DOI: 10.48305/jims.v40.i685.0659

مجله دانشکده پزشکی اصفهان | سال چهلم/شماره‌ی ۶۸۵/هفته‌ی اول آبان ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۵/۱۷ | تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۷/۱۰ | تاریخ چاپ: ۱۴۰۱/۸/۷

تأثیر یک دوره تمرین اینتروال شدید بر بیان ژن‌های درگیر جریان کلسیم در عضله EDL موش‌های مبتلا به دیابت

عبدالرضا کاظمی[۱]، ضیاء نویدی[۲]، مختار قنبرزاده[۳]، نرگس زند ذوالقلم[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: نوروپاتی دیابت (Diabetic neuropathy) DN منجر به راه‌اندازی مسیرهای متعددی از جمله فشار اکسایشی و تخریب عروق ریز و همچنین تخریب عوامل درگیر در شبکه‌ی (Sarcoplasmic reticulum) SR عضلات می‌گردد. هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی اثر یک دوره‌ی تمرین اینتروال شدید بر بیان ژن‌های درگیر در جریان کلسیم در عضله EDL رت‌های مبتلا به دیابت بود.

روش‌ها: پژوهش حاضر از نوع تجربی و بنیادی- توسعه‌ای است. ۴۸ سر رت صحرایی نر به چهار گروه دیابت تمرین، دیابت، تمرین و گروه شاهد تقسیم شدند. برنامه‌ی گروه تمرینی به مدت ۴ هفته و هر هفته ۵ جلسه بود. کل هر جلسه تمرین روی نوارگردان ۴۴ دقیقه بود. از آزمون آماری واریانس دو سویه (two way ANOVA) برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد.

یافته‌ها: تمرین تناوبی شدید منجر به کاهش معنی‌دار در بیان ژن‌های Orai و MG29 و کاهش غیر معنی‌دار در بیان ژن Stim1 عضله‌ی بازکننده‌ی طویل انگشتان رت‌های صحرایی نر مبتلا به دیابت نسبت به سایر گروه‌ها شد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد تمرینات ورزشی به صورت تمرین تناوبی شدید، قادر به تعدیل اختلال بیان Orai، MG29، Stim1 در حالت دیابت بود که ممکن است به واسطه‌ی سازوکارهای گوناگونی نظیر کنترل عوامل استرس اکسایشی و عوامل رشدی باشد و از این طریق اثرات سودمند خود را بر عوارض بیماری دیابت اعمال کند.

واژگان کلیدی: نروپاتی دیابتی؛ تمرین اینتروال، ژن‌ها؛ EDL؛ رت‌های صحرایی

ارجاع: کاظمی عبدالرضا، نویدی ضیاء، قنبرزاده مختار، زند ذوالقلم نرگس. **تأثیر یک دوره تمرین اینتروال شدید بر بیان ژن‌های درگیر جریان کلسیم در عضله EDL موش‌های مبتلا به دیابت.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۱؛ ۴۰ (۶۸۵): ۶۶۶-۶۵۹

مقدمه

بیماری دیابت (Diabetes mellitus) DM ششمین علت مرگ و میر در دنیا است که با اختلالات و عوارض متعددی بر بافت‌های مختلف همراه است. از جمله این اختلالات و عوارض می‌توان از نوروپاتی یاد کرد که تخریب اعصاب محیطی تعریف می‌گردد و اغلب در نیمی از افراد مبتلا به دیابت مشاهده می‌گردد (۱). سازوکار پیچیده‌ی بیماری‌زایی نوروپاتی دیابت (Diabetic neuropathy) DN از هایپرگلایسمی یا قند خون بالا ناشی می‌گردد که منجر به راه‌اندازی مسیرهای متعددی از جمله فشار اکسایشی و تخریب عروق ریز و همچنین تخریب عوامل درگیر در شبکه‌ی (Sarcoplasmic reticulum) SR عضلات می‌گردد (۲).

در شروع فرایند انقباض در عضلات اسکلتی، کلسیم از شبکه‌ی سارکوپلاسمی به درون سیتوزول از طریق گیرنده‌های رایانودین و دی هیدروپیریدین رها می‌شود و در پایان، انقباض کلسیم به داخل شبکه‌ی سارکوپلاسمی برگشت داده می‌شود. در طول هر مرحله از انقباض، کسری از کلسیم از طریق پمپ کلسیم غشایی خارج می‌شود (۳). SOCE(Store-operated Ca2+entry) نقش مهمی در کنترل ارتباطات بین ذخایر کلسیم خارج سلولی و کلسیم داخل سلولی ایفا می‌کند تا هموستاز کلسیم را حفظ کند (٤).

در عضلات اسکلتی SOCE در جابجایی کلسیم در طول

۱- دانشیار، گروه علوم ورزشی، دانشکده‌ی ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران

۲- استادیار، گروه بیهوشی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان ، ایران

۳- کارشناسی ارشد، دانشکده‌ی ادبیات و علوم انسانی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی کرمان، کرمان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: عبدالرضا کاظمی: دانشیار، گروه علوم ورزشی، دانشکده‌ی ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران

Email: rkazemi22@yahoo.com

وضعیت‌های فیزیولوژیکی از قبیل فعالیت ورزشی و خستگی شرکت می‌کند (۵). در حالی که نشان داده شده است که SOCE با پیشرفت بیماری دیستروفی عضلانی ارتباط دارد، در وضعیت‌های افزایش نیاز به کلسیم از قبیل تمایز عضلانی، فعالیت‌های ورزشی و خستگی، SOCE به عنوان گذرگاهی برای ورود کلسیم عمل می‌کند تا با نیاز افزایش یافته برای فرایندهای وابسته به کلسیم تارهای عضلانی سازگار شود (٦).

مشخص شده است که پروتئین‌هایی در هماهنگی SOCE درگیر می‌باشند. STIM1 (Stromal Interaction Molecule 1) حسگر کلسیمی قرار گرفته در شبکه‌ی سارکوپلاسمی (Calcium release-activated calcium modulator 1) Orai1 کانال‌های هدایت‌کننده‌ی کلسیم در سیستم T عضلات و (Mitsugumin29) MG29 پروتئین‌های ضروری می‌باشند که در SOCE نقش دارند (۷). در همین راستا نشان داده شده است که موش‌های فاقد STIM1، عضلات ضعیفی دارند و هر دو نیروی تتانی و نیروی تحریک شده در وضعیت خستگی کاهش می‌یابد (۸).

نتایج در رابطه با تغییرات SOCE در دوران پیری متناقض می‌باشد، به طوری که Zhao و همکاران گزارش کردند، SOCE در عضلات اسکلتی موش‌های صحرایی به شدت دچار اختلال می‌گردد (۹).

مطالعات اخیر نشان داده‌اند که نفوذپذیری غشا پلاسمایی به کاتیون‌های دو ظرفیتی در عضلات اسکلتی سالمندان کاهش می‌یابد و کاهش SOCE در سلول‌های عصبی پیر و فیبروبلاست‌های پیر نشان داده شده است (۱۰). بیان شده است که کاهش SOCE می‌تواند منجر به کاهش مزمن ذخایر کلسیم شبکه‌ی سارکوپلاسمی و کاهش در میزان کلسیم آزاد شده در طول انقباض در عضلات دچار آتروفی شود. این بدعملکردی در هموستاز کلسیم می‌تواند در نهایت، موجب ضعف عضلانی در دوران پیری شود (۱۱). در همین راستا، نشان داده شده است که عضلات اسکلتی موش‌های پیر در حدود ٤٠ درصد STIM1 کمتری نسبت به موش‌های جوان دارند (۳). موش‌های فاقد MG-29 عملکرد غیر طبیعی را در عضلات اسکلتی از قبیل کاهش نیروی انقباضی و اختلال در SOCE نشان می‌دهند. همچنین، همانطور که در بیماری‌های تخریب عضلانی مزمن یا اختلالاتی از قبیل آتروفی و سارکوپنیا مرتبط با سن نشان داده شده است، موش‌های فاقد MG29 بیشتر مستعد خستگی می‌باشند (۱۲). همراه با این، در عضلات اسکلتی موش‌های پیر، MG29 به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد. افزایش خستگی در موش‌های فاقد MG29 به دلیل کاهش میزان کلسیم آزاد شده از شبکه‌ی سارکوپلاسمی می‌باشد (۱۳).

فعالیت ورزشی منظم می‌تواند با ایجاد سازگاری‌های فیزیولوژیکی مختلف، عملکرد ورزشی و عضلانی را از قبیل توانایی در حفظ بار کار زیر بیشینه برای یک دوره‌ی طولانی‌تر، دستیابی به یک برون‌ده توانی بیشتر در یک مسافت یا زمان ثابت بهبود بخشد، همچنین به عنوان یک مداخله‌ی مؤثر در کاهش از دست دادن توده و عملکرد عضلانی معرفی شده است (١٤). کلسیم درون سلولی نقش مهمی در تارهای عضلانی با هدف تولید نیرو، حفظ تأمین انرژی سلول، تنظیم بیان ژن‌های ویژه‌ی عضله و آپوپتوز ایفا می‌نماید و در بیان و پروتئین DHPR (Dihydropyridine) در پاسخ به فعالیت عضلانی افزایش ایجاد می‌کند (١٤). همچنین افزایش در گیرنده‌های دی هیدروپیریدین و رایانودین در عضلات پلاناتاریس و نعلی نشان داده شده است که این تغییرات در جابجایی کلسیم با افزایش در توانایی دویدن همراه می‌باشد (١٥).

HIT، منجر به افزایش سوبستراهای در دسترس عضله، تغییر در فعالیت‌های آنزیمی، افزایش نشانگرهای بیوژنز میتوکندریایی، بهبود ظرفیت بافرینگ عضله و غیره اشاره کرد. همچنین افزایش فراخوانی واحدهای حرکتی، فرکانس و همزمانی واحدهای حرکتی می‌باشد که در نهایت، سبب افزایش نیرو، کارآیی و هماهنگی عضلانی می‌شوند. افزایش تعداد گلبول‌های قرمز و هموگلوبین از فواید استفاده از این تمرینات می‌باشد. بنابراین با بکارگیری این تمرینات می‌توان دامنه‌ی وسیعی از سازگاری‌های متابولیکی و عملکردی را انتظار داشت (١٦).

بنابراین، با توجه به اثر مثبت فعالیت ورزشی بر بهبود توده‌ی عضلانی و افزایش عملکرد عضلانی در افراد پیر و سازگاری‌هایی مثبت در جابجایی کلسیم این سؤال پیش می‌آید که آیا فعالیت ورزشی می‌تواند بر بیان ژن‌های STIM1، Orai1 و MG29 که در جریان SOCE نقش دارند اثر بگذارد؟ از این رو، هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی اثر ٤ هفته تمرین تناوبی شدید بر بیان ژن‌های STIM1، Orai1 و MG29 در عضله‌ی بازکننده‌ی طویل انگشتان رت‌های مبتلا به دیابت می‌باشد.

روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربی و بنیادی- توسعه‌ای است. ٤٨ سر رت صحرایی نر ٨ هفته‌ای با وزن ٢٠ ± ٢٥٠ گرم (در ابتدا) به روش تصادفی ساده به چهار گروه تقسیم شدند:

گروه اول (گروه دیابتی- تمرین): این گروه شامل ١٢ سر رت صحرایی نر ١٠ هفته‌ای بوده که از طریق تزریق درون صفاقی STZ (Streptozotocin) دچار دیابت شدند.

٢) گروه دوم (گروه مبتلا به دیابت): این گروه شامل ١٢ سر رت صحرایی نر ١٠ هفته‌ای بوده که از طریق تزریق درون صفاقی STZ دچار دیابت شده و هیچ‌گونه فعالیت ورزشی انجام ندادند.

٣) گروه سوم (گروه سالم): این گروه شامل ١٢ سر رت

صحرایی نر ۱۰ هفته‌ای بوده که همانند گروه تجربی اول کـه برنامـه‌ی تمرینی اینتروال را انجام دادند.

٤) گروه چهارم (گروه شاهد): این گروه شامل ۱۲ سر رت صـحرایی نر ۱۰ هفته‌ای بوده که هیچ گونه فعالیت ورزشی انجام ندادند.

رت‌ها در آزمایشگاه در شرایط کنتـرل شـده‌ی نـور (۱۲ سـاعت روشنایی و ۱۲ سـاعت تـاریکی، شـروع روشـنایی ۷ صـبح و شـروع خاموشی ۷ عصر) دما (۱ ± ۲۲ سانتی‌گراد) و رطوبـت طبیعـی نگهـداری شدند. تعداد سه تا پنج عدد رت در قفس‌هـایی از جـنس پلکسـی گـلاس با درب توری و به ابعاد ۲۵ در ۲۷ در ٤۳ سانتی‌متر بـه گونـه‌ای نگهـداری شدند که آزادانه به آب و غذای استاندارد دسترسی داشتند.

موش‌های گروه‌هـای تمـرین بـرای آشـنایی بـا نـوارگردان مـدل A1400Y10 (شرکت پیشرو اندیشه صنعت، ساخت ایران)، به مـدت یک هفته با سرعت ۵ تا ۱۰ متر بـر دقیقـه، روی نـوارگردان دویدنـد. برنامه‌ی گروه تمرینی به مدت ٤ هفته و هر هفتـه ۵ جلسـه بـود. کـل مـدت زمـان دویـدن مـوش‌هـای صـحرایی در هـر جلسـه بـر روی نوارگردان، ٤٤ دقیقه، شامل ٦ دقیقه گرم کردن (سرعت ۱۰ تا ۱۲ متـر بر دقیقه)، ۵ دوره تمرین ٤ دقیقه‌ای با تناوب شدید (۷۰ تا ۹۵ درصـد حـداکثر سـرعت)، ٤ دوره تمـرین ۳ دقیقـه بـا شـدت کـم (۵۰ تـا ٦۰ درصد حداکثر سـرعت) و ٦ دقیقـه سـرد کـردن (سـرعت ۱۰ تـا ۱۲ متر بر دقیقـه) بـود. شـیب نـوارگردان صـفر درجـه و در ٤ هفتـه تغییری نداشت. برای وادار کردن حیوان برای ادامه‌ی فعالیت بـر روی تردمیل، ابتدا با ایجاد صدا و سپس از شـوک الکتریکـی اسـتفاده شـد (جدول ۱).

پـس از اتمـام پروتکـل آشناسـازی و رسـیدن رت‌هـا بـه وزن ۳۰۰ گرم در هفته‌ی دهم زندگی، پس از ۱۲ ساعت محرومیت از غذا، با تزریـق درون صـفاقی محلـول STZ (Sigma, St. Louis, MO)؛ ٤۵ mg/Kg حل شـده در بـافر سـیترات تـازه ۰/۵mol/L، (pH: 5/4 دیابت القاء گردید. به رت‌های غیر مبتلا به دیابت نیز معـادل حجمـی بافر سیترات تزریق شـد. ٤۸ سـاعت پـس از تزریـق، بـا ایجـاد یـک جراحت کوچک توسط لانست بر روی ورید دم، یک قطره خـون بـر روی نوار گلوکومتری قرار داده شد و نوار توسـط دسـتگاه گلوکـومتر (Glucotrend 2، شرکت روشه آلمان) اندازه‌گیری گردید و رت‌هـای صحرایی که قند خون آن‌ها بالاتر از ۳۰۰ mg/dL بود به عنـوان مـدل دیابتی در نظر گرفته شدند (۱۷).

با توجه بـه تـأخیر در بـروز علائـم رفتـاری نوروپـاتی، پـس از گذشت مدتی از تزریق STZ تـا زمـان اثبـات بـروز نوروپـاتی، هـیچ مداخله‌ای صورت نپذیرفت. لذا در مطالعه‌ی حاضـر، ۲ هفتـه پـس از تزریـق STZ، رت‌هـایی کـه علائـم نوروپـاتی (آلودینیـا مکـانیکی و پردردی حرارتی) را نشان دادند به عنوان مدل نوروپاتی دیابت در نظر گرفته شدند (۱۸). همچنین هر دو هفته یکبار نیز علائم رفتاری و قند خون رت‌ها به منظور اثبات دوام دیابت و نوروپاتی سنجیده شـد و در صورت بازگشت علائم رفتاری و قند خون به میزان طبیعی، رت‌هـای مورد نظر از فرایند تحقیق خارج می‌شدند.

به منظور اندازه‌گیری آلودینیـای مکـانیکی، حیـوان بـر روی یـک شبکه‌ی سیمی و در داخل یـک محفظـه‌ی پلکسـی گـلاس بـه ابعـاد ۲۰×۲۰ و ارتفـاع ۳۰ سـانتی‌متـر قـرار گرفـت. جهـت عـادت کـردن حیوانات به محیط جدید، ۳۰ دقیقه قبـل از آزمـایش، درون محفظـه‌ی شـفاف و بـر روی صـفحه‌ی مشـبک قـرار گرفتنـد. جهـت سـنجش آلودینیای مکانیکی، از تارهای مختلف Von Fery در محدوده‌ی ۲ تـا ٦۰ گرم (۲، ٤، ٦، ۸، ۱۵، ۲٦، ٦۰) سـاخت شـرکت USA، Stolting جهت سنجش حساسیت پوست به تحریکات تماسی استفاده شد. هـر آزمایش با تار دارای کم‌ترین وزن شروع شد و در صورت عدم ایجـاد پاسخ، به ترتیب از تارهـای بـا وزن بـالاتر اسـتفاده مـی‌گردیـد (۲۵). چنانچه ۲ بار متوالی، پاسخ (بلند کـردن پـا توسـط حیـوان) مشـاهده مـی‌شـد، همـان وزنـه بـه عنـوان آسـتانه‌ی پـس کشـیدن پنجـه PWT (Paw withdrawal threshold) محسوب می‌گشت و دیگـر آزمایش ادامه پیدا نمی‌کرد. چنانچه حیوان بـه هـیچ یـک از تارهـا، از جمله تار شماره‌ی ٦۰ نیز پاسخ نداد، عدد ٦۰ به عنوان آستانه‌ی پاسخ در نظر گرفته می‌شد (۲۷).

از آزمـون TF (Tail-flick)، جهـت سـنجش پـردردی حرارتـی حیوانات استفاده شد. این کار ۲ روز قبل از انجام آزمایش و به مـدت ۲۰ دقیقه و ۳ بار در روز انجـام گرفـت. پـس از ورود حیـوان تطـابق یافته به حدود ۵ سانتی‌متر از نوک دم روی چشم حساس الکترونیکـی دستگاه TF قرار گرفته و دکمـه‌ی شـروع دسـتی یـا پـایی فشـار داده می‌شود که در این هنگام پرتو نوری حاصـل از روشـن شـدن لامـپ دستگاه به وسیله‌ی آیینه‌ی مقعری کـه بـالای آن تعبیـه شـده روی دم حیوان متمرکز مـی‌شـود و حیـوان پـس از مـدتی (احسـاس درد) بـه صورت غیرارادی دم خود را پس می‌کشد.

جدول ۱. پروتکل تمرین HIIT

هفته‌ی تمرینی	۱	۲	۳	٤
جلسات تمرینی	۵	۵	۵	۵
درصد اکسیژن مصرفی بیشینه	۸۵/۹	۸۷/۶	۸۸/۹	۸۹/۶
میانگین سرعت در هفته‌ی تمرینی (متر بر دقیقه)	۱۷	۱۹/۳	۲۲/۸	۲۴/۸

بعد از تکان دادن دم توسط حیوان بلافاصله لامپ خارت و مدت زمان تأخیر پس کشیدن دم که به صورت عدد روی دستگاه مشخص است، یاداشت می‌شد. در تمام آزمایش‌ها، ارزیابی تأخیر پس کشیدن دم در زمان، دما و شرایط یکسان انجام می‌گیرد. شدت جریان دستگاه ۳٤ صدم آمپر و فاصله‌ی لامپ از چشم حساس الکترونیکی ۲/٦ سانتی‌متر تنظیم شد. حداکثر زمان برای هر آزمون ۱۰ ثانیه لحاظ گردید تا از آسیب به آزمودنی‌ها جلوگیری شود (۱۹).

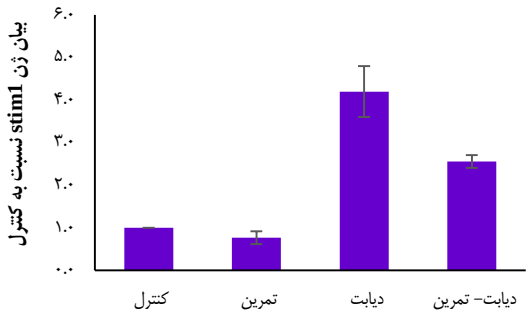
برای استخراج RNA، QIAzol® Lysis (Qiagen, Germany) Reagent و کلروفرم (Qiagen, Germany) به صورت دستی و مطابق دستورالعمل‌های تولیدکننده مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور استخراج total RNA (نسبت ۱ به ۱۰)، ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت عضله‌ی EDL (Extensor digitorum longus) به طور جداگانه از هر یک از گروه‌ها همگن شد. برای برداشتن اجزای پروتئینی، محصول نهایی به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید (۱۲۰۰۰×g در دمای ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد). سپس این محصول با نسبت ۱ به ۰/۵ با کلروفرم مخلوط شده و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. برای جدا کردن مواد معدنی و بخش‌های آبی محصول مورد نظر، به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ (۱۲۰۰۰×g در دمای ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد) انجام شد. در مرحله‌ی بعد، بخش حاوی RNA جدا شده و با استفاده از ایسوپروپانول به نسبت ۱ به ۰/۵ مخلوط شده و در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه (۱۲۰۰۰×g در ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد) سانتریفیوژ شد. برای شستن پلت‌های حاوی RNA از اتانول استفاده شد. پس از آن غلظت RNA اندازه‌گیری و در ۲۰ میکرو لیتر آب بدون RNas (Eppendorff, Germany) معلق شد. نسبت ۲٦۰ تا ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ به عنوان خالص‌سازی بهینه در نظر گرفته شد. تولید DNA با استفاده از Quantitect Reverse Transcription kit (Qiagen, Germany) و بر اساس دستورالعمل‌های تولیدکننده انجام گرفت، همچنین توالی پرایمر ژن‌ها در جدول ۲ آمده است. پژوهش حاضر بر اساس کلیه‌ی اصول اخلاقی تأیید شده توسط کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کرمان (EC/93-9/KNRC) انجام پذیرفت.

در بخش آمار توصیفی از شاخص‌های پراکندگی انحراف معیار، میانگین و نمودار و در بخش آمار استنباطی جهت تعیین نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون Kolmogorov–Smirnov استفاده شد. جهت تعیین معنی‌دار بودن تفاوت بین متغیرها از آزمون آماری واریانس دو سویه (two way ANOVA) و در صورت نیاز، آزمون تعقیبی Tukey به کار رفت. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۲ (version 22, IBM Corporation, Armonk, NY) استفاده شد. حداقل سطح معنی‌داری داده‌ها، برابر با $P < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

هدف از پژوهش حاضر، مطالعه‌ی تأثیر یک دوره تمرین تناوبی شدید بر بیان ژن‌های Stim1، Orai1 و MG29 در عضله‌ی EDL موش‌های مبتلا به دیابت بود.

نتایج آنالیز واریانس دوطرفه، اثر معنی‌داری را در عامل دیابت بر سطوح بیان ژن Stim1 در عضله‌ی EDL گروه‌های دیابت و دیابت- تمرین با گروه‌های شاهد و تمرین پس از ٤ هفته تمرین تناوبی شدید نشان نمی‌دهد ($P = ۰/۵۷۸$). بنابراین، دیابت بر بیان ژن Stim1 در عضله‌ی بازکننده‌ی طویل انگشتان موش‌های صحرایی نر اثر معنی‌داری ندارد (شکل ۱).

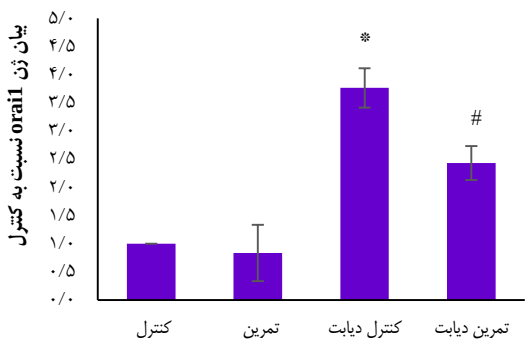


شکل ۱. بیان ژن STIM1 نسبت به گروه شاهد

نتایج آنالیز واریانس دوطرفه، اثر معنی‌داری را در عامل دیابت و تمرین بر سطوح بیان ژن Orai1 در عضله‌ی EDL گروه‌های دیابت و دیابت- تمرین با گروه‌های شاهد و تمرین پس از ٤ هفته تمرین تناوبی شدید نشان می‌دهد ($P = ۰/۰۵$). بنابراین، تمرین تناوبی شدید بر بیان ژن Orai1 در عضله‌ی بازکننده‌ی طویل انگشتان موش‌های صحرایی نر مبتلا به دیابت کاهش معنی‌داری دارد (شکل ۲).

جدول ۲. توالی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر

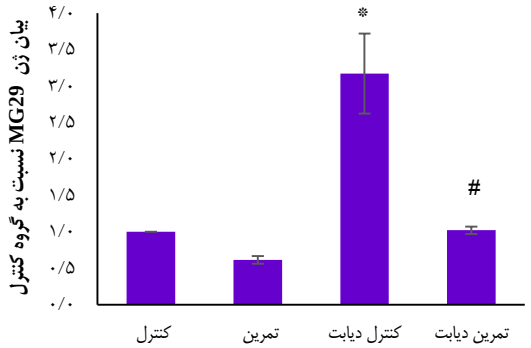
ژن‌ها	توالی پرایمر	NCBI
Orai1	F = 5'-ccataagacggaccgacagt-3' R = 5'-gggaaggtgaggacttaggc-3'	NM_001013982.1
STIM1	F = 5'-tggagctgccacagtatgag-3' R = 5'-tgattgtggcgagtcaagag-3'	NM_001108496.2
MG29	F = GGAATTCCGCTGGGCTTCATCAAAGTTCTCC R = CGGGATCCGACTCACCTGAAGGGATAGCC	AB158471.1



شکل ۲. بیان ژن Orai1 نسبت به گروه شاهد

*: تفاوت معنی‌دار گروه کنترل دیابت با سایر گروه‌ها؛ #: تفاوت معنی‌دار گروه تمرین دیابت

نتایج آنالیز واریانس دوطرفه، اثر معنی‌داری را در عامل دیابت و تمرین بر سطوح بیان ژن MG29 در عضله‌ی EDL گروه‌های دیابت و دیابت- تمرین با گروه‌های شاهد و تمرین پس از ٤ هفته تمرین تناوبی شدید نشان می‌دهد (P = ۰/۰۱). بنابراین، تمرین تناوبی شدید بر بیان ژن MG29 در عضله‌ی بازکننده‌ی طویل انگشتان موش‌های صحرایی نر مبتلا به دیابت کاهش معنی‌داری دارد (شکل ۳).



شکل ۳. بیان ژن MG29 نسبت به گروه شاهد

*: تفاوت معنی‌دار گروه کنترل دیابت با سایر گروه‌ها؛ #: تفاوت معنی‌دار گروه تمرین دیابت

همچنین یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد، پس از ٤ هفته تمرین تناوبی، آستانه‌ی درد در گروه دیابت تمرین کرده نسبت به گروه دیابت تمرین نکرده به طور معنی‌داری بالاتر بود. علاوه بر این، معیار وزن موش‌ها قبل و بعد از پروتکل تمرین گزارش شده است (جدول ۳).

بحث

در مطالعه‌ی حاضر، تأثیر تمرین تناوبی شدید بر ژن‌های درگیر در جریان کلسیم در عضله‌ی EDL موش‌های مبتلا به دیابت مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد که ٤ هفته تمرین تناوبی شدید منجر به کاهش معنی‌دار در بیان ژن‌های Orai، MG29 و کاهش غیر معنی‌دار در بیان ژن Stim1 در عضله‌ی بازکننده‌ی طویل انگشتان رت‌های صحرایی نر مبتلا به دیابت نسبت به گروه شاهد شد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که تمرین تناوبی شدید، بیان این ژن‌ها را در بیماری دیابت تعدیل کرده و به حالت پایه (شرایط کنترل) نزدیک می‌کند، چراکه یافته‌های این پژوهش نشان داد که این ژن‌ها در حالت دیابت، افزایش بیان چشمگیری دارند.

جدول ۳. میانگین توده‌ی بدنی پیش و پس از تمرین در گروه‌های پژوهش

گروه‌ها	توده‌ی بدنی (گرم)	
	پیش از تمرین	پس از تمرین
شاهد	۲۵۰ ± ۱۰/۷۰۷	۲۸۰/۳۰ ± ۱۰/۳۰۳
تمرین	۲۵۰/۸۰۰ ± ۱۱/۳۰۳	۲۶۰/۶۰۰ ± ۹/۴۰۸
دیابت	۲۵۰/۸۰ ± ۹/۶۴	۲۳۰/۶۷۰ ± ۶/۱
دیابت- تمرین	۲۵۰/۷۰ ± ۱۱/۹۶۲	۲۳۸/۲۰ ± ۸/۹

یافته‌های این مطالعه با پژوهش Izadi و همکاران همراستا بود. آن‌ها نشان دادند که تمرین تناوبی با شدت بالا در رت‌هایی که مبتلا به دیابت شده‌اند، تنظیم نامناسب RyR2 را به وسیله‌ی یک سازوکار که شدت و مدت تمرین را هدف قرار داده است، بهبود می‌بخشد و این نوع تمرین اثر کاهشی بیان ژن RyR2 و SERCA2a و بدکاری آن‌ها را که از کاردیومیوپاتی دیابتی ناشی می‌شود، طبیعی می‌سازد یا کاهش می‌دهد (۲۰).

همچنین Liu و همکاران نشان دادند که در گروه تمرین، بیان mRNA ژن‌های تنظیم‌کننده‌ی کلسیم سلولی مانند STIM1 و Orai1 به طور قابل توجهی کاهش یافته و تمرین ورزشی مزمن با شدت متوسط باعث بهبود سیگنال‌های کلسیم داخل سلولی در لنفوسیت‌های کبدی می‌شود که با یافته‌های پژوهش حاضر همخوانی داشت (۲۱).

SOCE مسیر اصلی ورود کلسیم برای سلول‌های تحریک نشده است، اما در بافت‌های تحریک‌پذیر مانند عضلات اسکلتی یا قلبی نیز وجود دارد. نشان داده شده است جهش‌های (Gain-of-Function) GoF باعث تولید پروتین‌های STIM1 و Orai1 می‌شود که به طور اساسی منجر به فعال شدن بیش از حد SOCE و در نتیجه ورود Ca2+ به خارج سلول می‌گردد. STIM1 در حالت استراحت نیز یک گذرگاه پروتئینی- تنظیمی مرتبط با SOCE است. یافته‌های پژوهش حاضر با نتایج پژوهش Litvan و همکاران همراستا نبود. آن‌ها نشان دادند که جریان مختل شده‌ی کلسیم در شبکه‌ی آندوپلاسمی شریان‌های کرونری در موش‌های مبتلا به دیابت که به علت کاهش در بیان پروتئین STIM1 ایجاد می‌شود، منجر به تضعیف ریلکسیشن مرتبط با آندوتلیوم در شریان‌های کرونری دیابتی می‌شود. در حالی که بیش بیانی STIM1 تأثیر درمانی مفیدی بر اختلالات آندوتلیلال

کرونری در دیابت دارد (۲۲). این سازوکار ممکن است به واسطه‌ی کاهش عملکرد استیل کولین [Ach] سلول‌های عضلات صاف باشد.

گزارش شده است که کاهش انتشار +Ca2 از ER در عروق کرونری توسط هیپرگلیسمی و کاهش عملکرد استیل کولین یکی از دلایل اختلالات کرونری در بیماری دیابت می‌باشد. انتشار تضعیف شده و کاهش سطح [+ Ca2] در شبکه‌ی آندوپلاسمی، ناسازگاری‌هایی اعمال می‌کند که باعث تضعیف قابل توجهی بر عملکردهای فیزیولوژیکی اندوتلیوم از جمله انسداد شریان قلبی در بیماران مبتلا به دیابت می‌شود (۲۳). زیرا هیپرگلیسمی یکی از دلایل ضعیف شدن عروق کرونر است. یکی دیگر از عوامل تأثیرگذار بر تغییرات مسیرهای SOCE، ممکن است تولید اکسید نیتریک باشد زیرا گزارش شده است در شرایط استراحت و در غیاب Ca2+ خارج سلولی در موش‌های مبتلا به دیابت در مقایسه با موش‌های سالم کاهش می‌یابد. اما این کاهش به طور قابل توجهی توسط STIM1 به سطح عادی بازگردانده می‌شود. بنابراین می‌توان گفت که بیان پروتئین STIM1 در بیماری دیابت که منجر به کاهش انتشار Ca2+ از ER می‌شود و در نتیجه عملکرد وابسته به اندوتلیوم را در موش‌های مبتلا به دیابت کاهش می‌دهد. یکی دیگر از عوامل تغییرات STIM1 در پژوهش حاضر ممکن است سطح گلوکز پلاسما و اسیدهای چرب آزاد باشد، زیرا این فاکتورها در بیماری دیابت به طور قابل توجهی بیماری‌های عروقی را افزایش می‌دهند و این عوامل STIM1 را به طور قابل توجهی کاهش می‌دهد (۲٤).

Wisløff و همکاران نشان دادند در رت‌های دیابتی شده به وسیله‌ی STZ، علاوه بر کاهش در بیان ژن و پروتئین‌های تنظیم کننده‌ی چرخه‌ی کلسیم در بافت عضلانی، یکپارچگی و عملکرد درست گیرنده‌های رایانودین با ابتلای به این بیماری کاهش می‌یابد (۲۵). این نتایج با یافته‌های پژوهش حاضر همخوانی نداشت. هرچند مطالعات متعددی نشان می‌دهند که تمرین ورزشی قادر به تأخیر در آغاز درد نوروپاتی، کاهش حساسیت لامسه‌ای و آلودینیای مکانیکی (۲۹) و پردردی حرارتی می‌گردد. این تعارض‌ها را عمدتاً به شدت، مدت و نوع تمرینات ورزشی و محرک درد مورد استفاده نسبت داده‌اند.

همچنین یکی دیگر از عوامل کاهش فاکتورهای مورد بررسی در مطالعه‌ی حاضر ممکن است به واسطه‌ی سازوکارهای گوناگونی نظیر کنترل عوامل استرس اکسایشی و عوامل رشدی و آتروفی عضلانی باشد. زیرا کاهش بیان MG29 و کاهش SOCE با آتروفی عضلانی مرتبط می‌باشد که ممکن است باعث کاهش ظرفیت هموستاتیک Ca2+ درون سلولی شود. با این حال تمرین به شیوه‌ی HIIT می‌تواند این کاهش وزن عضلانی را کمتر کرده و از آتروفی عضلانی ناشی از کاهش فعالیت بدنی پیشگیری کند. همچنین این نتایج نشان داد که کاهش فعالیت بدنی یک تأثیر منفی و مخرب بر ژن‌های درگیر در جریان ورودی کلسیم در عضله‌ی اسکلتی می‌گذارد زیرا نشان داده شده که TRPC3 جریان ورودی کلسیم را واسطه‌گری کرده و سبب فعال شدن عامل هسته‌ای فعال‌کننده‌ی سلول‌های T (NFAT) در عضله در حال دوباره شکل‌گیری می‌شود (۲٦).

در پژوهش Estrada و همکاران نشان دادند که جریان مختل شده‌ی کلسیم در شبکه‌ی آندوپلاسمی شریان‌های کرونری در موش‌های مبتلا به دیابت که به علت کاهش در بیان پروتئین STIM1 ایجاد می‌گردد، سبب تضعیف ریلکسیشن مرتبط با آندوتلیوم در شریان‌های کرونری دیابتی می‌شود. در حالی که بیش بیانی STIM1 تأثیر درمانی مفیدی بر اختلالات آندوتلیال کرونری در دیابت دارد (۲۷). تناقض مشاهده شده در ادبیات پژوهشی را شاید بتوان به نوع تمرین، نوع آزمودنی و روش‌های اندازه‌گیری متغیرهای مورد استفاده در پژوهش‌ها نسبت داد.

دیگر یافته‌ی پژوهش حاضر نشان داد که پس از ٤ هفته تمرین تناوبی، آستانه‌ی درد در گروه دیابت تمرین کرده نسبت به گروه دیابت تمرین نکرده به طور معنی‌داری بالاتر بود. همچنین آزمون Von Frey نشان داد که پس از ٤ هفته تمرین تناوبی، آستانه پس کشیدن پنجه در گروه دیابت تمرین کرده نسبت به گروه دیابت تمرین نکرده به طور معنی‌داری بالاتر بود.

Taherabadi و همکاران گزارش کردند که ٤ هفته تمرین استقامتی زیربیشینه قادر به تعدیل پردردی حرارتی در موش‌های مبتلا به دیابت دارای نوروپاتی نیست (۲۸). این نتایج با یافته‌های پژوهش حاضر همخوانی نداشت. هرچند مطالعات متعددی نشان می‌دهند که تمرین ورزشی قادر به تأخیر در آغاز درد نوروپاتی، کاهش حساسیت لامسه‌ای و آلودینیای مکانیکی (۲۹) و پردردی حرارتی می‌گردد. این تعارض‌ها را عمدتاً به شدت، مدت و نوع تمرینات ورزشی و محرک درد مورد استفاده نسبت داده‌اند.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که بیان ژن‌های STIM1، Orai1 و MG29 در اثر تمرینات ورزشی و القای دیابت تأثیرپذیر بوده و ممکن است جزء سازوکار شکل‌پذیری عضلانی باشند. همچنین تمرینات ورزشی به صورت تمرین تناوبی شدید قادر به تعدیل اختلال بیان این پروتئین‌ها در حالت دیابت بود که ممکن است به واسطه‌ی سازوکارهای گوناگونی نظیر کنترل عوامل استرس اکسایشی و عوامل رشدی باشد و از این طریق اثرات سودمند خود را بر عوارض بیماری دیابت اعمال می‌کند.

تشکر و قدردانی

تمامی اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی در پژوهش حاضر

رعایت شده است (کد اخلاق: EC/93-9/KNRC) نویسندگان مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی مرکز علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی کرمان بابت حمایت از پژوهش حاضر اعلام می‌دارند.

References

1. Christ-Crain M, Winzeler B, Refardt J. Diagnosis and management of diabetes insipidus for the internist: an update. J Intern Med 2021; 290(1): 73-87.
2. Robertson GL. Differential diagnosis of familial diabetes insipidus. Handb Clin Neurol 2021; 181: 239-48.
3. Rosenberg P, Zhang H, Bryson VG, Wang C. SOCE in the cardiomyocyte: the secret is in the chambers. Pflugers Arch 2021; 473(3): 417-34.
4. Rosenberg P, Katz D, Bryson V. SOCE and STIM1 signaling in the heart: Timing and location matter. Cell Calcium 2019; 77: 20-8.
5. Zambrano F, Silva L, Uribe P, Gärtner U, Taubert A, Schulz M, et al. SOCE-inhibitor reduced human sperm-induced formation of neutrophil extracellular traps. Reproduction 2021; 161(1): 21-9.
6. Souza Bomfim GH, Niemeyer BA, Lacruz RS, Lis A. On the connections between TRPM channels and SOCE. Cells 2022; 11(7): 1190.
7. Silva-Rojas R, Laporte J, Böhm J. STIM1/ORAI1 loss-of-function and gain-of-function mutations inversely impact on SOCE and calcium homeostasis and cause multi-systemic mirror diseases. Front Physiol 2020; 11: 604941.
8. Zhao H, Yan G, Zheng L, Zhou Y, Sheng H, Wu L, et al. STIM1 is a metabolic checkpoint regulating the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma. Theranostics 2020; 10(14): 6483-99.
9. Zhao X, Weisleder N, Thornton A, Oppong Y, Campbell R, Ma J, et al. Compromised store operated Ca2+ entry in aged skeletal muscle. Aging Cell 2008; 7(4): 561-8.
10. Wang J, Zhao W, Wang X, Gao H, Liu R, Shou J, et al. Enhanced store-operated calcium entry (SOCE) exacerbates motor neurons apoptosis following spinal cord injury. Gen Physiol Biophys 2021; 40(1): 61-9.
11. Lin YS, Lin YH, Thi MN, Hsiao SC, Chiu WT. STIM1 controls the focal adhesion dynamics and cell migration by regulating SOCE in osteosarcoma. Int J Mol Sci 2021; 23(1): 162.
12. Niu L, Wu F, Li K, Li J, Zhang SL, Hu J, et al. STIM1 interacts with termini of Orai channels in a sequential manner. J Cell Sci 2020; 133(8): jcs239491.
13. Pan Z, Hirata Y, Nagaraj RY, Zhao J, Nishi M, Hayek SM, et al. Co-expression of MG29 and ryanodine receptor leads to apoptotic cell death: effect mediated by intracellular Ca2+ release. J Biol Chem 2004; 279(19): 19387-90.
14. Zachovajeviene B, Siupsinskas L, Zachovajevas P, Venclovas Z, Milonas D. Effect of diaphragm and abdominal muscle training on pelvic floor strength and endurance: results of a prospective randomized trial. Sci Rep 2019; 9(1): 19192.
15. Dayal A, Fernández-Quintero ML, Liedl KR, Grabner M. Pore mutation N617D in the skeletal muscle DHPR blocks Ca^{2+} influx due to atypical high-affinity Ca^{2+} binding. Elife 2021; 10: e63435.
16. Martin-Smith R, Cox A, Buchan DS, Baker JS, Grace F, Sculthorpe N. High intensity interval training (HIIT) improves cardiorespiratory fitness (CRF) in healthy, overweight and obese adolescents: a systematic review and meta-analysis of controlled studies. Int J Environ Res Public Health 2020; 17(8): 2955.
17. Wei M, Ong L, Smith MT, Ross FB, Schmid K, Hoey AJ, et al. The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes. Heart Lung Circ 2003; 12(1): 44-50.
18. Calcutt NA. Experimental models of painful diabetic neuropathy. J Neurol Sci 2004; 220(1-2): 137-9.
19. Hole K, Tjølsen A. Tail flick test. In: Gebhart GF, Schmidt RF, editor. Encyclopedia of pain. Berlin/Heidelberg, Germany: Springer; 2007. p. 2392-5.
20. Izadi MR, Gaeini AA, Ravasi AA, Delfan M. Effect of 4 weeks high intensity interval training on gene expression of Ryanodine receptor calcium channels (RyR2), SERCA2a and Phospholamban in diabetic rat's heart. J Sports Sci 2018; 10(1): 1-12.
21. Liu R, Fan W, Krüger K, Xiao YU, Pilat C, Seimetz M, et al. Exercise affects T-Cell function by modifying intracellular calcium homeostasis. Med Sci Sports Exerc 2017; 49(1): 29-39.
22. Litvan I, Goldman JG, Tröster AI, Schmand BA, Weintraub D, Petersen RC, et al. Diagnostic criteria for mild cognitive impairment in Parkinson's disease: Movement disorder society task force guidelines. Mov Disord 2012; 27(3): 349-56.
23. Shawer H, Norman K, Cheng CW, Foster R, Beech DJ, Bailey MA. ORAI1 Ca^{2+} channel as a therapeutic target in pathological vascular remodelling. Front Cell Dev Biol 2021; 9: 653812.
24. Yeung PSW, Yamashita M, Prakriya M. Molecular basis of allosteric Orai1 channel activation by STIM1. J Physiol 2020; 598(9): 1707-23.
25. Wisløff U, Støylen A, Loennechen JP, Bruvold M, Rognmo O, Haram PM, et al. Superior cardiovascular effect of aerobic interval-training versus moderate continuous training in elderly heart failure patients: a randomized study. Circulation 2007; 115(24): 3086-94.
26. Lin DC, Zheng SY, Zhang ZG, Luo JH, Zhu ZL, Li L, et al. TRPC3 promotes tumorigenesis of gastric cancer via the CNB2/GSK3β/NFATc2 signaling pathway. Cancer Lett 2021; 519: 211-25.
27. Estrada IA, Donthamsetty R, Debski P, Zhou MH, Zhang SL, Yuan JX, et al. STIM1 restores coronary endothelial function in type 1 diabetic mice. Circ Res 2012; 111(9): 1166-75.
28. Taherabadi SJ, Heidarianpour A, Basereh M. Effects of submaximal endurance training and vitamin D3 supplementation on pain threshold in diabetic rats. Zahedan J Res Med Sci 2013; 15(7): e92923.
29. Cruccu G, Sommer C, Anand P, Attal N, Baron R, Garcia-Larrea L, et al. EFNS guidelines on neuropathic pain assessment: revised 2009. Eur J Neurol 2010; 17(8): 1010-8.

DOI: *10.48305/jims.v40.i685.0659*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 40, No. 685, 1st Week, November 2022**

Received: 08.08.2022 Accepted: 02.10.2022 Published: 29.10.2022

Investigating the Effect of a Period of Intense Interval Training on the Expression of Genes Involved in Calcium Flow in the EDL Muscle of Diabetic Rats

Abdolreza Kazemi[1], Zia Navidi[2], Mokhtar Ghanbarzadeh[3], Narges Zand Zolghalam[3]

Original Article

Abstract

Background: Diabetic neuropathy (DN) leads to the initiation of several pathways, including oxidative stress and destruction of small vessels, as well as the destruction of factors involved in the SR network of muscle. The purpose of this research was to investigate the effect of the high intensity interval training on the expression of genes involved in calcium flow in the EDL muscle of diabetic rats.

Methods: The current research was experimental development study. In total, 48 male rats were randomly divided into 4 groups: training diabetes, diabetes, training and control group. The training group performed the interval training program for 4 weeks and 5 sessions per week. Each training session on the treadmill lasted for 44 minutes. The statistical test of two-way variance (two-way ANOVA) was used for analyzing the data.

Findings: High intensity interval training led to a non-significant decrease in Stim1 gene expression. And there was a significant decrease in the expression of Orai and MG29 genes in the long extensor digitorum muscle of male rats.

Conclusion: It is possible HIIT training is able to modulate the expression disorder of Orai, MG29, and Stim1 in diabetes, which may be due to various mechanisms such as controlling oxidative stress factors and growth factors. It seems it exerts its beneficial effects on the Side-effects of diabetes.

Keywords: Diabetic neuropathies; High-Intensity Interval Training; Genes; EDL; Rats

Citation: Kazemi A, Navidi Z, Ghanbarzadeh M, Zand Zolghalam N. **Investigating the Effect of a Period of Intense Interval Training on the Expression of Genes Involved in Calcium Flow in the EDL Muscle of Diabetic Rats.** J Isfahan Med Sch 2022; 40(685): 659-66.

1- Associate Professor, Department of Physical Education, School of Literature and Humanities, Vail-E-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjani, Iran
2- Assistant Professor, Department of Anesthesiology, School of Medicine, Rafsanjani University of Medical Sciences, Rafsanjani, Iran
3- MSc, Department of Physiology, School of Literature and Humanity, Islamic Azad University of Kerman, Kerman, Iran
Corresponding Author: Abdolreza Kazemi, Associate Professor, Department of Physical Education, School of Literature and Humanities, Vail-E-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjani, Iran; Email: rkazemi22@yahoo.com