DOI: 10.22122/jims.v38i575.13095 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و هشتم/شماره‌ی ۵۷۵/هفته‌ی سوم تیر ۱۳۹۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۳/۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۳/۲۷ تاریخ چاپ: ۱۳۹۹/۴/۲۱

تأثیر تمرین مقاومتی فزاینده و تناوبی شدید بر بیان ژن عامل هسته‌ای کاپا B عضله‌ی قلبی و عامل نکروز دهنده‌ی تومور آلفا سرمی، در موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نوع ۲

افسانه الهی[۱]، ندا خالدی[۲]، پژمان معتمدی[۲]، حسین عسکری[۳]، حمید رجبی[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: شایع‌ترین علل مرگ و میر بیماران مبتلا به دیابت، اختلالات قلبی- عروقی است که یکی از دلایل آن، عوامل التهابی می‌باشد. با توجه به این که فعالیت بدنی قادر به کاهش التهاب است، مطالعه‌ی حاضر، با هدف بررسی تأثیر دو نوع تمرین مقاومتی فزاینده و تمرین تناوبی شدید (High-intensity interval training یا HIIT) بر بیان ژن Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB) عضله‌ی قلبی و Tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) سرمی موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت نر انجام شد.

روش‌ها: در این تحقیق تجربی، ۷۲ سر Rat نر نژاد Wistar ۶ هفته‌ای به ۶ گروه ۱۲تایی شامل موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت (n = ۱۲)، شاهد (n = ۱۲)، تمرین تناوبی شدید (High-intensity interval training یا HIIT) (n = ۱۲)، مبتلا به دیابت با تمرین تناوبی شدید (Diabetic + intensity interval training یا DIIT) (n = ۱۲)، مبتلا به دیابت با تمرین مقاومتی شدید (Diabetic + resistance training یا DRT) (n = ۱۲) و تمرین مقاومتی (Resistance training یا RT) (n = ۱۲) تقسیم شدند. تمرین RT در ۶ هفته‌ی ۳ جلسه‌ای بالا رفتن از نردبان عمودی، همراه با وزنه‌های ۵۰، ۷۵، ۹۰ و ۱۰۰ درصد وزن بدن حیوان، انجام شد. سپس، ۳۰ گرم به وزنه‌ها اضافه می‌شد، تا جایی که Ratها نتوانند نردبان را طی کنند. HIIT نیز در ۶ هفته‌ی ۳ جلسه‌ای، با شدت ۱۱۰-۵۰ درصد بیشینه‌ی اکسیژن مصرفی صورت گرفت. ۲۴ ساعت بعد از اتمام تمرین آزمون عملکردی، قدرت مچ دست و زمان رسیدن به درماندگی سنجش شد و ۴۸ ساعت بعد از آزمون، حیوانات تشریح شدند. در نهایت، بیان ژن NF-κB با استفاده از روش Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR)، مقدار سطوح TNF-α سرمی با استفاده از روش Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) و آزمون ANOVA مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: میزان بیان ژن NF-κB در گروه HIIT نسبت به گروه RT افزایش بیشتری داشت (P = ۰/۰۰۰۷) و میزان سرمی TNF-α پس از هر دو نوع تمرین کاهش معنی‌داری داشت که در گروه HIIT (۶/۱۳) بارزتر بود.

نتیجه‌گیری: ۶ هفته تمرین HIIT و RT، می‌تواند نقش مهمی در کاهش معنی‌دار التهاب و سازگاری‌های مربوط به قدرت و استقامت داشته باشد.

واژگان کلیدی: عامل هسته‌ای کاپا B؛ عامل نکروز دهنده‌ی تومور آلفا؛ تمرین مقاومتی؛ قلب

ارجاع: الهی افسانه، خالدی ندا، معتمدی پژمان، عسکری حسین، رجبی حمید. **تأثیر تمرین مقاومتی فزاینده و تناوبی شدید بر بیان ژن عامل هسته‌ای کاپا B عضله‌ی قلبی و عامل نکروز دهنده‌ی تومور آلفا سرمی، در Ratهای مبتلا به دیابت نوع ۲.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۹؛ ۳۸ (۵۷۵): ۳۱۷-۳۲۴.

مقدمه

عامل هسته‌ای کاپا B (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells یا NF-κB)، یک پروتئین است که کنترل رونویسی DNA، تولید سیتوکین و بقای سلولی را کنترل می‌کند و در پاسخ‌های سلولی به محرک‌هایی نظیر استرس، سیتوکین‌ها، رادیکال‌های آزاد، فلزات سنگین، اشعه‌ی ماورای بنفش،

۱- دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه علوم گیاهی و بیوتکنولوژی، دانشکده‌ی علوم زیستی و منابع طبیعی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۴- استاد، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: ندا خالدی؛ استادیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده‌ی تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

Email: n.khaledi@khu.ac.ir

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

اکسید می‌شود و در آنتی‌ژن‌های باکتری یا ویروسی دخالت دارد و در کاردیومیوپاتی دیابتی، در سلول‌های قلبی تولید می‌شود (۱). در بسیاری از بیماری‌های قلبی، افزایش فعالیت NF-κB وجود دارد. به طور خاص، در نارسایی قلب، هیپرتروفی قلب، کاردیومیوپاتی دیابتی و بیماری‌های عروق کرونر NF-κB فعال می‌شود (۲). فعال شدن NF-κB، ممکن است در کاردیومیوپاتی دیابتی از طریق مسیرهایی با کنترل مجموعه‌های مختلف ژن‌ها و درگیر شدن در فرایندهای مرتبط مانند استرس اکسیداتیو، التهاب، اختلال عملکرد اندوتلیال، فیبروز، هیپرتروفیک و آپوپتوز انجام شود (۲). در کاردیومیوپاتی دیابتی، غلظت‌های بالای گلوکز و لیپوپروتئین‌ها باعث تحریک فعال شدن NF-κB میوکارد می‌شوند (۳).

همچنین، عامل نکروز تومور α (Tumor necrosis factor-α یا TNF-α) بیان مولکول‌های چسبنده‌ی اندوتلیال را بالا می‌برد و بیان نیتریک اکساید و سیکلواکسیژنازهای اندوتلیال را کم می‌کند که منجر به تضعیف اتساع قلبی وابسته به اندوتلیال می‌گردد (۴). در قلب Rat مبتلا به دیابت، بیان نشانگرهای التهابی و پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی شامل TNF-α، Interleukin-6 (IL-6) و NF-κB افزایش می‌یابد (۵).

به عنوان اولین پاسخ به آسیب میوکارد قلب، سیگنال های التهابی فعال می‌شوند. گام‌های بعدی، شامل افزایش فعال‌سازی NF-κB و بیان سیتوکین‌های مربوط به آن شامل TNF-α، اینترلوکین‌ها و کموکاین‌ها و مولکول‌های چسبنده می‌باشد (۶). پیشرفت مزمن هیپرتروفی، فیبروز و اختلال عملکرد بطنی با افزایش موضعی در سیتوکین‌ها و فعال شدن NF-κB ادامه می یابد (۷). TNF-α، یک مولکول کلیدی در مقاومت انسولین است و در پاتوژنز آترواسکلروزیس و حمله‌ی قلبی نقش دارد. افزایش سطوح TNF-α، می‌تواند پیش‌بینی کننده‌ی اختلال عملکرد اندوتلیال و آترواسکلروزیس به دنبال آن باشد (۴). فعال سازی NF-κB، سبب رشد کاردیومایوسیت‌ها و بالا بردن ژن‌های سارکومری جنین می‌شود؛ در حالی که مهار آن، باعث کاهش رشد قلب در In vivo می‌گردد (۸). فعال شدن NF-κB، با افزایش آزادسازی سیتوکین ها مانند TNF-α و IL-6 همراه است که اغلب در آسیب قلبی (هیپرتروفی و فیبروز) و اختلال عملکرد بطن چپ دخیل هستند (۷). به نظر می‌رسد که شدت ورزشی، یکی از عوامل درگیر در بهبود مقاومت به انسولین باشد که باید در تجویز برنامه‌ی ورزشی مد نظر قرار گیرد. از سوی دیگر، ماهیت فعالیت (تناوبی یا تداومی) نیز می‌تواند به عنوان عامل اثرگذار محسوب شود. فرایند اختلال فیزیولوژیکی کاردیومیوپاتی با آپوپتوز، هایپرتروفی و فیبروز قلبی در ارتباط است. عوامل متعدد سبب ایجاد و پیشرفت کاردیومیوپاتی می‌شوند که عبارت از هایپرگلیسمی، مقاومت انسولینی، افزایش متابولیسم چربی، اختلال سمپاتیک، تغییرات ریز مولکولی، التهاب عضله‌ی قلبی، تغییر شکل و فیبروز می‌باشند. غلظت بالای گلوکز و چربی به طور مستقیم باعث ترشح سیتوکین‌ها و چسبندگی مولکولی در سلول های قلب می‌شود که با تعدیل مسیرهای مختلف سیگنالینگ مانند NF-κB همراه است (۹).

مسیر NF-κB که یکی از مهم‌ترین واسطه‌های فرایند التهابی است، با افزایش آزادسازی سیتوکین‌هایی نظیر TNF-α همراه است که اغلب در آسیب های قلبی دخالت دارد و باعث افزایش اختلالات فیزیولوژیکی قلبی شامل هیپرتروفی و فیبروز می شود (۹). در یک مدل حیوانی، از T2DM، تمرین هوازی منظم Rat، نه تنها توانست قند خون را کنترل کند و دیس‌لیپیدمی را کاهش دهد، بلکه به ارتقای اثر ضد التهابی کمک کرد که در کاهش سیتوکین های التهابی TNF-α و افزایش سطح آدیپونکتین مشاهده شد (۷).

التهاب در کاردیومیوپاتی دیابتی ایجاد می‌شود و ورزش هوازی، موجب بهبود NF-κB در بیماران کاردیومیوپاتی دیابتی می‌شود (۱۰). این پژوهش، برای پیش گیری از ابتلا به این بیماری و کاهش هزینه‌های درمانی آن‌ها در افراد جامعه حایز اهمیت می‌باشد. این پژوهش، با هدف بررسی اثر دو مدل تمرین RT و تناوبی شدید بر بیان ژن NF-κB در Ratهای نر مبتلا به دیابت و پاسخ به این سؤال که «آیا فعالیت ورزشی RT و تناوبی شدید می‌تواند با تغییر بیان ژن مسیر کاردیومیوپاتی دیابتی بر روند کاهش این بیماری تأثیر بگذارد؟»، انجام شد.

روش‌ها

برای کار با حیوان از ضوابط اخلاقی نگهداری و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی کشور استرالیا استفاده شد و در تمامی مراحل کار، همواره این موارد مد نظر پژوهشگران بود. ضمن این که طرح مطالعه‌ی حاضر در کمیته‌ی اخلاق پژوهشکده‌ی تربیت بدنی با شماره‌ی IR.SSRI.REC.1397.305 ثبت گردید.

جامعه‌ی آماری پژوهش حاضر، شامل کلیه‌ی Ratهای مرکز تحقیقاتی انیستیتو پاستور ایران بود که از بین آن‌ها، ۷۲ سر Rat نر ۶ هفته‌ای با وزن ۱۰ ± ۱۵۰ گرم خریداری شدند. تمام Ratها در شرایط کنترل شده‌ی محیطی با دمای ۱ ± ۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۳ ± ۵۸ درصد و چرخه‌ی شبانه‌روزی ۱۲:۱۲ (ساعت روشنایی و تاریکی) نگهداری شدند. Ratها بعد از دو هفته آشناسازی با محیط آزمایشگاه، به طور تصادفی به ۶ گروه ۱۲تایی شامل موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت (n = ۱۲)، شاهد (n = ۱۲)، تمرین تناوبی شدید (High-intensity interval training یا HIIT) (n = ۱۲)، مبتلا به دیابت با تمرین تناوبی شدید (Diabetic + intensity interval training یا DIIT) (n = ۱۲)، مبتلا به دیابت با تمرین مقاومتی شدید (Diabetic + resistance training یا DRT) (n = ۱۲) و تمرین

مقاومتی (Resistance training یا RT) (n = ۱۲) تقسیم شدند و به صورت ۴تایی در قفس‌های نوع ۳ مخصوص جوندگان نگهداری شدند. برای رعایت نظافت قفس حیوانات، از پوشال استریل که از مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه شده بود، استفاده گردید. تحقیق حاضر، از نوع تجربی توسعه‌ای بود.

موش‌های صحرایی گروه مبتلا به دیابت، جهت اعمال چاقی ۴ هفته تحت رژیم غذایی پرچرب شامل ۲۲ درصد چربی، ۴۸ درصد کربوهیدرات و ۲۰ درصد پروتئین قرار گرفتند تا چاق شوند (۱۱). جهت القای دیابت نیز یک هفته قبل از شروع تمرین، از تک‌دز استرپتوزوتوسین به میزان ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن و به صورت تزریق داخل صفاقی استفاده شد (۱۲). ۴۸ ساعت بعد از تزریق، جهت اطمینان از ایجاد دیابت در Rat ها، از ورید دمی خون گرفته شد و میزان قند خون توسط دستگاه گلوکومتر تعیین شد. قند خون بالای ۲۵۰ میلی‌گرم/دسی‌لیتر به عنوان شاخص مبتلا شدن به دیابت در نظر گرفته شد (۱۳). در پژوهش حاضر، به صورت دو هفته یک‌بار برای اطمینان، مقدار قند خون کنترل می‌شد.

تمرین تناوبی شدید: برنامه‌ی تمرینی تناوبی شدید (جدول ۱) با استفاده از نوار گردان اجرا شد. جهت آشناسازی با روش تمرینی، Ratها با شدت ۵۰-۳۰ درصد بیشینه‌ی اکسیژن مصرفی (روز اول ۳۰، روز دوم ۴۰ و روز سوم ۵۰ درصد) و تعداد ۸-۶ تکرار ۱ دقیقه‌ای (روز اول ۶، روز دوم ۷ و روز سوم ۸ تکرار) به همراه ۲ دقیقه استراحت غیر فعال، برای ۳ روز تمرین کردند و بلافاصله پس از آن وارد برنامه‌ی تمرینی شدند. بر اساس پژوهش Songstad و همکاران، میزان برآورد دقیق بیشینه‌ی اکسیژن مصرفی با توجه به عدم دسترسی به ابزار مستقیم نظیر دستگاه تجزیه و تحلیل گازهای تنفسی انجام شد. برای گرم کردن، قبل از شروع تمرین در هر روز Rat ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۵ متر/دقیقه بر روی نوار گردان می‌دویدند. برنامه‌ی HIIT، در ۶ هفته‌ی ۳ جلسه‌ای، با ۱۰ تناوب ۱ دقیقه‌ای و ۲ دقیقه استراحت صورت گرفت. سرعت نوار گردان در طول دوره از ۱۸ به ۳۱ و شیب نوار گردان به صورت فزاینده از ۲ تا ۱۰ افزایش می‌یافت (۱۴).

آزمون عملکردی زمان رسیدن به وامانندگی: پس از آخرین جلسه‌ی تمرینی، ابتدا موش های صحرایی به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۲ متر/دقیقه بر روی نوار گردان شروع به گرم کردن کردند. سپس، آزمون با سرعت ۱۰ متر/دقیقه شروع و هر ۲ دقیقه، ۲ متر/دقیقه به سرعت نوار گردان اضافه شد و این روند، تا جایی ادامه پیدا کرد که موش‌ها دیگر قادر به دویدن نباشند. سرعت به دست آمده برای هر موش، ثبت و به عنوان رکورد در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است در ابتدای پژوهش، پس از آشنایی موش های صحرایی با نوار گردان و شیوه نامه‌ی فعالیت ورزشی نیز یک آزمون عملکردی برای ثبت میزان توانایی هر موش برای دویدن، از آن گرفته شد. در آزمون عملکردی، بیشینه‌ی زمان دویدن و مسافت پیموده شده‌ی موش‌ها مد نظر می‌باشد (۱۵).

تمرین مقاومتی فزاینده: در برنامه‌ی تمرین RT (جدول ۲)، Ratها برای آشناسازی با نردبان، ۳ جلسه بدون وزنه و با کیسه‌ی خالی ۸ گرمی تمرین داده شدند. برنامه‌ی تمرینی شامل ۶ هفته‌ی ۳ جلسه‌ای بود. هر جلسه، وزنه‌هایی به ترتیب ۵۰، ۷۵، ۹۰ و ۱۰۰ درصد وزن بدن حیوان، به دم آن‌ها بسته شد و تمرین شامل بالا رفتن از نردبان عمودی به طول ۱۱۰ سانتی‌متر با فاصله‌ی پله‌های ۲ سانتی‌متر و زاویه‌ی ۸۵ درجه بود. پس از اتمام موفقیت آمیز تمرین، ۳۰ گرم به وزنه ها اضافه می‌شد تا جایی که Ratها نتوانند به طور کامل نردبان را طی کنند (۱۶).

آزمون عملکردی قدرت مچ دست Rat (Hand grip test):

آزمون قدرت‌سنج مچ دست به عنوان آزمون عملکردی در Ratها برای تعیین میزان کسب قدرت استفاده شد. میانگین سه مرتبه تکرار استفاده شد. قدرت مچ دست یا قدرت چنگ زدن ساعد با استفاده از یک قدرت‌سنج اندازه‌گیری شد. از ابتدای دم Ratها برای بلند کردن آن‌ها استفاده شد و به آن‌ها اجازه داده شد تا با قسمت جلویی دست خود به ذوزنقه چنگ بزنند. در طول آزمون، Ratها از سمت قدرت‌سنج به عقب کشیده می‌شدند و حرکت آن‌ها در حالی که بدن آن‌ها به طور موازی با زمین قرار دارد، ثابت می‌شد. میانگین‌های قدرت دست برای هر Rat از ۱۰ بار امتحان مشتق شد (۱۷).

جدول ۱. برنامه‌ی High-intensity interval training (HIIT)

هفته	سرعت (متر/دقیقه)	مدت (دقیقه)	استراحت (دقیقه)	ست	جلسه (در هفته)	شیب	شدت (vO2max)
۱	۱۸-۲۰	۱	۲	۱۰	۳	۲	۵۰-۶۰ درصد
۲	۲۲-۲۴	۱	۲	۱۰	۳	۴	۶۵-۷۵ درصد
۳	۲۴-۲۶	۱	۲	۱۰	۳	۶	۷۵-۸۵ درصد
۴	۲۶-۲۷	۱	۲	۱۰	۳	۸	۸۵-۹۰ درصد
۵	۲۷-۲۹	۱	۲	۱۰	۳	۱۰	۹۰-۱۰۰ درصد
۶	۲۹-۳۱	۱	۲	۱۰	۳	۱۰	۱۰۰-۱۱۰ درصد

نمونه گیری: متغیرهای وابسته‌ی پژوهش NF-κB از بافت قلب و TNF-α از سرم خونی هستند. در پایان هفته‌ی ششم، خون گیری انجام شد و بیهوشی توسط تزریق ۱/۰ میلی‌گرم از مخلوط کتامین- زایلوزین به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن (۱۰ میلی‌گرم کتامین + ۱/۵ میلی‌گرم زایلوزین) انجام گردید. سپس، به سرعت خون با یک سرنگ از داخل قلب گرفته و قلب بیرون آورده شد تا Ratها معدوم گردند. بطن راست و چپ، بعد از جداسازی، در ترازوی با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم وزن‌کشی و بلافاصله به درون مایع ازت وارد شد. آن گاه، در فریزر با دمای ۸۰- درجه ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس، NF-κB بافت عضلانی قلب در آزمایشگاه دانشگاه شهید بهشتی مورد بررسی قرار گرفت و سرم خون برای بررسی TNF-α به آزمایشگاه پاتولوژی منتقل شد.

سنجش متغیرها

اندازه‌گیری TNF-α سرم: مقدار سطوح TNF-α سرمی با استفاده از روش Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) و کیت تخصصی (ZellBio, GmbH, and Veltlinerweg, Germany) با حساسیت ۱۵ پیکوگرم/میلی‌لیتر و محدوده‌ی استاندارد ۶/۱ درصد اندازه‌گیری شد. کد کیت مورد استفاده عبارت از 1x96 tests: 865.000.096 ،1x48 tests: 865.000.048 و 2x96 tests: 865.000.192 بود.

اندازه‌گیری ژن NF-κB: RNA کل با استفاده از کیت ترایزول (Trizol) استخراج گردید. نمونه‌های ذخیره شده در فریزر در هاون سرد ریخته و به کمک نیتروژن مایع کوبیده شد تا به حالت پودری درآید. آغازگرهای انتخابی برای ژن های آغازگر رفت و برگشتی، به کمک نرم‌افزار Primer3 و بر اساس توالی کد کننده‌ی ژن‌ها (Certificate of deposit یا CDS) طراحی شدند (جدول ۲). بر اساس طول آغازگر، شاخص های طراحی آن، تعداد ۲۵-۲۰ نوکلئوتید، نقطه‌ی ذوب ۶۵-۵۸ درجه‌ی سانتی‌گراد، درصد GC ۶۰-۴۰ و طول قطعه‌ی قابل تکثیر بین ۱۵۰-۶۰ نوکلئوتید در نظر گرفته شد. توالی آغازگرهای طراحی شده، جهت ساخت به شرکت سیناکلون ارجاع داده شدند. کمیت‌سنجی بیان ژن به روش Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (QRT-PCR) به صورت Relative انجام گرفت. پس از اندازه گیری میزان Ct برای ژن‌های مورد مطالعه، کارایی PCR با استفاده از نرم‌افزار LinRegPCR (Ruijter et al.2009) تعیین شد. مقدار سطوح TNF-α سرمی با استفاده از روش ELISA و کیت تخصصی (ZellBio, GmbH, and Veltlinerweg, Germany) با حساسیت ۱۵ پیکوگرم/میلی‌لیتر و محدوده‌ی استاندارد ۶/۱ درصد اندازه‌گیری شد. پرایمر NFκB با کد دسترسی NM_001107754 و توالی Forward (رفت) CGCCAAAATGGAAACGCAGA و توالی برگشت (Reverse) TGCTTCCATCTCGGCAACT مورد استفاده قرار گرفت.

برای دسته‌بندی داده‌های خام و تنظیم جدول‌ها، آمار توصیفی؛ برای تنظیم شکل‌ها و انجام محاسبات، داده‌های بیان ژن NF-κB و بررسی TNF-α، نرم‌افزار Excel؛ برای کارهای آزمایشگاهی و تحلیل بیان ژن، MSTATC نسخه‌ی ۱۹ برای آزمون‌های آماری، نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۱ (version 21, IBM Corporation, Armonk, NY) و برای ترسیم اشکال، Graph pad prism نسخه‌ی ۶ استفاده گردید. پس از به دست آمدن نسبت بیان ژن های مورد مطالعه، جهت بررسی صحت فرض های تجزیه و واریانس، آزمون طبیعی بودن توزیع خطاهای آزمایشی با استفاده از نرم‌افزار MSTATC و آزمون Bartlett انجام شد. از روش $2^{-CT\Delta\Delta}$ برای محاسبه‌ی میزان افزایش یا کاهش بیان ژن هدف در گروه‌های تمرین نسبت به گروه شاهد استفاده گردید. از آزمون Fisher's exact و MANOVA با سطح معنی‌داری $P < ۰/۰۱۰$ برای تعیین معنی‌داری فرض صفر استفاده شد. همچنین، از آزمون تعقیبی Tukey استفاده گردید.

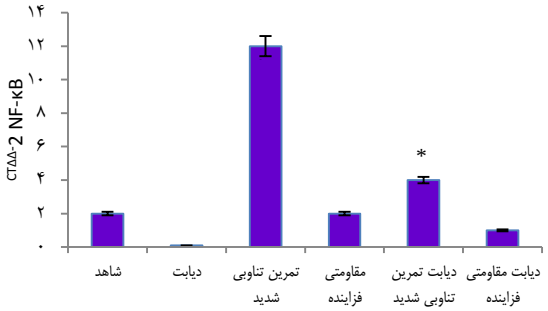
جدول ۲. برنامه‌ی تمرین مقاومتی

آشناسازی با نردبان مقاومتی و محیط آزمایشگاه	آزمون عملکردی Pre-test	آغاز شیوه‌نامه و آزمون 1RM	هفته						آزمون عملکردی	آزمون تحمل قند خون و تغییرات انسولین	نمونه گیری
			اول	دوم	سوم	چهارم	پنجم	ششم			
		چهار صعود به ازای ۵۰، ۷۵، ۹۰ و ۱۰۰ درصد به عنوان ظرفیت حمل بیشینه (در هر جلسه تمرین)، اضافه نمودن ۳۰ گرم در صورت صعود موفقیت‌آمیز (۱۰۰ درصد + ۳۰، ۶۰، ۱۲۰، ۱۵۰ و ۱۸۰ گرم)، بیشترین بار حمل شده در هر جلسه ملاک حمل بیشینه در آن جلسه‌ی تمرینی بود.									
نردبان با شیب ۸۵ درجه به طول ۱۱۰ سانتی‌متر ۹-۴ صعود، ۱ دقیقه استراحت بالای نردبان و ۳ جلسه در هفته شیوه‌نامه‌ی تمرین مقاومتی فزاینده طراحی شد.											

1RM: One-repetition maximum

یافته‌ها

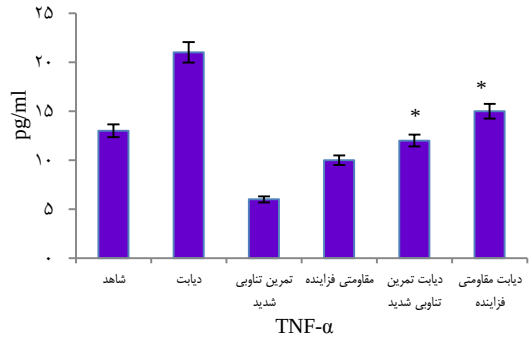
نتایج آزمون $2^{-CT\Delta\Delta}$ مشاهدات این پژوهش نشان می‌دهد بیان NF-κB پس از هر دو نوع تمرین RT و HIIT (شکل ۱)، به ویژه در گروه HIIT، افزایش می‌یابد.



شکل ۱. نتایج حاصل از $2^{-CT\Delta\Delta}$ بیان ژن Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB) در گروه‌ها

* سطح معنی‌داری بین گروه مبتلا به دیابت و مبتلا به دیابت با تمرین تناوبی شدید (P = ۰/۰۰۰۱۱۲) و گروه مبتلا به دیابت و مبتلا به دیابت با تمرین مقاومتی (P = ۰/۰۰۰۰۳۱) مشاهده شد.

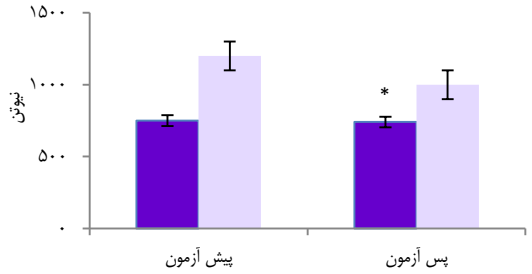
نتایج آزمون ANOVA در مورد مقادیر سرمی TNF-α نشان داد گروه مبتلا به دیابت، بیشترین مقدار و گروه شاهد نیز میزان به نسبت بالایی از آن را دارشتند، اما در تمام گروه‌های تمرینی این میزان به طور معنی‌داری کاهش یافت. این کاهش در گروه غیر مبتلا به دیابت، محسوس‌تر از گروه مبتلا به دیابت بود (شکل ۲). HIIT (P < ۰/۰۰۱) و RT (P < ۰/۰۰۲) بر تغییرات TNF-α عضله‌ی قلبی در موش‌های نر مبتلا به دیابت تأثیر معنی‌داری داشت.



شکل ۲. نتایج Tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) در گروه‌های پژوهش

* سطح معنی‌داری بین دو گروه تمرین تناوبی شدید و مبتلا به دیابت با تمرین تناوبی شدید (P = ۰/۰۰۳) و دو گروه تمرین مقاومتی و مبتلا به دیابت با تمرین مقاومتی شدید (P < ۰/۰۰۱) مشاهده می‌شود.

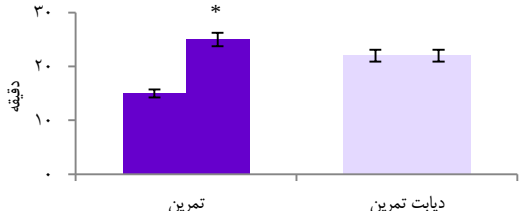
بر اساس نتایج آزمون ANOVA، قدرت مچ دست با تمرینات RT، در هر دو گروه مبتلا و غیر مبتلا به دیابت افزایش معنی‌داری نشان داد (شکل ۳).



شکل ۳. نتایج آزمون عملکردی قدرت مچ دست در گروه‌های تمرین مقاومتی

* سطح معنی‌داری بین پیش‌آزمون و پس‌آزمون گروه مبتلا به دیابت با تمرین مقاومتی (P < ۰/۰۰۱) و تمرین مقاومتی (P = ۰/۰۰۱) مشاهده می‌شود.

همچنین، نتایج آزمون ANOVA نشان داد زمان رسیدن به درماندگی نیز با HIIT، در گروه غیر مبتلا به دیابت افزایش معنی‌داری یافت، اما در گروه مبتلا به دیابت، تفاوت خاصی مشاهده نشد.



شکل ۴. نتایج آزمون عملکردی زمان رسیدن به درماندگی در گروه‌های تمرینی تناوبی

* بین دو گروه تمرین تناوبی شدید و مبتلا به دیابت با تمرین تناوبی شدید (P = ۰/۰۱۴) تفاوت معنی‌داری مشاهده می‌شود.

بحث

در پژوهش حاضر، به تأثیر دو شیوه‌ی HIIT و RT بر میزان بیان ژن NF-κB در بافت قلب و میزان سرمی TNF-α در موش های صحرایی نر مبتلا به دیابت پرداخته و مشاهده شد که بیان ژن NF-κB در گروه‌های مبتلا به دیابت، کاهش معنی‌داری یافته و در گروه HIIT افزایش بیشتری نسبت به گروه RT داشته است. همچنین، تمرینات HIIT و RT، موجب کاهش TNF-α شده و این کاهش، در گروه HIIT، بیشتر از گروه RT بوده است. قدرت مچ دست با تمرینات RT، در هر دو گروه مبتلا و غیر مبتلا به دیابت، افزایش معنی‌داری یافته است. زمان رسیدن به درماندگی با HIIT نیز در گروه غیر مبتلا به دیابت، افزایش معنی‌داری پیدا کرد، اما در گروه مبتلا به دیابت، تفاوت خاصی مشاهده نشد.

در مطالعه‌ی پیشین، تقی‌بیگی حسین‌آبادی و همکاران، در بررسی ۸ هفته تمرین هوازی بر میزان بیان ژن‌های Toll-like receptor 4 (TLR4) و NF-κB در بافت قلبی موش‌های صحرایی نر دچار هایپرگلیسمی، کاهش NF-κB در گروه دیابت تمرین نسبت به گروه شاهد را گزارش کرد (۱۰) که با یافته‌های پژوهش حاضر مغایرت دارد. این تفاوت می‌تواند به دلیل شدت و مدت زمان تمرین باشد. Lorenzo و همکاران، نقش مهم NF-κB را در کاردیومیوپاتی دیابتی بررسی و عنوان کردند فعال‌سازی NF-κB در نارسایی احتقانی قلب دخالت دارد و موجب فعال شدن مسیرهای پیام رسانی پاتوژنز قلبی نظیر پروتئین کیناز C، میتوژن فعال کننده‌ی پروتئین کیناز، فسفوتیدیل اینوزیتول ۳ کیناز و ... می‌شود که با عوارض قلبی همراه است. مسیرهای پاتوژنز قلبی هر یک به طور جداگانه می‌توانند منجر به فعال شدن عامل NF-κB شوند که در نهایت، با افزایش بیان ژن‌هایی نظیر Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1)، Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM1) و Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE)، همراه است (۱۸). بررسی‌ها نشان داده است، مسیرهای ۳ عامل رونویسی مهم NF-κB، Activator protein 1 (AP-1) و Interferon regulatory factor 3 (IRF3)، حداقل در بخشی توسط TLR4 کنترل می‌شوند. TLR4 که به تازگی به عنوان عامل کلیدی درگیر در پاسخ های التهابی به ورزش مورد توجه قرار گرفته است، مراحلی از فعال‌سازی NF-κB را به واسطه‌ی Tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 6 (TRAF6) انجام می دهد (۱۹) و همچنین، تمرین با شدت فزاینده قادر است بیان ژن NF-κB را در عضله‌ی قلب افزایش دهد.

طبق نتایج پژوهش Balan و Locke، که همسو با یافته‌های پژوهش حاضر است، احتمال می‌رود ورزش از طریق P50 و P65، فعالیت NF-κB را در بافت قلب افزایش دهد (۲۰). پژوهش Perkins، همسو با پژوهش حاضر، بیان می کند که احتمال دارد که افزایش NF-κB ناشی از ورزش، نشان دهنده ی یک پاسخ اولیه به آشفتگی هموستاز سلولی باشد. با این حال، با توجه به طیف گسترده‌ای از فرایندهای واسطه ی NF-κB، پاسخ به مفید بودن یا نبودن فعال سازی NF-κB در فرایندهای سازگاری میوکارد دشوار است (۲۱).

هر دو نوع تمرین HIIT و RT، میزان TNF-α را کاهش داد. این کاهش، در گروه HIIT بیشتر بود. نتایج مطالعات در این مورد، اغلب مشابه است. Cavalcante و همکاران، در یک مقاله ی مروری، با بررسی ۳۹ مقاله دریافتند که با تمرین حاد مقاومتی، به طور کلی سیتوکین‌های پیش‌التهابی کاهش یافته است (۲۲). این یافته، نشان می‌دهد رژیم غذایی پر چرب، باعث افزایش سیتوکین‌های پیش‌التهابی می‌شود (۲۳).

پژوهش حاضر، نشان می‌دهد که هر دو تمرین، تأثیر معنی‌داری در کاهش میزان TNF-α سرمی در Ratهای مبتلابه دیابت دارد که در گروه تناوبی شدید مشهودتر است. تمرین ورزشی، اثرات ضد التهابی دارد و موجب سرکوب التهاب سیستمی می گردد. نتایج تحقیقات نشان می دهد ویژگی های برنامه‌ی تمرینی نظیر شدت و مدت فعالیت، نوع برنامه و طول دوره‌ی تمرینی، می توانند در تغییرات TNF-α مؤثر باشند.

نتیجه‌گیری

هر دو نوع تمرین، باعث کاهش عامل التهابی TNF-α می شوند و HIIT، موجب کاهش بیشتری در آن می‌شود. بنابراین، HIIT و نیز RT می توانند نقش مهمی در کاهش این عامل التهابی، در شرایط استرس متابولیک، اکسیداتیو و التهابی دیابت، به ویژه در قلب Rat مبتلا به دیابت داشته باشند.

هر دو تمرین باعث افزایش NF-κB شد که این افزایش، در گروه تمرینی بدون دیابت بیشتر بود. با توجه به نتایج مقالات دیگر، انتظار می رفت با تمرین، واسطه‌ی التهابی NF-κB کاهش یابد. به نظر می‌رسد ۶ هفته تمرین برای کاهش بیان ژن NF-κB کافی نباشد و به زمان بیشتری برای سازگاری و کاهش نیاز است. همچنین، شدت تمرین مورد پژوهش، می‌تواند عامل مهمی برای بیان ژن باشد. بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر و بررسی دو روش تمرینی انجام شده، می‌توان به این نتیجه رسید که شدت و روش تمرین بسیار مهم است و باید برای کمک به حال بیمار، به تمام عوامل تمرین توجه کرد.

تشکر و قدردانی

از زحمات کارشناسان آزمایشگاه سلولی و مولکولی دانشگاه شهید بهشتی و آزمایشگاه حیوان دانشگاه خوارزمی، سپاسگزاری می شود. این مقاله، برگرفته از پایان‌نامه‌ی مقطع دکتری در رشته‌ی فیزیولوژی ورزشی گرایش قلب و عروق دانشگاه خوارزمی است. این طرح در کمیته‌ی اخلاق پژوهشکده‌ی تربیت بدنی و علوم ورزشی به شماره‌ی IR.SSRI.REC.1397.305 ثبت گردیده است. تألیف این مقاله هیچ گونه منافع متقابلی برای نویسندگان ندارد و بدون حمایت مالی بوده است.

References

1. Zimering M. Recent advances in the pathogenesis, prevention and management of type 2 diabetes and its complications. IntechOpen [Online]. [cited 2011 Aug 29]; Available from: URL: https://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-the-pathogenesis-prevention-and-management-of-type-2-diabetes-and-its-complications
2. Trachanas K, Sideris S, Aggeli C, Poulidakis E, Gatzoulis K, Tousoulis D, et al. Diabetic cardiomyopathy: from pathophysiology to treatment. Hellenic J Cardiol 2014; 55(5): 411-21.
3. Matsukura S, Kokubu F, Kurokawa M, Kawaguchi M, Ieki K, Kuga H, et al. Synthetic double-stranded RNA induces multiple genes related to inflammation through Toll-like receptor 3 depending on NF-kappaB and/or IRF-3 in airway epithelial cells. Clin Exp Allergy 2006; 36(8): 1049-62.
4. Pedersen BK. Anti-inflammatory effects of exercise: Role in diabetes and cardiovascular disease. Eur J Clin Invest 2017; 47(8): 600-11.
5. Feng B, Chen S, Gordon AD, Chakrabarti S. miR-146a mediates inflammatory changes and fibrosis in the heart in diabetes. J Mol Cell Cardiol 2017; 105: 70-6.
6. Fuentes-Antras J, Ioan AM, Tunon J, Egido J, Lorenzo O. Activation of toll-like receptors and inflammasome complexes in the diabetic cardiomyopathy-associated inflammation. Int J Endocrinol 2014; 2014: 847827.
7. Nunes S, Rolo AP, Palmeira CM, Reis F. Diabetic cardiomyopathy: Focus on oxidative stress, mitochondrial dysfunction and inflammation, cardiomyopathies - types and treatments. IntechOpen [Online]. [cite 2017 Apr 12]; Available from: URL: https://www.intechopen.com/books/cardiomyopathies-types-and-treatments/diabetic-cardiomyopathy-focus-on-oxidative-stress-mitochondrial-dysfunction-and-inflammation
8. Frati G, Schirone L, Chimenti I, Yee D, Biondi-Zoccai G, Volpe M, et al. An overview of the inflammatory signalling mechanisms in the myocardium underlying the development of diabetic cardiomyopathy. Cardiovasc Res 2017; 113(4): 378-88.
9. Soltanian Z, Vanaky B, Ramezani Fard N, Shakeri N, Shams Z, Fakhari Rad F. Effect of eight weeks resistance training on gene expression of TNF-α and IL10 in the heart of type ii diabetic male rats. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2019; 27(6): 1656-67. [In Persian].
10. Taghibeigi Hoseinabadi H, Esfarjani F, Marandi M, Karami H. Effects of eight weeks of aerobic training on expression levels of the HMGB1-RAGE/TLR4-NF-kB proinflammatory pathway in cardiac tissue of male rats with hyperglycemia. Iran J Endocrinol Metab 2019; 20(5): 246-52. [In Persian].
11. Zhang M, Lv XY, Li J, Xu ZG, Chen L. The characterization of high-fat diet and multiple low-dose streptozotocin induced type 2 diabetes rat model. Exp Diabetes Res 2008; 2008: 704045.
12. Rajasekar R, Manokaran K, Rajasekaran N, Duraisamy G, Kanakasabapathi D. Effect of Alpinia calcarata on glucose uptake in diabetic rats-an in vitro and in vivo model. J Diabetes Metab Disord 2014; 13(1): 33.
13. Calcutt NA. Modeling diabetic sensory neuropathy in rats. Methods Mol Med 2004; 99: 55-65.
14. Songstad NT, Kaspersen KH, Hafstad AD, Basnet P, Ytrehus K, Acharya G. Effects of high intensity interval training on pregnant rats, and the placenta, heart and liver of their fetuses. PLoS One 2015; 10(11): e0143095.
15. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). Methods 2001; 25(4): 402-8.
16. Gaeini AA, Khaledi N, Fayazmilani R, Ravasi A, Sedghroohi G, Arabkari V. Changes in ACTN3 gene expression and fiber type composition in flexor hallucis longus muscle after eight weeks progressive resistance training in Sprague-Dawley rats. Tehran Univ Med J 2013; 71(1): 37-45. [In Persian].
17. Roemers P, Mazzola PN, De Deyn PP, Bossers WJ, van Heuvelen MJG, van der Zee EA. Burrowing as a novel voluntary strength training method for mice: A comparison of various voluntary strength or resistance exercise methods. J Neurosci Methods 2018; 300: 112-26.
18. Lorenzo O, Picatoste B, Ares-Carrasco S, Ramirez E, Egido J, Tunon J. Potential role of nuclear factor kappaB in diabetic cardiomyopathy. Mediators Inflamm 2011; 2011: 652097.
19. Fernandez-Gonzalo R, De Paz JA, Rodriguez-Miguelez P, Cuevas MJ, Gonzalez-Gallego J. TLR4-mediated blunting of inflammatory responses to eccentric exercise in young women. Mediators Inflamm 2014; 2014: 479395.
20. Balan M, Locke M. Acute exercise activates myocardial nuclear factor kappa B. Cell Stress Chaperones 2011; 16(1): 105-11.
21. Perkins ND. Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. Oncogene 2006; 25(51): 6717-30.
22. Cavalcante PAM, Gregnani MF, Henrique JS, Ornellas FH, Araujo RC. Aerobic but not resistance exercise can induce inflammatory pathways via toll-like 2 and 4: A systematic review. Sports Med Open 2017; 3(1): 42.
23. Lee S, Park Y, Zhang C. Exercise training prevents coronary endothelial dysfunction in type 2 diabetic mice. Am J Biomed Sci 2011; 3(4): 241-52.

DOI: *10.22122/jims.v38i575.13095* *Published by Vesnu Publications*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 38, No. 575, 3rd Week, July 2020**

Received: 23.05.2020 Accepted: 16.06.2020 Published: 19.07.2020

The Effect of Progressive Resistance Training and High-Intensity Interval Training on Cardiac Nuclear Factor-Kappa B Gene Expression and Serum Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF-α) in Male Diabetic Rats

Afsaneh Elahi[1], Neda Khaledi[2], Pejhman Motamedi[2], Hossein Askari[3], Hamid Rajabi[4]

Original Article

Abstract

Background: The most common causes of mortality in patients with diabetes mellitus are cardiovascular disorders; and one of their reasons is inflammatory factors. Given that physical activity can reduce inflammation, the present study aimed to investigate the effects of two types of progressive resistance training (RT) and high-intensity interval training (HIIT) on the expression of nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB) gene and serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) in male diabetic rats.

Methods: In this experimental study, 72 male rats were divided into 6 groups of 12 diabetic rats, control, diabetic + intensity interval training (DIIT), HIIT, diabetic + resistance training (DRT), and RT. Progressive resistance training was performed in 6 week, 3 sessions per week, as climbing a vertical ladder with additional weights of 50%, 75%, 90%, and 100% the body weight of the animals. After successful completion, 30 grams were added to the weights, to the extent that the rats could not carry the ladder. HIIT were also performed at in 6 week, 3 sessions per week, with an intensity of 50% to 110% of the VO_2max. 24 hours after the completion of the training, the hand grip and time to exhaustion functional test was taken, and the animals were autopsied 48 hours after the test. Finally, the expression of NF-κB gene was evaluated using real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) technique and ANOVA statistical test.

Findings: The expression of NF-κB gene in HIIT group increased more than RT group (P = 0.0007), and serum TNF-α decreased significantly after both types of exercise in HIIT group (6/13) which was more obvious.

Conclusion: 6 weeks of HIIT and RT training can play an important role in significantly reducing inflammation, and adapting to strength and endurance.

Keywords: NF-kappa B; TNF-alpha; Resistance training; High-intensity interval training; Heart

Citation: Elahi A, Khaledi N, Motamedi P, Askari H, Rajabi H. **The Effect of Progressive Resistance Training and High-Intensity Interval Training on Cardiac Nuclear Factor-Kappa B Gene Expression and Serum Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF-α) in Male Diabetic Rats.** J Isfahan Med Sch 2020; 38(575): 317-24.

1- PhD Student, Department of Exercise Physiology, School of Physical Education and Sport Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
2- Assistant Professor, Department of Exercise Physiology, School of Physical Education and Sport Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Department of Plant Sciences and Biotechnology, School of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
4- Professor, Department of Exercise Physiology, School of Physical Education and Sport Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
Corresponding Author: Neda Khaledi, Assistant Professor, Department of Exercise Physiology, School of Physical Education and Sport Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran; Email: n.khaledi@khu.ac.ir