL of 70% alcohol was added. After vortexing, the mixture was centrifuged at 7500 rpm for 10 min. The supernatant was then drained with a sampler, and then the plaque was dried inside the microtube. To dissolve RNA, 20 Landa of 60°C distilled water was poured on the plate inside the microtube. It was then pipetted slightly with a sampler and placed on a 60°C plate for 5 minutes. The extracted RNA was maintained at -80°C until further use.

Synthesis of cDNA

After extracting RNA with high purity and concentration from all studied samples, cDNA synthesis steps were performed using a cDNA synthesis kit (Fermentas, USA) according to the manufacturer's instructions. Then, the synthesized cDNA was used for reverse transcription reaction. First, all designed primers related to all genes were examined, and then gene expression was analyzed using the quantitative real-time polymerase chain reaction (q-RT PCR) method.

Polymerase chain reaction

Primers were prepared in lyophilized form. To make the primers, a specific volume of sterile distilled water was add-

ed to each tube containing the lyophilized primer (based on information about each primer). This solution was placed as a stock at -20°C . To perform each test, the following materials with the mentioned concentrations were poured into the 48-well containers and mixed: 10 μL SYBER Green + Master Mix (ABI, USA), 10 pmol (0.5 mL) forward primer, 10 pmol (0.5 mL) reverse primer, 1 μL cDNA, and 8 μL DEPC-treated water. The samples were kept on ice until transfer to the device.

Molecular measurement of gene expression

As mentioned above, the q-RT PCR method (ABI StepOne, Applied Biosystems) was used for measuring gene expression. For this purpose, using QIAzol solution, the RNA of all cells was extracted according to the CinnaGen protocol and exposed to DNase I (Fermentas, USA) to ensure infection with genomic DNA. Then the quality of extracted RNAs was evaluated by a spectrophotometer (DPI-1, QIAGEN, Germany). To prepare cDNA, a single-strand Oligo (dt) primer (MWG-Biotech, Germany) and reverse transcription enzyme (Fermentas, USA) were used according to the related protocol. Each PCR was performed using PCR Master Mix (Applied Biosystems), SYBR Green (ABI StepOne, Applied Biosystems), and Sequences Detection Systems (Foster City, CA, USA) according to the manufacturers' protocol. Forty cycles were considered for each q-RT PCR cycle, and the temperature of each cycle was set as 94°C for 20 seconds, 58°C - 60°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds. The melting diagram was plotted to evaluate the accuracy of PCRs and was evaluated specifically with a negative control diagram for each gene to check for contamination in each reaction.

Data analysis

Descriptive statistics (frequency, mean, and standard deviation) were used for describing data. The Kolmogorov-Smirnov (KS) test was used to determine the normality of data distribution, and Levene's test measured the equality of variances. The one-way ANOVA and Tukey post hoc test was used to determine the significant differences between variables and their interaction. Findings were evaluated at a 95% confidence level ($P < 0.05$). All statistical analyses were performed in SPSS V. 21.

3. Results

The mean and standard deviation of HMGB1 levels in different study groups are presented in Table 3. The results showed that the highest levels of HMGB1 belonged to the diabetic-control group and the lowest levels to the healthy-exercise group. Since the KS results (Table 3) and Lev-

Table 1. Aerobic exercise protocol

Week	Duration (min)	Speed (m/min)
1	10	10
2	20	10
3	20	14-15
4	30	14-15
5	30	18
6	30	18

Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences**Table 2.** List of primers sequences

Gene	Sequence
r-Hmgb1-f	TGAAATGTAGGGCTGTGAAGA
r-Hmgb1-r	TGTACTAGGCAAGGTTAGTGG

Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences**Table 3.** The mean and standard deviation of HMGB1 levels in different study groups

Group	Diabetic-control	P*	Diabetic-exercise	P*	Healthy-exercise	P*	Healthy-control	P*
Mean	0.401	0.802	0.147	0.386	0.049	0.139	0.114	0.551
Standard deviation	0.103		0.037		0.013		0.029	

Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

* The Shapiro-Wilk test.

Table 4. Results of 1-way ANOVA for comparison of study groups in terms of HMGB1 level

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between-group	0.216	3	0.072	22.053	0.000
Within-group	0.026	8	0.003		
Total	0.242	11			

Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

ene's test ($P=0.106$) indicated normal data distribution and equality of variances, respectively, so the test conditions were established. The results of 1-way ANOVA (Table 4) indicated a significant difference in HMGB1 levels between different study groups ($F=22.053$, $P=0.000$). Overall, induction of diabetes caused a significant increase in aortic tissue's HMGB1 gene level, and then aerobic exercise significantly reduced its level. However, it was still far from the

gene expression level of healthy rats. Aerobic exercise also reduced the expression of the HMGB1 gene in healthy rats.

The mean and standard deviation of blood glucose levels in the study groups are shown in Table 5. Tukey post hoc test was used to examine which groups differed from each other (Table 6). There was a significant difference between the mean blood glucose level between diabetic-control, healthy-exercise, and diabetic-exercise, such that the mean

Table 5. The Mean±SD of blood glucose levels in different study groups

Group	Blood Glucose (mg/dL)	
	N	Mean±SD
Healthy-control	10	110.11±4.64
Healthy-exercise	10	93.25±5.32
Diabetic-control	10	271.81±23.52
Diabetic-exercise	10	187.13±14.83

Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

Table 6. Tukey Post Hoc Test results

Dependent variable	Group I	Group J	Mean difference (I-J)	Standard error	Sig.
Blood glucose level	Healthy control	Diabetic-control	-161.700	5.364	0.000
		Healthy-exercise	16.860	5.364	0.031
	Healthy exercise	Diabetic-exercise	-77.020	5.364	0.000
		Diabetic-exercise	-93.880	5.364	0.000
		Diabetic control	Diabetic-exercise	84.680	5.364

Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

blood glucose of the healthy-control group was higher than that of the healthy-exercise group and lower than that of diabetic-control and diabetic-exercise groups. There was also a significant difference in mean blood glucose level between the healthy-exercise and the diabetic-exercise groups, where it was lower in the healthy-exercise group. Furthermore, there was also a significant difference in the mean blood glucose level between the diabetic-control and diabetic-exercise groups, where it was higher in the diabetic-control group.

4. Discussion

In this study, induction of diabetes led to a significant increase in the expression level of the HMGB1 gene in the aortic tissue of rats. Then aerobic exercise significantly reduced its level. Aerobic exercise also reduced the gene expression in healthy rats. HMGB1 is involved in many physiological and pathological processes, such as DNA repair, transcription, and extracellular signal transduction [15]. In normal tissues, most cells express none or only low levels of HMGB1 [20]. Transfer of HMGB1 from the nucleus to the cytoplasm and further out of the cell occurs only in pathological conditions (ischemia, trauma, hyperglycemia, etc.) [21]. High blood sugar causes oxidative stress,

which leads to the activation of NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) and thus increases the level of proinflammatory cytokines. A study has shown an increase in serum levels of TNF-α (tumor necrosis factor-alpha) and C-reactive protein due to diabetes induction [22]. Studies have shown a significant rise in HMGB1 by glucose, which is associated with the upregulation of proinflammatory cytokines by activating the NF-κB signaling pathways, and HMGB1 inhibition strategy reduces proinflammatory cytokines in response to high glucose by inhibiting the NF-κB signaling pathways. This issue indicates the regulatory role of HMGB1 in inflammatory responses in diabetic patients [9]. Increased blood glucose leads to increased expression of HMGB1 and TNF-α genes [23]. Studies have shown that proinflammatory cytokines such as TNF-α impair insulin signaling in insulin-sensitive tissues. Elevated systemic levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 have been reported to protect skeletal muscle from the secretion of diabetes-associated macrophages, increased inflammatory cytokine TNF-α, and the adverse effects of these cytokines on insulin signaling and glucose metabolism, and therefore associated with increased insulin sensitivity [24]. Exercise stimulates the production of anti-inflammatory cytokines such as IL-10 and reduces the production of proinflammatory cytokines such as TNF-α,

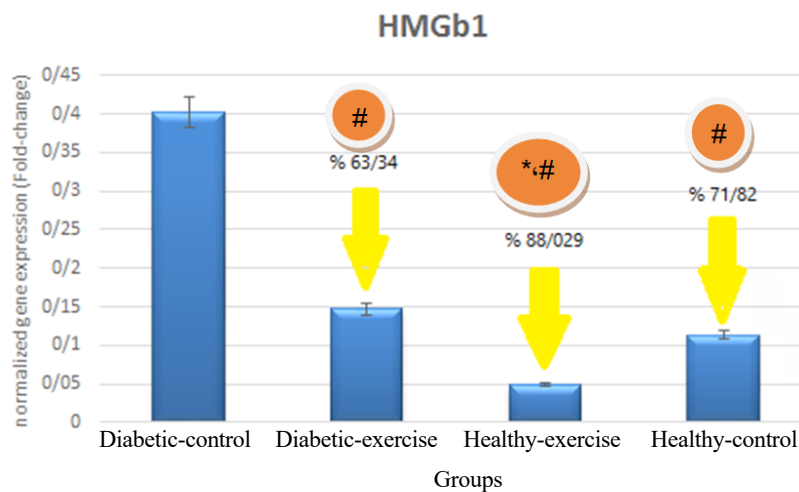


Figure 1. Comparison of mean HMGB1 levels in different study groups

Significant difference compared to the diabetic-control; * Significant difference compared to the healthy-control.

Quarterly of
The Horizon of Medical Sciences

thus playing an essential role in controlling diabetes. Studies have suggested that exercise may indirectly increase IL-10 affecting the secretion of other inflammatory and anti-inflammatory cytokines, such as IL-16 [25].

Yu et al. indicated the role of HMGB1 protein in the development of diabetic retinopathy [23]. HMGB1 is a highly conserved protein. It has been reported that multiple pathological stimuli, in addition to necrosis, may cause HMGB1 to leave the cell. Related studies have shown that HMGB1 can not only enhance the inflammatory response but can also stimulate the formation of new blood vessels [26]. In the study by Yu et al. [23], the expression of the HMGB1 gene was significantly higher in diabetic rats than in controls. They showed that HMGB1 was 6.1 times more expressed in the retinal cells of diabetic rats. This suggests that long-term hyperglycemia may stimulate HMGB1 gene expression and that HMGB1 may contribute to diabetic retinopathy in rats. Some studies have shown that HMGB1 and ROS are more expressed in the retina under acute ischemia-reperfusion injury [27, 28]. Volz found that, although HMGB1 in rats with diabetic retinopathy changed later compared to other inflammatory factors such as VEGF, it had a longer shelf life [29]. This suggests that the HMGB1 protein may be involved in the later stages of diabetic retinopathy. It was recommended that HMGB1 might be involved in inflammation and new vascular formation in diabetic retinopathy through binding to advanced glycation end products (RAGE) and TLR2 receptors [28, 30]. HMGB1 may be involved in diabetes through receptor binding, and HMGB1 content is directly related to retinal cell apoptosis. Diagnosis of HMGB1 levels and its treatment in clinics can help predict and treat the complications of diabetes. In the present study, the induction of diabetes significantly increased the expression of the HMGB1

gene in aortic tissue, which may lead to endothelial dysfunction in rats.

On the other hand, regular aerobic exercise led to a significant reduction in the HMGB1 gene. In line with our study, Pan et al. showed that exercise on a treadmill reduced the transfer of HMGB1 to the cytoplasm. HMGB1 showed a positive feedback loop, causing autophagy [15]. OGD activates autophagy in PC12 cells and recombinant HMGB1 (rHMGB1) increases the binding of HMGB1 to Beclin1, thereby increasing LC3 expression and increasing the autophagy flux. Studies have shown that exercise reduces gene expression Cytokine IL-1 β [31]. Previous studies have also shown that treadmill exercise affects serum HMGB1 level [16]. This finding indicates another mechanism that treadmill exercise regulates HMGB1 expression. Recently, HMGB1, as an essential proinflammatory factor in pathological conditions, has been studied in animal models and clinical settings [32]. Extracellular HMGB1 recognizes receptors such as RAGE and TLR2/4, and further activates the NF- κ B signaling pathway, and promotes inflammatory responses [33]. Studies have shown that exercise reduces gene expression Cytokine IL-1 β . Hence, it is possible that exercise decreases the inflammatory response through HMGB1 and exerts its protective effect [16, 34]. Pan et al. reported that aerobic exercise reduces cardiac tissue HMGB1 protein in diabetic patients [15], and Gialoria et al. reported a decrease in this gene in patients with myocardial infarction [35]. Heat shock proteins (HSPs) increase after exercise.

On the other hand, they are effective in reducing the expression of HMGB1 and the cytoplasmic transmission and secretion of HMGB1 [36]. Therefore, one of the possible mechanisms of HMGB1 reduction in the aortic tissue of

diabetic rats following aerobic exercise can be an increase in the HSP level. Despite reduced HMGB1 gene expression in the aortic tissue of diabetic rats by aerobic exercise, the gene level was still far from the level in healthy rats. Therefore, it is suggested that in future studies, while increasing the study period, the use of other effective non-pharmacological interventions, including the use of herbal supplements, be useful in further reducing this gene level in the healthy rats.

5. Conclusion

Six weeks of aerobic exercise reduced HMGB1 gene expression in the aortic tissue of diabetic rats. Therefore, aerobic exercise can be an effective non-pharmacological method to improve inflammation caused by diabetes and prevent vascular disorders. A definite statement requires further studies in this field.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study was approved by the Research Ethics Committee of Islamic Azad University of Marvdasht branch (Code: IR.IAU.M.REC.1399.007).

Funding

This article was extracted from the PhD. dissertation of Samira Hassanpour Soleimani at Amol Azad University, Faculty of Sports Sciences, majoring in Exercise Physiology (Cardiovascular and Respiratory Arteries) without funding.

Authors' contributions

Conceptualization: Asieh Abbassi-Daloei; Writing – original draft, and Writing – review & editing: Asieh Abbassi-Daloei, Samira Hassanpour, and Shireen Zilaei; Data collection and data analysis: Samira Hassanpour Soleimani; Writing, editing, and review: All authors.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

اثر تمرین هوازی بر بیان ژن HMGB1 در بافت آئورت موش‌های صحرایی دیابتی

سمیرا حسن پور سلیمانی^۱، آسیه عباسی دلویی^{۱*}، احمد عبدی^۱، شیرین زیلابی بوری^۲

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد آیت‌الله املی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.

۲. گروه فیزیولوژی ورزشی، واحد مسجد سلیمان، دانشگاه آزاد اسلامی، مسجد سلیمان، ایران.

چکیده

تاریخ دریافت: ۱۴ تیر ۱۳۹۵

تاریخ پذیرش: ۳۰ بهمن ۱۳۹۵

تاریخ انتشار: ۱۲ دی ۱۳۹۹

اهداف: دیابت نوع ۲ یک بیماری در حال رشد و یک خطر مهم برای ابتلا به بیماری عروق کوچک و بزرگ است. هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر شش هفته تمرین هوازی بر بیان ژن HMGB1 بافت آئورت موش‌های دیابتی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی چهل سر موش صحرایی نر (هشت هفته‌ای) به طور تصادفی انتخاب و پس از آشنایی با پروتکل تمرین به چهار گروه تقسیم شدند (ده سر در هر گروه): ۱. کنترل سالم؛ ۲. کنترل دیابت؛ ۳. تمرین دیابت؛ ۴. تمرین سالم. ابتدا مدل دیابت القا شد سپس در گروه تمرینی پنج روز دوییدن روی تردمیل به مدت شش هفته اجرا شد. پس از دوازده تا چهارده ساعت ناشتایی و ۷۲ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، نمونه‌گیری از بافت آئورت جهت تجزیه و تحلیل HMGB1 با تکنیک PCR Real Time انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه انجام شد. در صورت مشاهده تفاوت معنی‌دار از آزمون تعقیبی توکی جهت تعیین محل اختلاف بین گروهی استفاده شد ($P < 0.05$).

یافته‌ها: القای دیابت منجر به افزایش معنی‌دار بیان ژن HMGB1 در بافت آئورت موش‌ها شد ($P = 0.001$) که انجام تمرین هوازی سبب کاهش معنی‌دار این ژن شد ($P = 0.003$). همچنین انجام تمرین هوازی در موش‌های سالم نیز مقادیر بیان ژن HMGB1 بافت آئورت را کاهش داد ($P = 0.000$).

نتیجه‌گیری: تمرین هوازی ممکن است با کاهش بیان ژن HMGB1 در بافت آئورت موش‌های صحرایی دیابتی اثر محافظتی داشته باشد و می‌تواند به عنوان یک روش غیردارویی مؤثر برای بهبود التهاب ناشی از دیابت و جلوگیری از اختلالات عروقی مورد استفاده قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها:

دیابت، تمرین منظم هوازی، پیروپتوزیس، بیان ژن HMGB1

مقدمه

دیابت نوع ۲ یک بیماری در حال رشد و یک خطر مهم برای ابتلا به بیماری عروق کوچک و بزرگ است [۱]. در حال حاضر در زمینه عوارض دیابت، فرایندهای التهابی نقش کلیدی را ایفا می‌کنند و همه عوارض ناشی از دیابت را تحت تأثیر قرار می‌دهند. اکنون مشخص شده است که التهاب به کنترل پاتوزن‌ها توسط میزبان محدود نمی‌شود، بلکه التهابی که در صورت عدم وجود پاتوزن‌های ویروسی یا باکتری رخ می‌دهد، همراه با عوارض ناشی از هیپرگلیسمی است [۲].

تحقیقات نشان داده است که دیابت یک عامل خطر مهم برای آترواسکلروز است که میزان بروز آن دو تا چهار برابر بیشتر از جمعیت غیردیابتی است [۳]. چسبندگی و ایجاد پلاک در عروق، باعث بروز اختلال در عملکرد اندوتلیوم می‌شود. گزارشات متعددی مبنی بر نقش التهاب سیستمیک در بروز آترواسکلروز وجود دارد؛ چنان‌که در این بیماران، بیان و غلظت پلاسمایی فاکتورهای التهابی

و واسطه‌های آن افزایش می‌یابد [۴]. اطلاعات حاصل از تجزیه و تحلیل پلاک‌های آترواسکلروز جوندگان و انسان‌ها نشان داده است که IL-1 β و IL-18 که هر دو از محصولات فعال‌سازی التهابی NLRP3 هستند، نقش کلیدی در شروع و پیشرفت آترواسکلروز دارند. کمبود IL-1 β یا IL-18 و همچنین تحویل آنتاگونیست به گیرنده IL-1 β ، با کاهش مشخصی در میزان ضایعه آترواسکلروتیک مربوط است [۵]. پیروپتوزیس یک شکل پیش‌التهابی از مرگ سلولی تنظیم‌شده است و به فعالیت آنزیمی پروتئازهای التهابی وابسته است که متعلق به خانواده پروتئازهای مختص آسپاراتات وابسته به سیستمین (کاسپازها) هستند. پیروپتوز از نظر مورفولوژیکی، مکانیکی و پاتوفیزیولوژیکی از سایر اشکال مرگ سلولی آپوپتوز و نکروز متمایز است. پیروپتوزیس با پارگی سریع غشای پلازما و در نتیجه انتشار محتویات داخل سلولی و واسطه‌های پیش‌التهابی، از جمله IL-1 β ، HMGB1 و IL-18 مشخص می‌شود. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که پیروپتوزیس ممکن است در آترواسکلروز درگیر باشد و نقش مهمی در بی‌ثباتی ضایعه آترواسکلروتیک ایفا کند [۶].

* نویسنده مسئول:

دکتر آسیه عباسی دلویی

نشانی: آمل، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آیت‌الله املی، گروه فیزیولوژی ورزشی.

تلفن: ۱۲۷۴۳۶۶ (۹۱۱) +۹۸

پست الکترونیکی: abbasi.dalooi@gmail.com

رطوبت حدود ۴۵ درصد نگهداری شدند. تعداد سه تا پنج عدد موش در قفس‌هایی از جنس پلکسی گلاس با در توری و به ابعاد ۲۵ در ۲۷ در ۴۳ سانتی‌متر به گونه‌ای نگهداری شدند که آزادانه به آب و غذای استاندارد دسترسی داشتند. تمامی مراحل نگهداری و کشتار موش‌ها بر اساس ضوابط کمیته اخلاقی حیوانات دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز انجام شد. در سرتاسر دوره تحقیق موش‌ها توسط یک نفر جابه‌جا و دست‌کاری شدند.

برای ایجاد دیابت نوع ۲، ابتدا نیکوتین آمید ۰/۱۲ گرم به صورت داخل صفاقی به موش‌های صحرایی تزریق شد و ۱۵ دقیقه بعد، یک تک‌دز STZ یا استرپتوزوتوسین ۰/۰۶ گرم حل‌شده در نرمال بافر سترات ۰/۱ مولار به صورت داخل صفاقی، به حیوان تزریق شد. سپس برای اطمینان از دیابتی شدن حیوان، میزان افزایش قند خون، ۷۲ ساعت پس از تزریق STZ^۱ با استفاده از گلوکومتر مورد ارزیابی قرار گرفت. موش‌های صحرایی که قند ناشتای آن‌ها بیشتر از ۲۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بود. به عنوان دیابتی در نظر گرفته شدند [۱۷]. به دلیل خطر هایپوگلیسمی ناشی از STZ موش‌ها بعد از شش ساعت از تجویز STZ تا ۲۴ ساعت بعد محلول گلوکز ۱۰ درصد دریافت کردند [۱۸].

یک هفته بعد از القای دیابت، موش‌ها در گروه مداخله ورزشی به مدت شش هفته و پنج روز در هفته روی تردمیل تمرین انجام دادند. قبل از شروع تمرینات اصلی و به منظور آشناسازی، موش‌های صحرایی به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه با سرعت ۵-۷ متر در دقیقه با شیب صفر درجه برای دو روز متوالی روی تردمیل شروع به دویدن کردند. دو روز پس از تمرینات آشناسازی، تمرینات اصلی آغاز شدند و موش‌های صحرایی به مدت شش هفته به اجرای فعالیت روی تردمیل پرداختند. پروتکل تمرین در هفته اول با سرعت ۱۰ متر در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در شیب صفر درجه اجرا شد. در هفته‌های بعد سرعت و مدت زمان دویدن روی تردمیل افزایش یافت؛ به طوری که حیوانات در هفته دوم با سرعت ۱۰ متر در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه، در هفته سوم با سرعت ۱۴-۱۵ متر در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه، در هفته چهارم با سرعت ۱۴-۱۵ متر در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه و هفته پنجم و ششم با سرعت ۱۸ متر در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه روی تردمیل دویدند [۱۹] (جدول شماره ۱).

جهت بررسی‌های مولکولی در سطح بیان ژن، ابتدا استخراج RNA از بافت‌ها در همه گروه‌های مورد بررسی، طبق پروتکل شرکت سازنده (کیژن، آلمان) انجام گرفت.

ابتدا به تخمک‌ها ۲۰۰-۳۰۰ لاندا کیزول اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای منهای ۸۰ قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت پلاک موجود در کرایوتیوب در حالت نیمه‌انجماد توسط سرسمپلر خرد شد و کمی پیتاژ شد. سپس به نمونه حدود صد

HMGB1، یکی از اعضای بالایی خانواده پروتئین HMG، در ابتدا به عنوان یک واسطه‌گر مهم برای حفظ ساختار و پایداری کروموزوم در سلول‌های مختلف از جمله سلول‌های یوکاریوتی در نظر گرفته می‌شد [۷]. به عنوان یک سایتوکین پیش‌التهابی، انتقال خارج سلولی HMGB1 در طی پاسخ‌های التهابی باعث افزایش معنی‌داری در سطوح سرمی در بیماران مبتلا به اختلالات التهابی در مطالعات in vivo می‌شود [۸]. دیابت ملیتوس همچنین به اختلال عملکرد التهابی مربوط می‌شود و طبق گزارش‌ها، HMGB1 با دیابت ملیتوس یا شرایط گلوکز بالا همراه می‌شود [۹، ۱۰]. سطوح HMGB1 در مایع زجاجی و غشاهای خارج شبکیه‌ای رتینوپاتی دیابتی افزایش نشان داده است [۷].

مطالعات نشان داده‌اند که تمرینات ورزشی یک اثر مطلوب روی پارامترهای متابولیک مانند حساسیت انسولین، نیمرخ لیپیدی و عملکرد اندوتلیوم دارد [۱۱، ۱۲]. این پارامترهای متابولیک و اختلال عملکرد اندوتلیوم در توسعه بیماری عروق کرونر و سکتة مهم هستند [۱۳]. تمرینات ورزشی با کاهش ترشح سایتوکین‌های التهابی و افزایش ترشح سایتوکین‌های ضدالتهابی در کنترل بیماری‌های مرتبط با التهاب نظیر دیابت، نقشی اساسی دارند [۱۴]. تمرینات هوازی موجب کاهش سطوح HMGB1 در خون و بافت رت‌های دیابتی [۱۵] و رت‌های مدل تجربی (انسداد شریان مغزی میانی) می‌شود [۱۶]. با این حال، مطالعات اندکی در این زمینه صورت گرفته و پیدا کردن سازوکارهای دقیق اثرات تمرین هوازی بر بیان ژن HMGB1 و مکانیسم‌های مرتبط با آن نیازمند مطالعات بیشتر در بیماران دیابتی است. از این رو، این مطالعه با هدف بررسی تأثیر شش هفته تمرین هوازی بر بیان ژن HMGB1 بافت آئورت موش‌های سالم و دیابتی صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر به صورت تجربی روی موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار انجام شد.

چهل سر موش صحرایی نر هشت‌هفته‌ای با میانگین وزنی 20 ± 20 از مرکز تحقیقات فیزیولوژی اهواز تهیه شد. سپس موش‌های صحرایی به صورت تصادفی به چهار گروه سالم و دیابتی تقسیم شدند. ۱. گروه‌های سالم: این گروه‌ها شامل بیست سر موش نر هشت‌هفته‌ای بودند که به صورت تصادفی به دو گروه کنترل و تمرین هوازی تقسیم شدند. ۲. گروه‌های دیابتی: این گروه شامل بیست سر موش نر ویستار هشت‌هفته‌ای بودند. که به صورت تصادفی به دو گروه دیابتی و دیابت + تمرین هوازی تقسیم شدند.

موش‌ها در آزمایشگاه حیوانات بخش فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی اهواز در شرایط کنترل‌شده نور (دوازده ساعت روشنایی و دوازده ساعت تاریکی، شروع روشنایی شش صبح و شروع خاموشی شش عصر) و در دمای 22 ± 3 سانتی‌گراد و

1. Streptozocin

• Primer Revers 10، پیکومولار (۰/۵ میکرولیتر)

• cDNA 1 میکرولیتر

• DEPC Water 8 میکرولیتر

نمونه‌ها تا زمان انتقال به دستگاه روی یخ نگه داشته شدند. از تکنیک RT-qPCR (شرکت ABI Stepone ساخت کشور آمریکا) جهت تأیید بیان ژن مورد مطالعه به صورت کمی استفاده شد. برای این منظور ابتدا با استفاده از محلول کیزول، RNA کل سلول‌ها طبق پروتکل سیناژن استخراج شد و جهت اطمینان از آلودگی با DNA ژنومیک، در معرض (Fermentas) (DNase I) قرار گرفت. سپس کیفیت RNAهای استخراج شده با دستگاه اسپکترومتری (DPI-1, Kiagen) مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت تهیه cDNA تک‌رشته‌ای از پرایمر (MWG-) Oligo dt (Fermentas, Germany) و آنزیم نسخه‌برداری معکوس (-Fermen-PCR) بر اساس پروتکل مربوطه استفاده شد. هر واکنش با استفاده از (Applied Biosystems) (PCR master mix) SYBER Green در دستگاه (Applied Biosystems, Sequences Detection Systems. Foceter) (City, CA) طبق پروتکل شرکت سازنده انجام شد. چهل سیکل برای هر چرخه Real-Time PCR در نظر گرفته شد و دماهای هر سیکل به صورت ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه، ۵۸-۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه در نظر گرفته شدند. نمودار Melting جهت بررسی صحت واکنش‌های PCR انجام شده و به صورت اختصاصی برای هر ژن ترسیم شد و در هر بار از واکنش کنترل منفی جهت بررسی وجود آلودگی در هر واکنش مورد ارزیابی قرار گرفت.

در بخش آمار توصیفی از شاخص‌های مرکزی میانگین و پراکندگی انحراف معیار و رسم نمودار استفاده شد. در بخش آمار استنباطی جهت تعیین نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون کولموگروف اسمیرنوف استفاده شد. همچنین همسان بودن واریانس‌ها با آزمون لون سنجیده شد. جهت تعیین معنادار بودن تفاوت بین متغیرها و تعامل آن‌ها از آنالیز واریانس یک‌راهه و آزمون تعقیبی توکی^۲ استفاده شد. یافته‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P < 0.05$) بررسی شدند. کلیه محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام شد.

یافته‌ها

میانگین و انحراف معیار سطوح HMGB1 گروه‌های مختلف پژوهش در **جدول شماره ۳** ارائه شده است. نتایج نشان می‌دهد که بیشترین سطوح HMGB1 مربوط به گروه کنترل دیابت و کمترین سطوح آن متعلق به گروه سالم تمرین هوازی بود. از آنجایی که نتایج آزمون شاپیرو ویلک (**جدول شماره ۳**) و آزمون لون ($P = 0.106$)

لاندا کلروفرم اضافه شد تا سلول‌ها لیز شود. این محلول حدود یک دقیقه با سلول‌ها در تماس بود.

پس از یک دقیقه محلول با دور دوازده هزار به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (شرکت Hettich کشور آلمان) شد. پس از سانتریفیوژ محلول به سه فاز تقسیم شد: قسمت بالایی لوله که شفاف و حاوی RNA بود؛ قسمت وسطی لوله که سفیدرنگ و حاوی بافت لیز شده بود؛ قسمت پایینی لوله که صورتی و حاوی کیزول بود.

مایع شفاف قسمت بالایی لوله که حاوی RNA بود به آرامی برداشته و در یک میکروتیوب DEPC شده قرار داده شد. پس یک سی‌سی ایزوپروپانول روی RNA شفاف ریخته شد و یک دقیقه با دست به هم زده شد. ایزوپروپانول و RNA شفاف بود، اما وقتی این دو با هم مخلوط شدند مایع کدری را به وجود آوردند. بهتر است این محلول یک شب در دمای منهای ۸۰ قرار گیرد.

پس از افزودن ایزوپروپانول نمونه‌ها در سانتریفیوژ با دور دوازده هزار به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. پس از خارج کردن از سانتریفیوژ مایع رویی تخلیه و به آن یک سی‌سی الکل ۷۰ درصد اضافه شد. پس از Vortex کردن، مخلوط در سانتریفیوژ ۱۰ دقیقه با دور ۷۵۰۰ قرار گرفت. سپس مایع رویی با سمپلر تخلیه شد و سپس پلاک در داخل میکروتیوب خشک شد.

به منظور حل کردن RNA به میزان ۲۰ لاندا آب مقطر ۶۰ درجه روی پلاک داخل میکروتیوب ریخته شد. سپس کمی با سرمپلر پیپتاژ (به مدت ۵ دقیقه) روی صفحه ۶۰ درجه قرار داده شد. RNA استخراج شده تا زمان استفاده در دمای منهای ۸۰ قرار گرفت.

پس از استخراج RNA با خلوص و غلظت بالا از تمامی نمونه‌های مورد مطالعه، مراحل سنتز cDNA طبق پروتکل شرکت سازنده (Fermentas, USA) انجام گرفت و سپس cDNA سنتز شده جهت انجام واکنش رونویسی معکوس مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا کلیه پرایمرهای طراحی شده مربوط به تمامی ژن‌ها، مورد بررسی قرار گرفت و سپس بررسی بیان ژن‌ها با استفاده از روش کمی q-RT-PCR انجام گرفت (**جدول شماره ۲**).

پرایمرها به صورت لیوفیلیزه در دسترس قرار گرفتند. برای آماده‌سازی پرایمرها حجم مشخص آب مقطر استریل به هر تیوب حاوی پرایمر لیوفیلیزه (بر اساس اطلاعات مربوط به هر پرایمر) اضافه شد و این محلول به عنوان استوک در دمای منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. به این ترتیب جهت انجام کار برای هر بار تست، مواد زیر به نسبت‌های مشخص داخل ظروف ۴۸ خانه ریخته و با یکدیگر ترکیب شدند:

• CYBER Green + Master Mix میکرولیتر (ABI, USA)

• Primer Forward 10 پیکومولار (۰/۵ میکرولیتر)

2. Post hoc Tukey's test

جدول ۱. پروتکل تمرین هوازی

سرعت تمرین	تمرین مدت	هفته
۱۰ متر بر دقیقه	۱۰ دقیقه	هفته اول
	۲۰ دقیقه	هفته دوم
۱۴-۱۵ متر بر دقیقه	۲۰ دقیقه	هفته سوم
	۳۰ دقیقه	هفته چهارم
۱۸ متر بر دقیقه	۳۰ دقیقه	هفته پنجم
	۳۰ دقیقه	هفته ششم

فوق دانش

جدول ۲. جدول توالی پرایمر

ژن	توالی
r-Hmgb1-f	TGAAATGTAGGGCTGTGTAAGA
r-Hmgb1-r	TGTACTAGGCAAGGTTAGTGG

فوق دانش

جدول ۳. شاخص‌های مرکزی و پراکندگی سطوح HMGB1 در گروه‌های مختلف پژوهش

گروه	کنترل دیابت	ارزش P	دیابت تمرین هوازی	ارزش P	سالم تمرین هوازی	ارزش P	کنترل سالم	ارزش P
میانگین	۰/۴۰۱	۰/۸۰۲	۰/۱۴۷	۰/۳۸۶	۰/۰۴۹	۰/۱۱۴	۰/۵۵۱	
انحراف معیار	۰/۱۰۳	۰/۰۳۷	۰/۰۱۳	۰/۰۲۹	۰/۰۲۹	۰/۰۲۹	۰/۰۲۹	

فوق دانش

ارزش P: مربوط به آزمون شاپیروویلیک.

اختلاف معنی‌دار وجود دارد؛ بنابراین فرضیه صفر (فرضیه تفاوت بین میانگین گلوکز خون گروه‌ها) تأیید می‌شود (جدول شماره ۵). برای آگاهی از اینکه تفاوت بین کدام گروه‌ها وجود دارد، از آزمون پیگیری توکی استفاده شده است (جدول شماره ۶). بین میانگین میزان گلوکز خون گروه کنترل با میانگین گروه‌های کنترل دیابت، تمرین هوازی و دیابت تمرین اختلاف معنی‌داری وجود داشت؛ به طوری که میانگین گلوکز خون گروه کنترل بالاتر از گروه‌های تمرین و پایین‌تر از گروه‌های کنترل دیابت و دیابت تمرین بود.

همچنین بین میانگین گلوکز خون گروه تمرین با میانگین گروه دیابت تمرین اختلاف معنی‌داری وجود داشت؛ به طوری که میانگین گلوکز خون گروه تمرین پایین‌تر بود. علاوه بر این بین میانگین گلوکز خون گروه دیابت با گروه دیابت تمرین اختلاف معنی‌داری وجود داشت؛ به طوری که میانگین گلوکز خون گروه دیابت بالاتر بود.

به ترتیب دلالت بر توزیع نرمال داده‌ها و تجانس واریانس داشتند، شرایط آزمون برقرار است. نتایج تحلیل واریانس یک‌طرفه در سطوح HMGB1 گروه‌های مختلف پژوهش نشان‌دهنده آن است که ارزش F محاسبه شده (۲۲/۰۵۳) و معنی‌داری آن در سطح $P=0/000$ حاکی از وجود تفاوت معنی‌داری بین سطوح HMGB1 در گروه‌های مختلف پژوهش است.

نتایج تصویر شماره ۱ حاکی از آن است که گروه کنترل دیابت با گروه‌های دیابت تمرین هوازی، کنترل سالم و سالم تمرین هوازی در سطح اطمینان ۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار دارند. در مجموع القای دیابت باعث افزایش معنی‌دار ژن HMGB1 بافت آئورت شد و انجام تمرین هوازی سبب کاهش معنی‌دار این ژن شد، ولی هنوز با سطح بیان ژن موش‌های سالم فاصله داشت. همچنین انجام تمرین هوازی در موش‌های سالم نیز بیان ژن HMGB1 بافت آئورت را کاهش داد.

نتایج تحلیل واریانس یک‌طرفه (جدول شماره ۴) در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ بود؛ چون مقدار F محاسبه‌شده بزرگ‌تر از F جدول است، می‌توان اظهار کرد حداقل بین میانگین‌های دو گروه

جدول ۴. نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه سطوح HMGB1 در گروه‌های مختلف پژوهش

منابع تغییر	مجموع مربعات SS	درجات آزادی df	میانگین مربعات	ارزش F	ارزش P
بین گروهی	۰/۲۱۶	۳	۰/۰۷۲	۲۲/۰۵۳	۰/۰۰۰
درون گروهی	۰/۰۲۶	۸	۰/۰۰۳		
جمع کل	۰/۲۴۲	۱۱			

افق دانش

جدول ۵. میانگین \pm انحراف استاندارد میزان گلوکز خون گروه‌ها

گروه / متغیر	تعداد	میانگین \pm انحراف استاندارد
کنترل	۱۰	۱۱۰/۱۱ \pm ۴/۶۴
تمرین هوازی	۱۰	۹۳/۲۵ \pm ۵/۳۲
دیابت	۱۰	۲۷۱/۸۱ \pm ۲۳/۵۲
دیابت تمرین هوازی	۱۰	۱۸۷/۱۳ \pm ۱۴/۸۳

افق دانش

جدول ۶. نتایج آزمون پیگیری توکی در مورد میزان گلوکز خون گروه‌ها

متغیر وابسته	گروه (I)	گروه (II)	تفاوت میانگین (I-II)	خطای استاندارد	سطح معنی داری
میزان گلوکز خون	کنترل	کنترل	-۱۶۱/۷۰۰	۵/۳۶۴	۰/۰۰۰
	تمرین هوازی	کنترل	۱۶/۸۶۰	۵/۳۶۴	۰/۰۳۱
	دیابت تمرین	کنترل	-۷۷/۰۲۰	۵/۳۶۴	۰/۰۰۰
	دیابت تمرین	تمرین	-۹۳/۸۸۰	۵/۳۶۴	۰/۰۰۰
	دیابت تمرین	دیابت	۸۴/۶۸۰	۵/۳۶۴	۰/۰۰۰

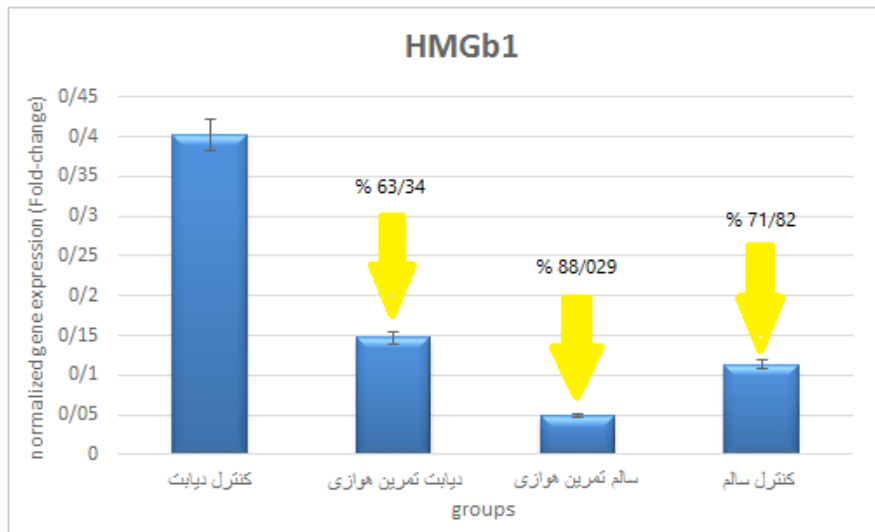
افق دانش

افزایش قند خون موجب استرس اکسایشی می‌شود که به نوبه خود منجر به فعال‌سازی NF- κ B و در نتیجه افزایش سطح سایتوکین‌های پیش‌التهابی خواهد شد. تحقیقات افزایش سطح سرمی TNF- α و پروتئین واکنشی C را در اثر القای دیابت نشان می‌دهد [۲۲]. در مطالعات افزایش معنی‌دار HMGB1 توسط گلوکز نشان داده شده است که با تنظیم افزایشی سایتوکین‌های پیش‌التهابی از طریق فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ NF- κ B ارتباط دارد و استراتژی مهار HMGB1، سایتوکین‌های پیش‌التهابی را در پاسخ به گلوکز بالا از طریق مهار مسیر سیگنالینگ NF- κ B کاهش می‌دهد. این نشان‌دهنده نقش تنظیمی HMGB1 در پاسخ‌های التهابی در آزمودنی‌های دیابتی است [۹].

افزایش گلوکز خون منجر به افزایش بیان ژن‌های HMGB1 و TNF- α می‌شود [۲۳]. مطالعات نشان داده‌اند که سایتوکین‌های

بحث

القای دیابت منجر به افزایش معنی‌دار بیان ژن HMGB1 در بافت آئورت موش‌ها شد و انجام تمرین هوازی سبب کاهش معنی‌دار این ژن شد. همچنین انجام تمرین هوازی در موش‌های سالم نیز مقادیر بیان ژن بافت آئورت را کاهش داد. HMGB1 در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی، مانند ترمیم DNA، رونویسی و انتقال سیگنال خارج سلولی دخیل است [۱۵]. در بافت‌های طبیعی و نرمال، اکثر سلول‌ها هیچ یا فقط سطح پایینی از سطوح HMGB1 را بیان می‌کنند [۲۰]. انتقال HMGB1 از هسته به سیتوپلاسم و بیشتر به خارج از سلول تنها در شرایط پاتولوژیک (ایسکمی، تروما، هایپرگلیسمی و غیره) اتفاق می‌افتد [۲۱].



تصویر ۱. مقایسه میانگین سطوح HMGB1 در گروه‌های مختلف پژوهش

*تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل دیابت؛ *تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل سالم.

فوق تخصصی دانش

موش‌ها مشارکت کند [۲۳]. برخی از مطالعات نشان می‌دهد که ROS و HMGB1 در شبکه‌ی تحت آسیب حاد ایسکمی برقراری مجدد جریان خون، بیشتر بیان می‌شود [۲۸، ۲۷]. ولز دریافت HMGB1 در موش‌های مبتلا به رتینوپاتی دیابتی در مقایسه با دیگر عوامل التهابی مانند VEGF دیرتر تغییر کرد، اما مدت ماندگاری آن بیشتر بود [۲۹]. این نشان می‌دهد که پروتئین HMGB1 ممکن است در مرحله بعدی رتینوپاتی دیابتی درگیر شود.

تصور می‌شد که HMGB1 ممکن است در التهاب و تشکیل عروق جدید در رتینوپاتی دیابتی از طریق اتصال به گیرنده RAGE و TLR2 شرکت می‌کند [۳۰، ۲۸]. HMGB1 ممکن است از طریق اتصال به گیرنده در دیابت نقش داشته باشد. محتوای HMGB1 با آپوپتوز سلول‌های شبکه‌ی ارتباط مستقیمی دارد. تشخیص سطح HMGB1 و درمان هدفمند HMGB1 در کلینیک می‌تواند به پیش‌بینی و درمان عوارض دیابت کمک کند. پژوهش حاضر نیز القای دیابت، بیان ژن HMGB1 را به طور قابل توجهی در بافت آئورت افزایش داد که ممکن است از این طریق منجر به اختلالات عملکرد اندوتلیوم در موش‌ها شود. از طرفی انجام تمرینات منظم هوازی منجر به کاهش قابل توجه ژن HMGB1 شد. هم‌راستا با پژوهش حاضر، گیویان و همکاران نشان دادند که تمرینات تردمیل انتقال HMGB1 به سیتوپلاسم را کاهش می‌دهد. HMGB1 یک حلقه بازخورد مثبت را نشان می‌دهد که سبب اتوفاجی می‌شود [۱۵]. OGD اتوفاجی را در سلول‌های PC12 فعال می‌کند و HMGB1 نو ترکیب (rHMGB1) اتصال HMGB1 به Beclin1 را افزایش می‌دهد، در نتیجه بیان LC3 را افزایش می‌دهد و شار اتوفاجی را زیاد می‌کند [۳۱].

مطالعات پیشین نشان دادند که تمرینات تردمیل همچنین بر

پیش‌التهابی مانند TNF- α به پیام‌رسانی انسولین در بافت‌های حساس به انسولین آسیب می‌زنند. گزارش شده است که افزایش سطوح سیستمیک سایتوکین ضدالتهابی اینترلوکین ۱۰ عضله از اسکلتی در برابر ترشح ماکروفاژهای مرتبط با دیابت و افزایش سایتوکین التهابی TNF- α و اثرات زیان‌آور این سایتوکین‌ها بر سیگنالینگ انسولین و متابولیسم گلوکز محافظت می‌کند و بنابراین با افزایش حساسیت به انسولین همراه است [۲۴].

فعالیت ورزشی تولید سایتوکین‌های ضدالتهابی همانند اینترلوکین ۱۰ را تحریک می‌کند و تولید سایتوکین پیش‌التهابی TNF- α را کاهش می‌دهد و از این طریق در کنترل دیابت نقش مهمی ایفا می‌کند. محققان اعلام کردند که این احتمال وجود دارد که ورزش به واسطه تأثیر در ترشح سایر سایتوکین‌های التهابی و ضدالتهابی نظیر اینترلوکین ۶ به طور غیرمستقیم به افزایش اینترلوکین ۱۰ منجر می‌شود [۲۵].

یائو یو و همکاران نقش پروتئین HMGB1 را در توسعه رتینوپاتی دیابتی مورد توجه بیشتری قرار دادند [۲۳]. HMGB1 یک نوع از پروتئین هسته بسیار محافظه‌کار است. گزارش شده است که محرک پاتولوژیکی چندگانه علاوه بر نکرورز ممکن است سبب خروج HMGB1 از سلول شود. مطالعات مرتبط نشان می‌دهد که HMGB1 نه تنها می‌تواند واکنش التهابی را تقویت کند، بلکه می‌تواند تشکیل عروق جدید را تحریک کند [۲۶]. در پژوهش یائو یو و همکاران بیان ژن HMGB1 در موش‌های دیابتی در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری بیشتر بود. آن‌ها نشان دادند که HMGB1 در سلول‌های شبکه‌ی موش‌های دیابتی ۶/۱ بار بیشتر بیان شده است و این نشان می‌دهد که هایپرگلیسمی طولانی‌مدت می‌تواند بیان ژن HMGB1 را تحریک کند و HMGB1 ممکن است در رتینوپاتی دیابتی در

مروودشت و با کد IR.IAU.M.REC.1399.007 انجام شد.

حامی مالی

این مقاله از پایان نامه دکتری سمیرا حسن پور سلیمانی در دانشگاه آزاد آمل، دانشکده علوم ورزشی، رشته فیزیولوژی ورزش (قلب و عروق تنفس) استخراج و بدون دریافت کمک مالی انجام شده است.

مشارکت نویسندگان

ایده اصلی: آسیه عباسی دلوثی؛ نگارش مقاله و تأیید نهایی مقاله: آسیه عباسی دلوثی، احمد عبدی، شیرین زیلایی و سمیرا حسن پور سلیمانی سلیمانی، جمع‌آوری داده‌ها و تفسیر داده‌ها: سمیرا حسن پور سلیمانی؛ نگارش نهایی: تمامی نویسندگان.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافع در اجرای این پژوهش وجود نداشته است.

بیان سرمی HMGB1 اثر می‌گذارد [۱۶] که این نشان از وجود مکانیسم دیگری است که تمرینات ترمیم را HMGB1 را تنظیم می‌کند. اخیراً HMGB1، یک عامل مهم پیش‌التهابی در شرایط پاتولوژیک، در مدل‌های حیوانی و در کلینیک مورد مطالعه قرار گرفته است [۳۲]. HMGB1 خارج سلولی گیرنده‌هایی مانند محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته (RAGE) و Tlr2,4 را می‌شناسد و مسیر سیگنالینگ NFkB را بیشتر فعال می‌کند و پاسخ‌های التهابی را ترویج می‌دهد [۳۳]. مطالعات نشان می‌دهد که تمرینات ورزشی بیان سایتوکین Il-1 β را کاهش می‌دهند، بنابراین ممکن است که تمرینات ورزشی پاسخ التهابی را از طریق HMGB1 کاهش دهند و از این طریق اثر محافظتی خود را اعمال کنند [۱۶، ۳۴].

تقی‌بیگی و همکاران گزارش کرده‌اند که تمرین هوازی موجب کاهش پروتئین HMGB1 بافت قلبی در بیماران دیابتی می‌شود [۱۵]. همچنین جیالوریا و همکاران کاهش این ژن را در بیماران مبتلا به سکتة قلبی گزارش کرده‌اند [۳۵]. تحقیقات نشان داده‌اند که پروتئین‌های شوک حرارتی (HSP) متعاقب تمرینات ورزشی افزایش می‌یابند، از طرفی در کاهش بیان HMGB1 مؤثر هستند و انتقال و ترشح سیتوپلاسمی HMGB1 را کاهش می‌دهند [۳۶]. از این رو یکی از سازوکارهای احتمالی کاهش HMGB1 در بافت آئورت موش‌های دیابتی می‌تواند افزایش HSP ناشی از تمرینات هوازی باشد.

با تمرین هوازی علی‌رغم کاهش بیان ژن HMGB1 در بافت آئورت موش‌های دیابتی، همچنان این بیان، با سطح این ژن در موش‌های سالم فاصله داشت؛ بنابراین پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده ضمن افزایش مدت مطالعه، استفاده از سایر مداخلات غیردارویی مؤثر از جمله استفاده از مکمل‌های گیاهی برای کاهش بیشتر این ژن و رساندنش به سطح موش‌های سالم، بررسی شود.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر شش هفته تمرین هوازی منجر به کاهش بیان ژن HMGB1 در بافت آئورت موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت شد؛ بنابراین می‌توان بیان کرد تمرین هوازی ممکن است به‌عنوان یک روش غیردارویی مؤثر برای بهبود التهاب ناشی از دیابت و جلوگیری از اختلالات عروقی مورد استفاده قرار گیرد. باتوجه به مطالعات اندک در این زمینه اظهار نظر قطعی نیازمند مطالعات بیشتر در این زمینه است.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این تحقیق با تأیید کمیته اخلاق در دانشگاه آزاد اسلامی واحد

References

- [1] Scherrenberg M, Dendale P. Exercise training in diabetes. *European Journal of Preventive Cardiology*. 2019; 26(7):698-700. [DOI:10.1177/2047487319829674] [PMID]
- [2] Wilding JPH. Medication use for the treatment of diabetes in obese individuals. *Diabetologia*. 2018; 61:265-72. [DOI:10.1007/s00125-017-4288-1] [PMID] [PMCID]
- [3] Khaleeli E, Peters SR, Bobrowsky K, Oudiz RJ, Ko JY, Budoff MJ. Diabetes and the associated incidence of subclinical atherosclerosis and coronary artery disease: Implications for management. *American Heart Journal*. 2001; 141(4):637-44. [DOI:10.1067/mhj.2001.113224] [PMID]
- [4] Asgari S, Hashemi M, Goli-Malekabadi N, Keshvari M. [The effects of acute consumption of pomegranate juice (*Punica granatum* L.) on decrease of blood pressure, inflammation, and improvement of vascular function in patients with hypertension: A clinical trial (Persian)]. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences*. 2015; 16(6):84-91. <http://journal.skums.ac.ir/article-1-1761-en.html>
- [5] Rader DJ. IL-1 and atherosclerosis: A murine twist to an evolving human story. *The Journal of Clinical Investigation*. 2012; 122(1):27-30. [DOI:10.1172/JCI61163] [PMID] [PMCID]
- [6] Xu YJ, Zheng L, Hu YW, Wang Q. Pyroptosis and its relationship to atherosclerosis. *Clínica Chimica Acta*. 2018; 476:28-37. [DOI:10.1016/j.cca.2017.11.005] [PMID]
- [7] Hui Y, Yin Y, Tian DH. Combination of serum HMGB1 and serum miR-126 achieve high predictive power to detect proliferative diabetic retinopathy: A Chinese population-based study. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2019; 12(5):5909-14. <http://www.ijcem.com/files/ijcem0078585.pdf>
- [8] Czura CJ, Tracey KJ. Targeting high mobility group box 1 as a late-acting mediator of inflammation. *Critical Care Medicine*. 2003; 31(1):S46-50. [DOI:10.1097/00003246-200301001-00007] [PMID]
- [9] Wang H, Qu H, Deng H. Plasma HMGB1 levels in subjects with obesity and type 2 diabetes: A cross-sectional study in China. *PLoS One*. 2015; 10(8):e0136564. [DOI:10.1371/journal.pone.0136564] [PMID] [PMCID]
- [10] Beckman JA, Paneni F, Cosentino F, Creager MA. Diabetes and vascular disease: Pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part II. *European Heart Journal*. 2013; 34(31):2444-52. [DOI:10.1093/eurheartj/ehh142] [PMID]
- [11] Kränkel N, Bahls M, Van Craenenbroeck E, Adams V, Serratos L, Solberg EE, et al. Exercise training to reduce cardiovascular risk in patients with metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus: How does it work? *European Journal of Preventive Cardiology*. 2019; 26(7):701-8. [DOI:10.1177/2047487318805158] [PMID]
- [12] Yanai H, Adachi H, Masui Y, Katsuyama H, Kawaguchi A, et al. Exercise therapy for patients with type 2 diabetes: A narrative review. *Journal of Clinical Medicine Research*. 2018; 10(5):365-9. [DOI:10.14740/jocmr3382w] [PMID] [PMCID]
- [13] Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. The anti-inflammatory effects of exercise: Mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nature Reviews Immunology*. 2011; 11(9):607-15. [DOI:10.1038/nri3041] [PMID]
- [14] Taghibeigi Hoseinabadi H, Esfarjani F, Marandi SM, Karami H. [Effects of eight weeks of aerobic training on expression levels of the HMGB1-RAGE/TLR4-NF- κ B proinflammatory pathway in cardiac tissue of male rats with hyperglycemia (Persian)]. *Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2019; 20(5):246-52. <http://ijem.sbmu.ac.ir/article-1-2477-en.html>
- [15] Pan G, Jin L, Shen W, Zhang J, Pan J, Cheng J, et al. Treadmill exercise improves neurological function by inhibiting autophagy and the binding of HMGB1 to Beclin1 in MCAO juvenile rats. *Life Sciences*. 2020; 243:117279. [DOI:10.1016/j.lfs.2020.117279] [PMID]
- [16] Shirwaikar A, Rajendran K, Punitha ISR. Antidiabetic activity of alcoholic stem extract of *Coscinium fenestratum* in streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005; 97(2):369-74. [DOI:10.1016/j.jep.2004.11.034] [PMID]
- [17] Palsamy P, Subramanian S. Reaveratrol, a natural phytoalexin normalizes hyperglycemia in streptozotocin - nicotinamide induced experimental diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2008; 62(9):598-605. [DOI:10.1016/j.biopha.2008.06.037] [PMID]
- [18] Chae CH, Jung SL, An SH, Jung CK, Nam SN, Kim HT. Treadmill exercise suppresses muscle cell apoptosis by increasing nerve growth factor levels and stimulating p-phosphatidylinositol 3-kinase activation in the soleus of diabetic rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 2011; 67(2):235-41. [DOI:10.1007/s13105-010-0068-9] [PMID]
- [19] Tang D, Kang R, Livesey KM, Cheh CW, Farkas A, Loughran P, et al. Endogenous HMGB1 regulates autophagy. *The Journal of Cell Biology*. 2010; 190(5):881-92. [DOI:10.1083/jcb.200911078] [PMID] [PMCID]
- [20] Wu Y, Xu J, Xu J, Zheng W, Chen Q, Jiao D. Study on the mechanism of JAK2/STAT3 signaling pathway-mediated inflammatory reaction after cerebral ischemia. *Molecular Medicine Reports*. 2018; 17(4):5007-12. [DOI:10.3892/mmr.2018.8477]
- [21] Kajitani N, Shikata K, Nakamura A, Nakatou T, Hiramatsu M, Makino H. Microinflammation is a common risk factor for progression of nephropathy and atherosclerosis in Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2010; 88(2):171-6. [DOI:10.1016/j.diabres.2010.01.012] [PMID]
- [22] Chen Y, Qiao F, Zhao Y, Wang Y, Liu G. HMGB1 is activated in type 2 diabetes mellitus patients and in mesangial cells in response to high glucose. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2015; 8(6):6683-91. [PMID] [PMCID]
- [23] Yu Y, Yang L, Lv J, Huang X, Yi J, Pei C, et al. The role of High Mobility Group Box 1 (HMGB1) in the diabetic retinopathy inflammation and apoptosis. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2015; 8(6):6807-13. [PMID] [PMCID]
- [24] Hirose L, Nosaka K, Newton M, Laveder A, Kano M, Peake J, et al. Changes in inflammatory mediators following eccentric exercise of the elbow flexors. *Exercise Immunology Review*. 2004; 10:75-90. [PMID]
- [25] Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Reviews Immunology*. 2011; 11(2):85-97. [DOI:10.1038/nri2921] [PMID] [PMCID]
- [26] Lupo G, Anfuso CD, Ragusa N, Strosznajder RP, Walski M, Alberghina M. t-Butyl hydroperoxide and oxidized low density lipoprotein enhance phospholipid hydrolysis in lipopolysaccharide-stimulated retinal pericytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2001; 1531(1-2):143-55. [DOI:10.1016/S1388-1981(01)00102-0]
- [27] El-Asrar AM, Missotten L, Geboes K. Expression of high-mobility groups box-1/receptor for advanced glycation end products/osteopontin/early growth response-1 pathway in proliferative vitreoretinal epiretinal membranes. *Molecular Vision*. 2011; 17:508-18. [PMID] [PMCID]
- [28] Chen Y, Sun W, Gao R, Su Y, Umehara H, Dong L, et al. The role of high mobility group box chromosomal protein 1 in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2013; 52(10):1739-47. [DOI:10.1093/rheumatology/ket134] [PMID]

- [29] Bucolo C, Leggio GM, Drago F, Salomone S. Eriodictyol prevents early retinal and plasma abnormalities in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochemical Pharmacology*. 2012; 84(1):88-92. [DOI:10.1016/j.bcp.2012.03.019] [PMID]
- [30] Naglova H, Bucova M. HMGB1 and its physiological and pathological roles. *Bratislava Medical Journal*. 2012; 113(3):163-71. [DOI:10.4149/BLL_2012_039] [PMID]
- [31] Wang J, Han D, Sun M, Feng J. Cerebral ischemic post-conditioning induces autophagy inhibition and a HMGB1 secretion attenuation feedback loop to protect against ischemia reperfusion injury in an oxygen glucose deprivation cellular model. *Molecular Medicine Reports*. 2016; 14(5):4162-72. [DOI:10.3892/mmr.2016.5747] [PMID] [PMCID]
- [32] Ye Y, Zeng Z, Jin T, Zhang H, Xiong X, Gu L. The role of high mobility group box 1 in ischemic stroke. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2019; 13:127. [DOI:10.3389/fncel.2019.00127] [PMID] [PMCID]
- [33] Lok KZ, Basta M, Manzanero S, Arumugam TV. Intravenous immunoglobulin (IVIg) dampens neuronal toll-like receptor-mediated responses in ischemia. *Journal of Neuroinflammation*. 2015; 12:73. [DOI:10.1186/s12974-015-0294-8] [PMID] [PMCID]
- [34] Zhang Y, Cao RY, Jia X, Li Q, Qiao L, Yan G, et al. Treadmill exercise promotes neuroprotection against cerebral ischemia-reperfusion injury via downregulation of pro-inflammatory mediators. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 2016; 12:3161-73. [DOI:10.2147/NDT.S121779] [PMID] [PMCID]
- [35] Giallauria F, Cirillo P, D'agostino M, Petrillo G, Vitelli A, Pacileo M, et al. Effects of exercise training on high-mobility group box-1 levels after acute myocardial infarction. *Journal of Cardiac Failure*. 2011; 17(2):108-14. [DOI:10.1016/j.cardfail.2010.09.001] [PMID]
- [36] Atalay M, Oksala NKJ, Laaksonen DE, Khanna S, Nakao C, Lappalainen J, et al. Exercise training modulates heat shock protein response in diabetic rats. *Journal of Applied Physiology*. 2004; 97(2):605-11. [DOI:10.1152/jappphysiol.01183.2003] [PMID]