

تأثیر تمرین تناوبی شدید و عسل آویشن بر تکثیر و تمایز سلول‌های قلبی رت‌های نر مبتلا به دیابت نوع دو

مهديه كوشا^۱، حسين عابد نطنزی^۲، ماندانا غلامی^۳، فرشاد غزالیان^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: ورزش و آنتی‌اکسیدان‌ها، به عنوان یک درمان محافظتی در برابر خطر دیابت شناخته می‌شوند. هدف از پژوهش حاضر، بررسی تأثیر تمرین تناوبی شدید و عسل آویشن بر تکثیر و تمایز سلول‌های بافت قلب رت‌های نر مبتلا به دیابت نوع دو بود.

روش‌ها: این مطالعه‌ی تجربی، بر روی ۳۶ رت مبتلا به دیابت انجام شد. رت‌ها به طور تصادفی در چهار گروه شاهد مبتلا به دیابت (۸ سر)، تمرین تناوبی (۱۰ سر)، عسل آویشن (۸ سر)، تمرین تناوبی و مصرف عسل آویشن (۱۰ سر) تقسیم شدند. مداخله‌ی تمرینی به صورت ۸ هفته HIIT، شامل ۲ تا ۸ تناوب دو دقیقه‌ای دویدن با شدت ۸۰ تا ۹۰ درصد VO₂max و استراحت یک دقیقه‌ای با شدت ۵۰ تا ۵۶ درصد VO₂max، به مدت ۵ جلسه در هفته اجرا می‌شود. علاوه بر این، ۳ گرم بر کیلوگرم عسل آویشن، ۵ روز در هفته در گروه‌های مکمل مصرف شد. بیان ژن‌های Nkx2.5، Tbx5 و Gata4 توسط real-time RT-PCR ارزیابی گردید. جهت بررسی تفاوت بین گروه‌ها از آزمون ANOVA و آزمون تعقیبی LSD استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که بیان ژن Gata4، Tbx5 و Nkx2.5 در گروه HIIT نسبت به گروه شاهد، افزایش معنی‌داری دارد اما این یافته‌ها در شاخص‌های Tbx5 و Nkx2.5 در گروه عسل تکرار نشد ($P > 0.05$).

نتیجه‌گیری: HIIT با افزایش بیان ژن‌های Nkx2.5، Tbx5 و Gata4 سبب تکثیر و تمایز سلول قلب رت‌های مبتلا به دیابت می‌شد در حالی که تأثیر عسل آویشن و تعامل آن با تمرین، نمی‌توانست مزایای مشابهی در رت‌های مبتلا به دیابت داشته باشد.

واژگان کلیدی: تمرین تناوبی شدید؛ دیابت؛ عسل؛ آنتی‌اکسیدان؛ میوسیت قلبی؛ Gata4؛ Tbx5؛ Nkx2.5

ارجاع: كوشا مهديه، عابد نطنزی حسين، غلامی ماندانا، غزالیان فرشاد. تأثیر تمرین تناوبی شدید و عسل آویشن بر تکثیر و تمایز سلول‌های قلبی رت‌های نر مبتلا به دیابت نوع دو. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۱؛ ۴۰ (۶۶۰): ۸۳-۷۶

مقدمه

دیابت، یک ناهنجاری متابولیک پیچیده است که به وسیله‌ی سیگنالینگ انسولین مخدوش شده و مقاومت انسولینی ایجاد می‌کند که باعث افزایش تولید گلوکز هپاتیک می‌شود (۱). بیماری قلب دیابتی به عنوان بد عملکردی میوکاردی شناخته می‌شود که مستقل از CAD (Coronary artery disease) و پرفشارخونی می‌باشد (۲). یکی از عوامل مهم در پیشرفت نارسایی قلبی، کمبود سلول‌های عضله‌ی قلبی به همراه عدم وجود یک راهکار مناسب برای ترمیم محل آسیب دیده است. یافته‌های اخیر در زمینه‌ی سلول‌های بنیادی نشان می‌دهد که این سلول‌ها می‌توانند جایگزین مناسبی برای

عضله‌ی قلبی آسیب دیده باشند (۳).

مطالعات اخیر، سلول‌های تمایز نیافته‌ی رت از قلب موش و انسان جدا کرده‌اند که آنتی‌ژن‌ها و شاخص‌های سلول‌های بنیادی و اندوتلیال را بیان می‌کنند و به نظر می‌رسد خواص سلول‌های بنیادی قلب بزرگسالان را داشته باشند (۴). توانایی تکثیر CSCs به کاردیومیوسیت‌ها در پاسخ به تحریک‌ها بسیار اهمیت دارد، زیرا در صورت افزایش می‌تواند مبنایی برای نوزایی قلب آسیب دیده در نظر گرفته شود. یکی از تنظیم‌کننده‌های شناخته شده در تکثیر کاردیومیوسیت‌ها، Gata4 است که درگورخر ماهی (۵) مشاهده شده است. Gata4 همراه با Tbx5، Nkx2.5 و SRF، Gata6 به عنوان

۱- دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه تخصصی تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه تخصصی تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: حسین عابد نطنزی؛ استادیار، گروه تخصصی تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

Email: abednazari@gmail.com

عملکرد قلبی می‌شود (۱۳).

با توجه به تأثیر ورزش و نیز اثر هم‌افزایی آنتی‌اکسیدان‌ها در ایجاد سازگاری‌های مثبت فیزیولوژیکی، محافظت از قلب و بهبود عملکرد قلبی، خصوصاً در بیماران مبتلا به دیابت، تاکنون هیچ مطالعه‌ای به طور گسترده، ظرفیت تکثیر و تمایز سلول‌های قلبی را بعد از ابتلا به قلب دیابتی، در پاسخ به تمرین ورزشی و مصرف غسل آویشن بررسی نکرده است. بنابراین، پژوهش حاضر در صدد پاسخگویی به این سؤال است که آیا تمرین تناوبی و مصرف خوراکی غسل آویشن در موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت، بر فاکتورهای مربوط به تکثیر و تمایز سلول‌های قلبی نظیر *Gata4*، *NKX 2.5* و *Tbx5* تأثیر دارد؟

روش‌ها

در این پژوهش تجربی، تعداد ۳۶ رت نر نژاد ویستار جوان با میانگین وزنی 10 ± 110 گرم به عنوان نمونه‌ی آماری از پژوهشگاه رویان خریداری و به حیوان‌خانه‌ی آزمایشگاه رازی دانشگاه آزاد علوم و تحقیقات انتقال داده شدند. رت‌ها پس از دو هفته آشنایی با محیط آزمایشگاه و رسیدن به وزن میانگین (20 ± 197) به مدت ۱۲ هفته غذای پرچرب (۴۵ درصد) و ۸ هفته غذای پرچرب (۶۰ درصد) از انرژي کل از چربی مشتق شده از روغن حیوانی، تهیه شده توسط پژوهشکده‌ی زیست و فناوری رویان تغذیه شدند (۱۴). سپس به ۴ گروه شاهد دیابتی (۸ سر)، تمرین تناوبی (۱۰ سر)، غسل آویشن (۸ سر)، تمرین تناوبی و غسل آویشن (۱۰ سر) تقسیم شدند. رت‌ها پس از ۲۰ هفته رژیم غذایی با تزریق درون صفاقی 25 ml/kg STZ (Streptozotocin) مبتلا به دیابت نوع دو شدند. در طی دوره‌ی آزمایش به رت‌های گروه غسل آویشن و گروه غسل آویشن / تمرین، غسل آویشن با دوز 3 g/kg رقیق شده در آب مقطر، به روش گاواژ خوراندند (۱۵).

پروتکل تمرین تناوبی: برنامه‌ی ۸ هفته تمرین تناوبی، پنج جلسه در هفته با افزایش تدریجی تناوب شدید از سرعت ۳۰ الی ۳۶ متر بر دقیقه (۸۰ تا ۹۵ درصد $Vo2max$) و تناوب استراحت با سرعت ۱۶ تا ۲۲ متر در دقیقه (۵۰ تا ۵۶ درصد $Vo2max$) به صورت دویدن روی تردمیل انجام شد، به طوری که زمان دویدن از ۱۶ دقیقه در هفته‌ی اول، به ۳۴ دقیقه در هفته‌ی هشتم افزایش یافت. برای تعیین سرعت حداکثر از پروتکل Rodrigues و همکاران استفاده شد (۱۶). با خاتمه‌ی دوره‌ی تمرینی و ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه‌ی تمرینی و پس از ۱۲ ساعت ناشتایی، رت‌ها توسط ترکیب داروی زایلازین (10 mg/kg) و کتامین (70 mg/kg) (محصول شرکت آلفاسان هلند) به صورت تزریق درون صفاقی بی‌هوش و قربانی شدند.

تنظیم‌کننده‌های تمایز کاردیومیوسیت‌ها در قلب بالغ نیز شناخته شده‌اند (۶). مطالعات بیشتر اهمیت فاکتور رونویسی *Gata4* را در قلب بزرگسال برای توانایی عملکرد مناسب قلب تحت استرس نیز نشان دادند. در حقیقت وقتی ژن *Gata4* در موش‌های بالغ حذف شد، مشاهده گردید، موش‌هایی که فاقد پروتئین رونویسی هستند از وخیم شدن میوکارد و بزرگی آسیب آن به ویژه در مورد استرس ناشی از تمرین و تلاش رنج می‌برند (۷).

در افراد مبتلا به دیابت، مشخص شده است که *Gata4* بافت قلب، نقش محافظتی در بسیاری از بیماری‌های قلبی-عروقی دارد. به عنوان مثال، بیان بیش از حد *Gata4* برای حمایت از پاسخ‌های انطباقی قلبی و بقا گزارش شده است، در حالی که کاهش *Gata4* باعث آپوپتوز کاردیومیوسیت و اختلال عملکرد قلب می‌شود (۳).

فعالیت ورزشی از راه تشکیل کاردیومیوسیت‌های جدید به رشد قلبی منجر می‌شود (۸). تمرین تناوبی شدید در مقایسه با شدت متوسط با افزایش بیان ژن‌های ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی و هایپرتروفی فیزیولوژیک قلبی همراه است و نیز در کاهش عوارض ناشی از دیابت، استراتژی مؤثرتری است (۹). به دلیل این‌که ۸۰ درصد قلب را میوسیت‌ها تشکیل می‌دهند، فشار مکانیکی ناشی از ورزش به دیواره‌های قلب منجر به پاسخ اندوکرائینی و پاراکرائینی همچون ترشح عوامل رشدی (*IGF-1*) می‌شود؛ این پاسخ با وجود اثر محافظتی از میوسیت‌ها در برابر آپوپتوز و تحریک هایپرتروفی آن‌ها، سبب فعال شدن سلول‌های بنیادی قلبی می‌شود (۱۰). فعالیت ورزشی هورازی از راه فعال‌سازی مسیر پیام‌رسانی *IGF-1-PI3K-AKT/PKB* به افزایش بیان مجموعه‌ی ژنی با نقش‌های شناخته شده در فعال‌سازی، تکثیر و تمایز *CSCs* (Cardiac stem cells) به کاردیومیوسیت‌ها منجر می‌شود (۱۱).

استرس اکسیداتیو، التهاب و آپوپتوز، سه واکنش فیزیولوژیکی ضروری در ایجاد و پیشرفت بیماری قلب دیابتی هستند. فلاونوئیدها و پلی فنول‌ها، دو عنصر اصلی ایجادکننده‌ی فعالیت آنتی‌اکسیدانی غسل می‌باشند که از واکنش اتواکسیداسیون جلوگیری کرده و اثر مهارکنندگی روی رادیکال‌های آزاد دارند (۱۲). در موش‌های ایسکمی شده که با تزریق سلول‌های بنیادی تحت درمان بودند، مصرف آنتی‌اکسیدان طبیعی رزوراترول مکانیسم دفاع آنتی‌اکسیدانی را از مسیرهای آنتی‌اکسیدانی *Nrf2* (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) / *Keap* (Kelch-like ECH-associated protein 1) و *ARE* (Antioxidant response elements) فعال‌سازی هسته‌ای *Nrf2* و افزایش بیان *Nrf2* و *Ref-1*، به میزان قابل توجهی افزایش می‌دهد. محیط ردوکس داخل سلولی ایجاد شده، باعث افزایش زنده ماندن سلول‌های بنیادی، تکثیر و نوزایی سلول قلبی و افزایش

جدول ۱. توالی پرایمرهای ژن‌های هدف و مرجع

نام ژن	توالی پرایمر مستقیم 5'-3'	توالی پرایمر معکوس 3'-5'	اندازه‌ی ژن bp
Nkx2.5	CTCGGATTTACACCCACAC	CGAGGCATCAGGTTAGGTCA	۸۲
Tbx5	AGCAAGTCTCCATCCTCACC	GGCCAGTCACCTTCACTTTG	۱۷۵
GATA4	AGACTACCACCACCACACTG	TCAGATTCTTGGGCTTCCGT	۱۵۳
GAPDH	ATCACTGCCACTCAGAAGAC	ACATTGGGGGTAGGAACAC	۱۲۵

تحلیل واریانس یک‌راهه و آزمون تعقیبی LSD جهت مقایسه‌ی تفاوت بین گروه‌ها استفاده گردید. سطح معنی‌داری در آزمون‌ها $\alpha \leq 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

جهت بررسی اثر برنامه‌ی تمرینی و مصرف غسل بر بافت قلب رت‌های مبتلا به دیابت در بین گروه‌های شاهد، تمرین، غسل و گروه تمرین/عسل از آزمون تحلیل واریانس یک‌راهه استفاده شد که نتایج آن به شرح ذیل است (جدول ۳).

نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌راهه نشان داد که در شاخص بیان ژن Nkx2.5، Tbx5 و Gata4 تفاوت معنی‌دار وجود دارد. با توجه به معنی‌دار بودن اثر گروه جهت بررسی بیشتر تفاوت‌ها در ادامه از آزمون تعقیبی LSD استفاده شد که نتایج آن در جدول ۴ درج شده است.

نتایج آزمون تعقیبی نشان داد که در شاخص بیان ژن Nkx2.5 بین گروه تمرین با گروه شاهد ($P = 0/03$) و بین گروه تمرین با گروه عسل ($P = 0/03$) همچنین گروه تمرین با گروه تمرین/عسل ($P = 0/02$) تفاوت معنی‌دار است با توجه به میانگین‌ها و یافته‌های توصیفی، عملکرد گروه تمرین از سه گروه ذکر شده بهتر بود. اما بین سایر گروه‌ها در شاخص بیان ژن Nkx2.5 تفاوت معنی‌دار نبود و نیز نتایج آزمون تعقیبی LSD در شاخص بیان ژن Tbx5 نشان داد، بین گروه تمرین با گروه شاهد ($P = 0/02$) و بین گروه تمرین با گروه عسل ($P = 0/02$) همچنین گروه تمرین/عسل با گروه شاهد ($P = 0/01$) و گروه تمرین/عسل با گروه عسل ($P = 0/01$) تفاوت معنی‌دار وجود دارد. با توجه به میانگین‌ها و یافته‌های توصیفی در بیان ژن Tbx5 عملکرد گروه تمرین و گروه تمرین/عسل از دو گروه ذکر شده بهتر بود.

نمونه‌های خون از قلب، جمع‌آوری و در دمای 20°C - درجه نگهداری شد. مقادیر گلوکز خون با استفاده از کیت ویژه‌ی گلوکز (ساخت شرکت پارس آزمون ایران) با حساسیت ۵ میلی‌گرم در دسی‌لیتر، با استفاده از دستگاه اتو آنالیزور سنجیده شد (۱۷).

بافت قلب به منظور اندازه‌گیری بیان ژن جدا شد و همراه یخ به فریزر منفی 80°C درجه منتقل گردید. در مرحله‌ی بعد، RNA با استفاده از محلول RiboEX Total RNA isolation solution (GeneAll) استخراج شد و در نهایت بررسی کمی و کیفی RNA با استفاده از دستگاه نانودارپ سنجیده شد. پس از اطمینان از خلوص و کیفیت RNA استخراج شده، cDNA با استفاده از کیت TAKARA ساخته و به فریزر منفی 20°C انتقال داده شد. برای انجام Realtime PCR از مستر میکس سایبرگرین AMPLIQON استفاده گردید. در پژوهش حاضر از ژن مرجع GAPDH به عنوان ژن خانه‌دار استفاده شد و همچنین برای آنالیز کمی داده‌های Real Time PCR، از روش دلتا دلتا سی‌تی استفاده گردید. سپس برای بررسی بیان ژن Nkx2.5، Gata4 و Tbx5 بافت قلب، پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش توسط نرم‌افزار Allel ID6 طراحی و توسط شرکت بیوتکنولوژی سیناکلون، سنتز گردید. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است. گردایان دمای گذاشته شد، همه‌ی نمونه‌ها به صورت ۲ مرتبه تکرار در دستگاه ریل تایم پی‌سی‌آر قرار گرفت. همچنین برنامه‌ی دمایی و زمانی واکنش Real Time PCR در پژوهش حاضر مطابق جدول ۲ است.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۲ (version 22, IBM Corporation, Armonk, NY) تجزیه و تحلیل شدند. آزمون Shapiro-Wilk جهت تعیین طبیعی بودن توزیع داده‌ها و آزمون Levene برای تجانس واریانس‌ها و از آمار استنباطی

جدول ۲. برنامه‌ی دمایی و زمانی R-T PCR

مرحله	دما	مدت چرخه	تعداد تکرار
Hold	95°C	۱۰ دقیقه	۱
Denaturation	95°C	۳۰ ثانیه	۴۰
Annealing, and extension	60°C	۳۰ ثانیه	
Melting curve	72°C	۳۰ ثانیه	

جدول ۳. نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌راهه بین گروه‌ها

متغیر	مجموع مجذورات	درجه‌ی آزادی	میانگین مجذورات	F	سطح معنی‌داری
Nkx2.5	۱/۵۹۹	۳	۰/۵۳۳	۴/۱۲۸	۰/۰۱۷
Tbx5	۱۴/۹	۳	۴/۹۶	۴/۳۶	۰/۰۱۴
Gata4	۵/۵۶	۳	۱/۸۵	۳/۰۹	۰/۰۱۶

مبتلا به دیابت شد. در همین راستا Bo و همکاران نشان دادند، نوزایی میوسیت‌های قلبی در گروه‌های تمرینی افزایش معنی‌داری داشت (۱۱). همچنین Xiao و همکاران نشان دادند که مقادیر Nkx2.5، C-Kit و Scal-1 با انجام شنا، افزایش معنی‌دار یافت و منجر به هایپر تروفی فیزیولوژیایی موش‌ها و فعال‌سازی سلول‌های بنیادی و پیش‌ساز قلبی می‌شود (۱۸). اثبات شده است (CCAAT enhancer binding protein beta) *C/EBP* عامل بالا دستی تنظیم شبکه‌ی ژنی ورزشی است. مهار ژنتیکی *C/EBPβ* و همچنین کاهش بیان *C/EBPβ* از طریق فعالیت ورزشی، منجر به رشد قلبی و افزایش بیان شبکه‌ی ژن‌های مرتبط به نوزایی قلبی می‌شود (Gata4, Nkx2.5, Tbx5) (۳).

هم‌راستا با نتایج مطالعه‌ی حاضر، Tao و همکاران نشان داده‌اند، تزریق *NRG1* به موش‌های مبتلا به انفراکتوس، تکثیر میوسیت‌ها و نوزایی قلبی و همچنین عملکرد قلبی را افزایش می‌دهد (۱۹). در راستای افزایش بیان ژن *Nkx2.5* متعاقب تمرین ورزشی، Zhou و همکاران نشان دادند، ورزش، باعث افزایش میوکین ایریزین می‌شود و با آنژیوژنز، کاهش فیبروز قلب، افزایش *Nkx2.5* سلول بنیادی قلبی وابسته به نوسازی کاردیومیوسیت‌ها از آسیب‌های قلبی-عروقی پس از ایسکمی محافظت می‌کند (۲۰).

نشان داده شد که تمرین ورزشی در شدت‌های مختلف، باعث بهبود عملکرد قلب و سطح نشانگرهای سلول‌های بنیادی و کاردیومیوسیت و کاهش اندازه‌ی انفراکتوس می‌شود. همچنین مشخص گردید که سطوح *Gata4*، در تمام گروه‌های تمرینی مبتلا به انفراکتوس میوکارد افزایش معنی‌داری داشت و گروه تمرین با شدت بالا (HIIT) نسبت به گروه تمرین با شدت کم و متوسط، افزایش بیشتری در بیان ژن *GATA4* داشتند (۸) که این نتایج با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر همخوان می‌باشد.

با توجه به افزایش بیان ژن *Tbx5* بر اثر HIIT در مطالعه‌ی حاضر، Vosadi و همکاران نشان دادند، مداخله‌ی تمرین ورزشی باعث بهبود عملکرد ورزشی رت‌های مبتلا به MI (Myocardial infarction) در گروه‌های تمرین یا شدت زیاد، متوسط، کم و گروه شم و گروه شاهد سالم می‌شود اما در گروه شاهد سالم، این افزایش عملکرد معنی‌دارتر بود. همچنین مقادیر

جدول ۴. نتایج آزمون تعقیبی LSD بین گروه‌ها

متغیر/شاخص آماری	گروه	سطح معنی‌داری	تفاوت میانگین‌ها
بیان ژن Nkx2.5	شاهد	تمرین	۰/۰۳*
	عسل	عسل	۰/۳۶۵
	تمرین/عسل	تمرین/عسل	۰/۹۹۸
بیان ژن Tbx5	شاهد	تمرین	۰/۰۳*
	عسل	تمرین/عسل	۰/۲۰*
	تمرین/عسل	تمرین/عسل	۰/۳۳*
بیان ژن Gata4	شاهد	تمرین	۰/۰۲*
	عسل	تمرین	۰/۸۹
	تمرین/عسل	تمرین/عسل	۰/۰۱
تفاوت میانگین‌ها	تمرین	عسل	۰/۰۲*
	تمرین/عسل	تمرین/عسل	۰/۷۴*
	عسل	تمرین/عسل	۰/۱۶*
تفاوت میانگین‌ها	تمرین	عسل	۰/۸۸
	تمرین/عسل	تمرین/عسل	۰/۸۹
	عسل	تمرین/عسل	۰/۸۹
تفاوت میانگین‌ها	تمرین	عسل	۰/۰۱
	تمرین/عسل	تمرین/عسل	۰/۰۱
	عسل	تمرین/عسل	۰/۰۱

* $P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$

در ارتباط با شاخص بیان ژن *Gata4*، آزمون تعقیبی نشان داد بین گروه شاهد با تمرین تناوبی ($P = 0.015$)، بین گروه شاهد با غسل ($P = 0.016$)، بین گروه تمرین با تمرین/عسل ($P = 0.013$) و همچنین بین گروه غسل با تمرین/عسل ($P = 0.011$)، تفاوت معنی‌دار وجود دارد ($P < 0.05$). ولی بین گروه شاهد با تمرین/عسل ($P = 0.990$)، و همچنین بین گروه تمرین با غسل ($P = 0.997$)، تفاوت معنی‌دار وجود ندارد ($P > 0.05$). با توجه به میانگین‌ها و یافته‌های توصیفی در بیان ژن *Gata4* عملکرد گروه تمرین و گروه غسل از دو گروه ذکر شده بهتر بود.

بحث

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که ۸ هفته تمرین تناوبی شدید، باعث افزایش بیان ژن *Gata4*، *Tbx5* و *Nkx2.5* در بافت قلب رت‌های

مطالعه‌ی حاضر مبتلا به دیابت بودند و تمرین تناوبی با شدت بالا احتمالاً در افزایش شاخص‌های نوزایی قلبی بیماران مبتلا به دیابت مؤثر بود.

مطالعات جدید نشان داده‌اند عوامل مؤثر در متابولیسم قلبی می‌توانند نقش مهمی را در فرایند تولید میوسیت‌ها ایفا کنند، *AMPK* و *PGC-1 α* تغییر شکل قلبی ناهنجار را مهار می‌کنند (۲۵). از آنجایی که *AMPK* و *PGC-1 α* به دنبال فعالیت ورزشی، تنظیم افزایش می‌یابند به نظر می‌رسد یکی از سازوکارهای احتمالی افزایش شاخص‌های نوزایی در مطالعه‌ی حاضر، فعال‌سازی مسیر پیام‌رسانی وابسته به *PGC-1 α* می‌باشد که مانع از پیشرفت کاردیومیوپاتی در رت‌های تمرین کرده شده است و سپس با تحریک مسیر وابسته به فرایند نوزایی قلبی به هایپرتروفی فیزیولوژیایی منجر شده است. احتمالاً دلیل تأثیر منفی مصرف غسل آویشن به عنوان آنتی‌اکسیدان قوی، مهار مسیر *AMPK-PGC-1 α* و اختلال در متابولیسم قلبی باشد. از زمان‌های قدیم غسل به دلیل وجود آنتی‌اکسیدان‌های قوی در کاهش آثار رادیکال‌های آزاد رواج یافته است. با این حال مصرف آن به عنوان دارو، به خصوص در بیماران مبتلا به دیابت بحث برانگیز شده است. همان‌طور که نتایج نشان داد، ۸ هفته مصرف غسل باعث افزایش سطوح ژن *Gata4* شد. همچنین مصرف غسل به همراه تمرین تناوبی، باعث افزایش معنی‌دار شاخص بیان ژن *Tbx5* در بافت قلب رت‌های مبتلا به دیابت نوع دو شد. ولی در مورد ژن *Nkx2.5* افزایش بیان آن معنی‌دار نبود.

در مطالعه‌ی ما، مصرف غسل آویشن به تنهایی نتوانست عامل مؤثری در پیشگیری از عوارض قلب دیابتی باشد. در راستای این نتایج Merry و Ristow نشان دادند مکمل آنتی‌اکسیدانی احتمالاً تأثیرات منفی بر آنژیوتنژن، حساسیت انسولین، دفاع سلولی، هایپرتروفی، بایوژنز میتوکندری و ریکاوری دارند (۲۶).

Najafi و همکاران نشان دادند که مصرف غسل به مدت ۴۵ روز به میزان ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴ به صورت محلول ۴۰ موش صحرایی نر و بیستار، باعث اثرات محافظتی بر آریتمی‌های ناشی از ایسکمی در قلب موش‌ها شد (۲۷). احتمالاً این ناهم‌سویی به علت تفاوت در مقدار، نوع غسل مصرف شده و نیز نوع بیماری رت‌ها بود. اگرچه مطالعات بالینی، اثرات مفید غسل را بر پروفایل‌های متابولیکی نشان داده است، اما نتایج به دست آمده متناقض هستند که شاید به دلیل تفاوت در دوز مصرفی غسل و نوع آزمودنی‌ها در مطالعه باشد.

هم راستا با افزایش *Gata4* با مصرف غسل به عنوان ماده‌ی غذایی دارای آنتی‌اکسیدان، Huan و همکاران نشان دادند، ۱۶ هفته گاوژ جوشانده *YQWY* دارای آنتی‌اکسیدان به رت‌های با بیماری قلبی با کاهش فسفوریلاسیون *GATA4* و پروتئین کینازهای فعال

mRNA Tbx5 در هیچ گروه تمرینی افزایش نیافت فقط در گروه شاهد سالم نسبت به گروه‌های مبتلا به MI افزایش معنی‌داری یافت که این نتایج با مطالعه‌ی ما ناهم‌سوی بود (۲۱). به نظر می‌رسد، تفاوت در نتایج مطالعات به دلیل تفاوت در نمونه‌های تحقیق (رت‌های مبتلا به دیابت یا مبتلا به آنفاریکتوس میوکاردی) باشد.

در تأیید مطالعه‌ی حاضر، *Eskandari* و همکاران نشان دادند که ۶ هفته فعالیت ورزشی با دو پرتکل HIIT و هوازی تداومی در رت‌های مسن، سطح *mRNA Nkx2.5* و نیز سلول‌های پیش‌ساز قلبی برای *C-kit* مثبت را به طور قابل توجهی در هر دو گروه افزایش داد. به نظر می‌رسد سلول‌های *C-kit* مثبت در گروه‌های تمرینی افزایش بیان برخی از فاکتورهای رونویسی همچون ژن *Nkx2.5* را نشان دادند که نشان‌دهنده‌ی افزایش ظرفیت بازسازی کاردیومیوسیت‌ها در طول دوره‌ی تمرین است (۲۲).

در مطالعه‌ی *Chen* و همکاران نشان داده شد، استفاده از ماتریکس خارج سلولی گورخرماهی باعث تکثیر کاردیومیوسیت‌های موش بالغ ۳ روز پس از درمان در نواحی انفارکته و اطراف آن، نسبت به گروه شاهد گردید که نشان داد، *zECM* بیان *ErbB2* را در پستانداران بالغ پس از MI دوباره فعال می‌کند (۲۳).

با توجه به نتایج پژوهش حاضر به نظر می‌رسد فعال‌شدن مسیر پیام‌رسانی *C/EBP β -NRG1-ErbB4* متعاقب تمرین ورزشی، یکی از سازوکارهای سلولی - مولکولی احتمالی درگیر در افزایش شاخص‌های نوزایی و تکثیر و تمایز قلبی می‌باشد (۱۹).

اثر تمرین منظم بر میزان سلول‌های بنیادی قلبی، وابسته به شدت تمرین است (۲۴). در این راستا رضائی و همکاران نشان دادند که ۸ هفته تمرین هوازی ایتروال شدید و متوسط و مصرف کورکومین، بیان ژن *c-Kit* را در سلول‌های بنیادی قلب موش‌های پیر در گروه تمرین شدید/ کورکومین افزایش داد و همچنین نشان دادند، مصرف منظم کورکومین به تنهایی و همراه با انجام تمرین منظم هوازی ایتروال به طور معنی‌داری میزان سلول‌های بنیادی قلبی را افزایش می‌دهد و می‌تواند در ترمیم و بازسازی قلب مؤثر باشد (۲۴).

اما *Vosadi* و *Borjjanfard* (۲۱) و همتی نفر و همکاران (۳) نشان دادند، تمرین ورزشی، باعث بهبود عملکرد در رت‌های مبتلا به MI در گروه‌های تمرین یا شدت زیاد، متوسط، کم و گروه M و گروه شاهد سالم شد اما در گروه شاهد سالم، این افزایش عملکرد معنی‌دارتر بود و نیز مقادیر *mRNA Tbx5* در هیچ گروه تمرینی افزایش نیافت. فقط در گروه شاهد سالم نسبت به گروه‌های مبتلا به M افزایش معنی‌داری یافت که احتمالاً نوع بیماری رت‌ها که در مطالعه‌ی *Vosadi* و *Borjjanfard* (۲۱) و همتی نفر و همکاران (۳) مبتلا به MI بودند، دلیل این ناهم‌سویی می‌باشد؛ اما رت‌ها در

نتیجه گیری

با توجه به نتایج حاضر می توان گفت که تمرین تناوبی، عامل مهمی در تحریک سلول های بنیادی و تکثیر و تمایز آن ها به میوسیت های قلبی است و انجام تمرین، باعث تکثیر کاردیومیوسیت ها می شود. اما در این مطالعه، مصرف عسل در افزایش بیان برخی از فاکتورهای رونویسی قلبی تأثیر مثبتی نداشت. لذا با توجه به این که اکثر مطالعات در زمینه سلول های بنیادی و تکثیر و تمایز آن ها بر بیماران مبتلا به MI صورت گرفته است، پیشنهاد می شود، در تحقیقات آینده، تأثیر نوع و شدت های مختلف تمرین ایستروال و نیز مقادیر و انواع مختلف عسل بر بهبود عملکرد و درمان قلبی بیماران مبتلا به دیابت بررسی گردد. تشریح سازوکارهایی که به فعال سازی CSCs از طریق فعالیت ورزشی منجر می شوند، می تواند به عنوان ابزار درمانی مؤثر و جدید با تکیه بر بازسازی قلبی، جهت درمان طیف وسیعی از بیماری های قلبی - عروقی استفاده شود. همچنین مکانیسم های دقیق تر تأثیرات مکمل های مختلف آنتی اکسیدانی در پیشبرد اهداف درمان جدید غیردارویی در کاردیومیوپاتی دیابتی اجرا و بررسی گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از رساله ی دکتری خانم مهدیه کوشا با کد IR.SSRC.REC.1399.080 با کد اخلاق ۱۶۲۴۹۶۹۴۲ بود و با کد اخلاق IR.SSRC.REC.1399.080 در کمیته اخلاق پزشکی پژوهشگاه تربیت بدنی تأیید شد، لذا از تمام همکاران پژوهشی و پرسنل آزمایشگاهی تقدیر و تشکر می شود.

شده با میتوزن (MAPKs) و همچنین کاهش بیان عوامل پایین دست GATA4. از جمله ANP، BNP و MYH7 هیپرتروفی پاتالوژیک قلب را سرکوب کرده و اختلال در عملکرد قلب را معکوس می کند (۲۸).

هر چند که مکانیسم های محافظتی عسل ناشناخته مانده است بهتر است به عسل به عنوان منبع غنی از فلاونوئیدها و اسید فنولیک که فعالیت آنتی اکسیدانی و مهار رادیکالی بالایی دارند، توجه شود و نیز وجود منابعی از انرژی مثل گلوکز و فروکتوز، بسیاری ویتامین ها، مواد معدنی و آنزیم ها در تغذیه ی بیماران بیشتر مورد بررسی قرار گیرد.

گلیکوژنولیز و گلوکونوزن در اثر اختلال در جذب گلوکز توسط گیرنده ی انسولین در بافت های محیطی در دیابتی ها منجر به افزایش قندخون و افزایش تولید ROS در قلب می شود (۲۹). عموم معتقدند که ROS/RNS (Reactive Oxygen/Nitrogen Species) در حین فعالیت بدنی توسط میتوکندری و مجموعه ی زیرسلولی، تولید شده و باعث آسیب عضلات اسکلتی، خستگی و اختلال در ریکاوری می شود (۲۶). مکمل های آنتی اکسیدانی می توانند استقامت ناشی از تمرین و افزایش میانجی های ROS/ RNS را در ظرفیت آنتی اکسیدان، بیوزن میتوکندری، مکانیسم های دفاعی سلول و حساسیت به انسولین را کاهش دهد. هیچ شواهد قانع کننده ای برای اثبات این که مکمل آنتی اکسیدان، سازگاری های تمرینی ورزشی را افزایش می دهد، وجود ندارد (۲۶).

References

- Johansson I. Diabetes mellitus and heart failure: registry based studies on risk factors, prognosis and impact of treatment. [Online]. 2017; Available from: URL: https://openarchive.ki.se/xmlui/bitstream/handle/10616/45540/Spikblad_Isabelle_Johansson.pdf?sequence=2&isAllowed=y
- Jakubik D, Fitas A, Eyileten C, Jarosz-Popek J, Nowak A, Czajka P, et al. MicroRNAs and long non-coding RNAs in the pathophysiological processes of diabetic cardiomyopathy: emerging biomarkers and potential therapeutics. *Cardiovasc Diabetol* 2021; 20(1): 55.
- Hemati Nafar M, Gaeini A, Gaeini AA, Choobineh S, Karimzade F. The effect of exercise training intensity on cardiac regeneration capacity in rats with myocardial infarction. *J Sport Biosciences* 2019; 11(1): 17-34. [In Persian].
- Meyfour A, Pahlavan S, Mirzaei M, Krijgsveld J, Baharvand H, Hosseini Salekdeh G. The quest of cell surface markers for stem cell therapy. *Cell Mol Life Sci* 2020; 78(2): 469-95.
- Ma J, Huang Y, Jiang P, Liu Z, Luo Q, Zhong K, et al. Pyridaben induced cardiotoxicity during the looping stages of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquat Toxicol* 2021; 237: 105870.
- Nomura S, Satoh M, Fujita T, Higo T, Sumida T, Ko T, et al. Cardiomyocyte gene programs encoding morphological and functional signatures in cardiac hypertrophy and failure. *Nat Commun* 2018; 9(1): 4435.
- Forough R, Scarcello C, Perkins M. Cardiac biomarkers: a focus on cardiac regeneration. *J Tehran Heart Cent* 2011; 6(4): 179-86.
- Marino F, Scalise M, Cianflone E, Salerno L, Cappetta D, Salerno N, et al. Physical exercise and cardiac repair: The potential role of nitric oxide in boosting stem cell regenerative biology. *Antioxidants (Basel)* 2021; 10(7): 1002.
- Khakdan S, Delfan M, Heydarpour Meymeh M, Kazerouni F, Ghaedi H, Shanaki M, et al. High-intensity interval training (HIIT) effectively enhances heart function via miR-195 dependent cardiomyopathy reduction in high-fat high-fructose diet-induced diabetic rats *Arch Physiol Biochem* 2020; 126(3): 250-7.
- Ellison GM, Torella D, DelleGrottaglie S, Perez-Martinez C, de Prado AP, Vicinanza C, et al. Endogenous cardiac stem cell activation by insulin-like growth factor-1/hepatocyte growth factor

- intracoronary injection fosters survival and regeneration of the infarcted pig heart. *J Am Coll Cardiol* 2011; 58(9): 977-86.
11. Bo B, Zhou Y, Zheng Q, Wang G, Zhou K, Wei J. The molecular mechanisms associated with aerobic exercise-induced cardiac regeneration. *Biomolecules* 2021; 11(1): 19.
 12. Kamkar A, Khodabakhshian S. Determination of the total phenolic, flavonoid and antioxidant activity of Sabalan Honey. *J Vet Res* 2017; 72(1): 53-61.
 13. Farkhondeh T, Folgado SL, Pourbagher-Shahri AM, Ashrafizadeh M, Samarghandian S. The therapeutic effect of resveratrol: Focusing on the Nrf2 signaling pathway. *Biomed Pharmacother* 2020; 127: 110234.
 14. Zhu H, Zhang W, Zhao Y, Shu X, Wang W, Wang D, et al. GSK3 β -mediated tau hyperphosphorylation triggers diabetic retinal neurodegeneration by disrupting synaptic and mitochondrial functions. *Mol Neurodegener* 2018; 13(1): 1-7.
 15. Ramli NZ, Chin KY, Zarkasi KA, Ahmad F. A review on the protective effects of honey against metabolic syndrome. *Nutrients* 2018; 10(8): 1009.
 16. Rodrigues B, Figueroa DM, Mostarda CT, Heeren MV, Irigoyen MC, de Angelis K. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovascular Diabetology* 2007; 6: 38.
 17. Yeylaghi Ashrafi MR, Abednatanzi H, Ghazalian F. The effect of eight weeks of high intensity interval training and n-chromosomal royal jelly on G6Pase gene expression in hepatocytes, glucose levels and insulin resistance in type 2 diabetic rats. *Razi J Med Sci* 2020; 27(10): 135-50. [In Persian].
 18. Xiao J, Xu T, Li J, Lv D, Chen P, Zhou Q, et al. Exercise-induced physiological hypertrophy initiates activation of cardiac progenitor cells. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7(2): 663-9.
 19. Tao L, Bei Y, Zhang H, Xiao J, Li X. Exercise for the heart: signaling pathways. *Oncotarget* 2015; 6(25): 20773-84.
 20. Zhou X, Xu MM, Bryant JL, Ma J, Xu X. Exercise-induced myokine FNDC5/irisin functions in cardiovascular protection and intracerebral retrieval of synaptic plasticity. *Cell Biosci* 2019; 9(1): 32.
 21. Vosadi E, Borjianfard M. The effect of different exercise intensities on T-Box transcription factor 5 gene expression and hypertrophy in the heart muscle of male rats. *J Inflamm Dis* 2020; 24(3): 202-11.
 22. Eskandari A, Soori R, Choobineh S, Mazaheri Tirani Z. Exercise promotes heart regeneration in aged rats by increasing regenerative factors in myocardial tissue. *Physiol Int* 2020; 107(1): 166-76.
 23. Chen WC, Wang Z, Missinato MA, Park DW, Long DW, Liu HJ, et al. Decellularized zebrafish cardiac extracellular matrix induces mammalian heart regeneration. *Sci Adv* 2016; 2(11): e1600844.
 24. Rezaei S, Matinhomae H, Azarbayjani MA, Farzanegi P. The effect of intense and moderate interval aerobic exercise and curcumin consumption on the gene expression of c-Kit in stem cells of old rats heart. *J Fasa Univ Med Sci* 2017; 7(1): 68-76. [In Persian].
 25. Kulikova TG, Stepanova OV, Voronova AD, Valikhov MP, Sirotkin VN, Zhironov IV, et al. Pathological remodeling of the myocardium in chronic heart failure: role of PGC-1 α . *Bull Exp Biol Med* 2018 164(6): 794-7.
 26. Merry TL, Ristow M. Do antioxidant supplements interfere with skeletal muscle adaptation to exercise training? *J Physiol* 2016; 594(18): 5135-47.
 27. Najafi M, Shaseb E, Ghaffary S, Fakhru A, Eteraf Oskouei T. Effects of chronic oral administration of natural honey on ischemia/reperfusion-induced arrhythmias in isolated rat heart. *Iran J Basic Med Sci* 2011; 14(1): 75-81.
 28. Huang JJ, Xie Y, Li H, Zhang XX, Huang Q, Zhu Y, et al. YQWY decoction reverses cardiac hypertrophy induced by TAC through inhibiting GATA4 phosphorylation and MAPKs. *Chin J Nat Med* 2019; 17(10): 746-55.
 29. Bheeredy P, Yerra VG, Kalvala AK, Sherkhane B, Kumar A. SIRT1 activation by polydatin alleviates oxidative damage and elevates mitochondrial biogenesis in experimental diabetic neuropathy. *Cell Mol Neurobiol* 2021; 41(7): 1563-77.

The Effects of Interval Exercise and Thyme Honey on Cardiac Cells Proliferation and Differentiation of Type 2 Diabetic Male Rats

Mahdieh Kousha¹, Hossein Abednatanzi², Mandana Gholami², Farshad Ghazalian²

Original Article

Abstract

Background: Exercise and antioxidants are well known for the protection against the risk of diabetes. Therefore, the purpose of the current study was to investigate the effects of intermittent exercise and thyme honey on the proliferation and differentiation of cardiac cells in male rats with type 2 diabetes.

Methods: This experimental study was performed on 36 male diabetic rats which were randomly divided into four groups: control (n = 8), HIIT (n = 10), thyme honey (n = 8) and HIIT*thyme honey (n = 10) groups. The HIIT intervention of 8 weeks, including 2 to 8 of intermittent running for 2 mins at 80-90% VO₂max and 1 min at 50-56% VO₂max, was performed for 5 sessions per week. Additionally, 3 g/kg thyme honey was fed, 5 days/week, in supplement groups. Both Nkx2.5 and Tbx5 genes expression in heart tissue was measured by real-time RT-PCR. To evaluate the differences between the groups, ANOVA and LSD post hoc test were used with the significance level of P ≤ 0.05.

Findings: Analysis revealed that expression of Nkx2.5, Gata4 and Tbx5 gene were significantly higher in HIIT compared with the control group whereas these findings were not repeated in Tbx5 and Nkx2.5 indices of the honey group (P > 0.05).

Conclusion: The HIIT is associated with increased expression of Nkx2.5, Tbx5 and Gata4 (1) genes in heart tissue of diabetic rats, while thyme honey did not have similar benefits in diabetic rats.

Keywords: High-Intensity Intermittent Training; Diabetes Mellitus; Honey; Antioxidants; Nkx2.5; Tbx5; Gata4

Citation: Kousha M, Abednatanzi H, Gholami M, Ghazalian F. **The Effects of Interval Exercise and Thyme Honey on Cardiac Cells Proliferation and Differentiation of Type 2 Diabetic Male Rats.** J Isfahan Med Sch 2022; 40(660): 76-83.

1- PhD Student, Department of Physical Education and Sport Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Department of Physical Education and Sport Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3- Associate Professor, Department of Physical Education and Sport Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Corresponding Author: Hossein Abednatanzi, Assistant Professor, Department of Physical Education and Sport Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran; Email: abednazar@gmail.com