

تأثیر تمرین تناوبی با شدت بالا همراه با مصرف پودر اسپیرولینا بر تغییرات بیان ژن مسیر التهاب و آتروفی در عضله‌ی نعلی رت‌های مسن چاق مبتلا به دیابت

مرضیه السادات آذرنیوه^۱، رویا عسکری^۲، امیرحسین حقیقی^۲

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: فعالیت‌های ورزشی، روشی پیشنهادی جهت کاهش التهاب و آتروفی و کنترل بیماری دیابت می‌باشد. اسپیرولینا نیز دارای اثرات ضد التهابی است. هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی تأثیر هشت هفته تمرینات تناوبی با شدت بالا (High-intensity interval training یا HIIT) همراه با مصرف اسپیرولینا، بر تغییرات بیان ژن‌های مسیر التهاب و آتروفی در عضله‌ی نعلی رت‌های مسن چاق مبتلا به دیابت بود.

روش‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی، ۴۰ سر رت نر مسن نژاد ویستار ۲۰ ماهه با میانگین وزنی ۳۲۵-۲۸۰ گرم، پس از خریداری، هشت هفته تحت رژیم پرچرب چاق و پس از آن، با تزریق درون صفاقی ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم استرپتوزوسین (Streptozotocin یا STZ) دیابتی شدند. سپس در پنج گروه مساوی (HIIT، HIIT + مکمل، مکمل، شم و شاهد) به مدت هشت هفته و ۵ جلسه در هفته، به اجرای HIIT روی تردمیل (با شدت ۹۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی) در گروه‌های تمرینی و مصرف اسپیرولینا در روزهای تمرین برای گروه‌های HIIT + مکمل و مکمل (۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) پرداختند. بیان ژن‌ها به روش Real-time polymerase chain reaction (Real time-PCR) اندازه‌گیری شد. داده‌ها با استفاده از آزمون One-way ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: القای دیابت در رت‌های چاق و مسن، موجب افزایش معنی‌داری در بیان ژن‌های Atrogin-1، Fn14، Tweak بین گروه‌های مورد بررسی نسبت به گروه شاهد گردید، اما تمرین و مصرف مکمل این متغیرها را در گروه‌های تمرینی و مکمل نسبت به سایر گروه‌ها به طور معنی‌داری کاهش داد. پس از تمرین، توده‌ی بدنی در گروه‌های HIIT، HIIT + مکمل و مکمل نسبت به گروه‌های شم و شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافت و توده‌ی عضله‌ی نعلی نسبت به گروه شاهد تنها در گروه‌های HIIT + مکمل، به طور معنی‌داری افزایش داشت.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج تحقیق حاضر، ترکیب HIIT + مکمل به عنوان یک روش مؤثر جهت کاهش آتروفی و افزایش سلامت عضلانی در سالمندان مبتلا به دیابت پیشنهاد می‌شود.

واژگان کلیدی: تمرین تناوبی با شدت بالا؛ اسپیرولینا؛ آتروفی؛ Atrogin-1؛ Fn14؛ Tweak؛ موش

ارجاع: آذرنیوه مرضیه السادات، عسکری رویا، حقیقی امیرحسین. تأثیر تمرین تناوبی با شدت بالا همراه با مصرف پودر اسپیرولینا بر تغییرات بیان ژن مسیر التهاب و آتروفی در عضله‌ی نعلی رت‌های مسن چاق مبتلا به دیابت. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۰؛ ۳۹ (۶۵۲): ۹۳۳-۹۲۲.

مقدمه

جمعیت سالمند در ایران و همه‌ی کشورهای جهان رو به افزایش است. از جمله عوارض همراه با سالمندی می‌توان به کاهش سطح فعالیت بدنی و همچنین، کاهش ظرفیت عملکردی ناشی از افزایش سن اشاره کرد که این بی‌حرکی به همراه تغییرات هورمونی (۱) ایجاد شده در افراد سالمند، از عوامل مؤثر بر ازدیاد و تجمع بافت چربی و افزایش شیوع چاقی در این سن می‌باشد (۲). یکی از ویژگی‌های مشخص چاقی، بروز التهاب در درجات پایین است؛ چرا

که ترشح سایتوکاین‌های پیش‌التهابی از بافت چربی، می‌تواند سیگنالینگ انسولین را در بافت‌های هدف انسولین مختل کند و مقاومت انسولین سیستمیک را افزایش دهد که خطر ابتلا به دیابت را افزایش می‌دهد (۲).

سالمندی خود سبب افزایش تحمل نسبت به قند نیز می‌شود که می‌تواند منجر به بروز دیابت گردد (۳). التهاب و استرس اکسیداتیو ناشی از چاقی و دیابت، به عنوان تنظیم‌کننده‌ی اصلی سیگنالینگ سلولی عمل می‌نماید و منجر به افزایش پروتئولیز و آتروفی عضلات

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار و مربی، گروه علوم ورزشی، دانشکده‌ی ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۲- دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: رویا عسکری؛ دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران

Email: r.askari@hsu.ac.ir

می‌شود (۴). آتروفی عضله نتیجه‌ی تعادل منفی بین میزان سنتز پروتئین انقباضی و تخریب آن است. مشخص شده است که التهاب سیستمیک ناشی از چاقی و پرخوری طولانی مدت، نه تنها به ایجاد مقاومت به انسولین در بیماران مبتلا به دیابت کمک می‌کند، بلکه از طریق کاهش سنتز پروتئین عضله و افزایش تخریب آن از سه روش «سیستم لیوزومی، سیستم فعال شده توسط کلسیم سیتوزولی و سیستم یوبی کوئیتین پروتازوم (Ubiquitin proteasome system) یا UPS)، موجب آتروفی عضلانی می‌شود (۵). مطالعات ژنومیک که جهت شناسایی شاخص‌های فرایند آتروفی طراحی شده‌اند، افزایش بیان ژن آتروفی عضلانی F-box (Muscle atrophy F-box gene) یا MAFbx) که به عنوان Atrogin-1 نیز شناخته می‌شود را به طور قابل توجهی در چندین مدل آتروفی عضلانی، شناسایی کرده‌اند (۶).

Tweak به عنوان یک واسطه‌ی التهابی شناخته شده مانند فاکتور نکروز تومور (Tumor necrosis factor یا TNF)، الفاکننده‌ی ضعیف آپوپتوزیس و یک سایتوکاین قدرتمند عضله‌ی اسکلتی است که موجب آتروفی عضلانی می‌شود (۷). Tweak به گیرنده‌ی Fn14 که پروتئین تراغشایی نوع ۱ و عضوی از خانواده‌ی گیرنده‌ی TNF می‌باشد، متصل می‌شود. مشخص شده است که محور Tweak/Fn14 پاسخ‌های فیزیولوژیکی گوناگونی شامل بقای سلول، تکثیر، تمایز، رگ‌زایی، مهاجرت و آپوپتوزیس (Apoptosis) را تنظیم می‌کند (۸). علاوه بر این، گزارش شده است که Tweak سبب فعال شدن فاکتور هسته‌ای تقویت‌کننده‌ی زنجیره‌ی سبک کاپا از سلول‌های B فعال شده Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) یا NF- κ B) از طریق افزایش بیان سایتوکاین‌های پیش‌التهابی، کموکاین‌ها (Chemokine) و اجزای UPS شامل پروتئین حلقه-انگشت عضلانی ۱ (Muscle RING-finger protein-1) یا MuRF1 می‌شود که در آتروفی عضلانی نقش دارند (۹). چاقی و عدم تحرک، شرایط ایجاد دیابت را فراهم می‌کند (۱۰) و همراهی دیابت در کنار کاهش توده‌ی عضلانی مربوط به سن که اغلب با جایگزینی توده‌ی چربی جبران می‌شود (۲) و البته تحریک مسیرهای مشترک سلولی التهاب و آتروفی (۷) در کنار هم، سبب آتروفی سریع‌تر عضلات در سالمندان می‌شود (۲).

التهاب، نقش اساسی در آتروفی عضلات به ویژه در بیماری‌های مزمن از قبیل دیابت دارد (۱۱). یکی از مکانیسم‌های احتمالی در کاهش التهاب، کاهش وزن بدن است که منجر به کاهش سطوح عوامل التهابی همچون C-reactive protein (CRP) و Interleukin 6 (IL-6) در سرم و بافت چربی می‌شود (۱۲). امروزه نقش مثبت فعالیت‌های بدنی و ورزش در سلامت جوامع بشری و در پیشگیری و کنترل بسیاری از بیماری‌ها از جمله بیماری دیابت تأیید شده است

(۶). از طرف دیگر، اثرات سودمند ورزش بر سالمندی و عوارض ناخواسته‌ی همراه با آن به خوبی اثبات شده است (۱۳). فعالیت ورزشی منجر به تعدیل سطوح سایتوکاین‌های التهابی می‌شود و همچنین، به عنوان یک روش کاهش وزن در نظر گرفته می‌شود. انواع مختلف تمرینات ورزشی با کاهش تولید آدیپوسایتوکاین‌ها و رهایش آن‌ها از بافت‌های مختلف، منجر به کاهش سطوح میانجی‌های التهابی در بیماران مبتلا به دیابت می‌شود که تمرین تناوبی با شدت بالا (High-intensity interval training یا HIIT) یکی از آن‌هاست (۱۴).

محرك‌های ناشی از HIIT، موجب ترشح سایتوکاین‌هایی می‌شود که مانند فاکتور رشد عمل می‌کنند و می‌توانند منجر به تحریک هاپیروتروفی عضلانی شوند و شاید در آزمودنی‌های سالمند، از روند آتروفی همراه با بیماری دیابت پیشگیری نماید. مشخص شده است که تمرینات ورزشی دارای اثرات ضد التهاب، ضد استرس اکسیداتیو و ضد آتروفی می‌باشد؛ چرا که چندین شاخص مانند فاکتور رشد شبه انسولین ۱ (Insulin-like growth factor-1 یا IGF-1) و پروتئین‌های شوک گرمایی را تنظیم می‌کند (۴). چنانکه کاهش mRNA Atrogin-1 گزارش شده توسط Mascher و همکاران، با افزایش mRNA MuRF1 بلافاصله پس از ورزش مقاومتی همراه بود (۱۵) و در مطالعه‌ی دیگری، mRNA MuRF1 سه ساعت پس از یک جلسه‌ی HIIT افزایش یافت (۱۶). به طور کلی، یافته‌های متناقضی در مورد تغییرات مربوط به سالمندی در سیستم UPS وجود دارد (۱۹-۱۷). نتایج یک تحقیق که با هدف ارزیابی مسیرهای UPS در رت‌های صحرایی بزرگسال و سالمند انجام گرفت، افزایش محتوای کل پروتئین UPS و افزایش سطح پروتئین MuRF-1 در عضلات سالمندان گزارش گردید؛ در حالی که سطح Atrogin-1 در عضلات سالمندان با کاهش مواجه شده بود (۱۹). Clavel و همکاران نیز افزایش پروتئین‌های UPS و MuRF-1 در رت‌های سالمند را مشاهده کردند، اما افزایش بیان Atrogin-1 را هم گزارش دادند (۱۷). در زمینه‌ی اثرات HIIT بر Tweak و Fn14، Raue و همکاران اطلاعاتی در مورد تنظیم TWEAK/Fn14 پس از ورزش مقاومتی و دوییدن در عضله‌ی اسکلتی سالمند و جوان ارائه نمودند. آن‌ها دریافتند که هر دو نوع ورزش، موجب فعال‌سازی گذرای محور TWEAK/Fn14 می‌شود که نشان دهنده‌ی پاسخ طبیعی و فیزیولوژیک هماهنگ به ورزش است؛ اگرچه به نظر می‌رسد مقدار و مدت زمان فعالیت آن به نوع تمرین وابسته باشد (۲۰). گفته می‌شود که افزایش سن با افزایش بیان ژن‌های Tweak و Fn14 همراه می‌باشد که ممکن است به تغییرات توده‌ی عضلانی همراه با افزایش سن مربوط باشد و با توجه به کاهش بیان این ژن‌ها بر اثر HIIT، این تمرینات احتمالاً در دوران سالمندی به منظور حفظ توده‌ی عضلانی مؤثر باشد (۱۳).

علاوه بر ورزش، رژیم‌های غذایی و مکمل‌ها نیز به عنوان راهی

غذایی پرچرب قرار گرفتند. رت‌ها به ازای ۱۰۰ گرم وزن بدن، روزانه به ۱۰ گرم غذای استاندارد و ۱۵-۱۰ میلی‌لیتر آب نیاز دارند. با این وجود، در تحقیق حاضر، رت‌ها به طور آزادانه به غذای پرچرب محقق‌ساز و آب به اندازه‌ی مورد نیاز دسترسی داشتند (۲۶). پس از این که وزن رت‌ها (50.5 ± 20 گرم) بر اساس شاخص Lee ($Lee\ index$) [$310 \times \text{قد (سانتی‌متر)} / \text{وزن بدن (گرم)} = 37$] = شاخص توده‌ی بدنی] به بیشتر از ۳۱۰ گرم رسید، القای دیابت انجام گرفت. برای این کار، پس از یک دوره‌ی ۱۲ ساعته بی‌غذایی، دیابت با تزریق درون صفاقی استرپتوزوسین (Streptozotocin یا STZ) (Sigma، آلمان) القا شد. بدین منظور، نخست STZ در محلول بافر سدیم سیترات با $pH = 4/5$ حل و به میزان ۴۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به رت‌ها تزریق گردید. پس از گذشت پنج روز، میزان گلوکز خون رت‌ها با استفاده از نمونه‌های خونی جمع‌آوری شده از دم حیوانات به وسیله‌ی گلوکومتر (مدل GL42، Beurer، آلمان) و روش آنزیمی گلوکز اکسیداز اندازه‌گیری شد و چنانچه میزان آن بیشتر از ۳۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود، رت‌ها مبتلا به دیابتی تشخیص داده شدند (۲۷). سپس با ترازوی دیجیتالی (Rat grimace) با دقت 0.0001 گرم وزن‌گیری شدند و به صورت تصادفی بر اساس همسان‌سازی وزن اولیه به پنج گروه ۸ تایی شامل «HIIT + دارونما، HIIT + مکمل، مکمل، شم (شاهد مبتلا به دیابت) و شاهد سالم تقسیم شدند.

تعیین حداکثر اکسیژن مصرفی و پروتکل تمرینی: جهت تعیین حداکثر اکسیژن مصرفی، از آزمون فزاینده‌ی استاندارد Bedford و همکاران استفاده گردید که به وسیله‌ی Rindello و همکاران جهت رت‌های نژاد ویستار استانداردسازی شده است. بدین منظور، ابتدا رت‌ها به مدت یک هفته با تردمیل توسط راه رفتن آرام با سرعت ۵ متر در دقیقه، به مدت ۵ دقیقه طی پنج جلسه آشنا شدند. سپس بر اساس مطالعه‌ی Hoydal و همکاران (۲۸)، هر رت ابتدا به مدت ۱۰ دقیقه با شدت ۱۰ متر در دقیقه مرحله‌ی گرم کردن را سپری کرد. سپس آزمون فزاینده‌ی ورزشی آغاز شد و هر دو دقیقه سرعت تردمیل 0.03 متر در دقیقه به طور خودکار افزایش یافت تا زمانی که رت‌ها قادر به ادامه‌ی فعالیت ورزشی نبودند. فاصله‌ی دویده شده توسط هر رت به عنوان شاخص ظرفیت ورزشی در نظر گرفته شد. پس از برآورد ظرفیت ورزشی و با توجه به رابطه‌ی ۱، مقادیر حداکثر اکسیژن مصرفی محاسبه و شدت تمرینی بر این اساس تنظیم گردید (۲۸). شدت تمرین بر اساس حداکثر اکسیژن مصرفی محاسبه شد. سپس رت‌ها با توجه به سرعت بیشینه‌ی معادل با حداکثر اکسیژن مصرفی مد نظر که به متر در دقیقه تبدیل شد، تمرینات را انجام دادند. سرعت بیشینه در پژوهش حاضر، $3/12 \pm 29/41$ متر در دقیقه به دست آمد

جهت کاهش وزن و عوامل خطر مرتبط با چاقی و دیابت در سال‌های اخیر شناخته شده‌اند (۲۱). مکمل اسپیرولینا (Spirulina supplement) گونه‌ای از علف‌های دریایی متعلق به گروه جلبک‌های سبز-آبی می‌باشد که غنی از آنتی‌اکسیدان‌ها و دارای مواد مغذی مانند فیکوسیانین، کلروفیل، پلی‌ساکاریدها و سولفولیپیدها می‌باشد (۲۲). اسپیرولینا می‌تواند در پیشگیری از دیابت مفید باشد؛ چرا که هم از نظر داشتن کالری پایین است و هم این که حاوی مقادیر زیادی ویتامین B1 می‌باشد که موجب بهبود سوخت و ساز قندها در بدن می‌شود. همچنین، حاوی ویتامین B2 است که با کمک به سوزاندن کالری، مانع چاقی می‌شود و حاوی ویتامین B6 و مؤثر در ساخت هورمون انسولین در بدن است (۲۳). Lee و همکاران پس از ۱۲ هفته مکمل‌دهی اسپیرولینا گزارش کردند که این مکمل بر شاخص‌های چربی خون، متغیرهای التهابی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در بیماران مبتلا به دیابت تأثیر دارد (۲۴). همچنین، عنوان شده است که تمرین هوازی به همراه مصرف مکمل اسپیرولینا، می‌تواند موجب بهبود مقادیر خونی شاخص‌های التهابی در افراد مبتلا به دیابت شود و از التهاب ناشی از ورزش و احتمالاً مقاومت به انسولین جلوگیری کند (۲۵). در مورد اثرات مصرف اسپیرولینا و تمرین در بیماران مبتلا به دیابت، بررسی‌های اندکی و اغلب بر روی متغیرهای گلیسمیک و ضدالتهابی صورت گرفته است (۲۵-۲۴، ۲۱). همچنین، تحقیقات اندکی به بررسی اثرات HIIT بر بیان ژن‌های Atrogin-1 و Tweak، Fn14 و هم با نتایج متفاوت و در آزمودنی‌ها و شرایط متفاوتی (۲۰-۱۷، ۱۳) با پژوهش حاضر پرداخته‌اند. با این حال، بر اساس جستجوی صورت گرفته، تاکنون مطالعه‌ای از تأثیر اسپیرولینا تحت HIIT بر میزان بیان ژن‌های مسبب التهاب و آتروفی Atrogin-1 و Tweak، Fn14 در عضله‌ی نعلی رت‌های مسن چاق مبتلا به دیابت گزارش نشده است. بنابراین، بررسی این موضوع ضروری به نظر رسید.

روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی و کاربردی بود. بدین منظور، ۴۰ سر رت نر مسن نژاد ویستار ۲۰ ماهه با میانگین وزنی ۲۸۰ تا ۳۲۵ گرم خریداری شدند و به محیط آزمایشگاه انتقال یافتند و در شرایط کاملاً استاندارد از نظر دما (22 ± 2 سانتی‌گراد)، رطوبت (۵۰-۴۰ درصد) و روشنایی و تاریکی (۱۲-۱۲ ساعته) قرار گرفتند. در ادامه، جهت چاق کردن رت‌ها، ابتدا غذای استاندارد رت‌ها محاسبه و بر اساس آن، رژیم پرچرب مشتق شده از سویا و روغن گیاهی (غذای پرچرب به منظور افزایش وزن شامل ۴۰ درصد چربی و ۱۷ درصد پروتئین و ۴۳ درصد کربوهیدرات زیر نظر متخصصان دام و طیور) تهیه گردید و مورد استفاده قرار گرفت. رت‌ها به مدت هشت هفته تحت رژیم

سپس با استفاده از ازت مایع منجمد و برای سنجش‌های بعدی به فریزر ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد انتقال یافت و نگهداری شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA و Real-time polymerase chain reaction

Real time-PCR reaction: قبل از ارزیابی نهایی بیان ژن بر اساس دستورالعمل تکنیک Real time-PCR نیاز بود که میزان کارایی ژن رفرنس (Gapdh) برای ژن‌های هدف (Tweak, Fn14, Atrogin1) بررسی شود که این کار صورت گرفت. میزان کارایی برای ژن‌های مذکور در بیشترین مقدار خود یعنی ۱ بود. به منظور استخراج RNA کل از عضله‌ی نعلی، این عضله به نسبت ۱ به ۱۰ در QLAzol Lysis Reagent هموزن گردید. جهت برداشتن اجزای پروتئینی، محصول در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس به نسبت ۱ به ۰/۵ با کلروفورم مخلوط و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. محصول در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و بخش معدنی و آبی از هم جدا گردید. بخش حاوی RNA برداشته شد و با نسبت ۱ به ۰/۵ با ایزوپروپانول مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد و سپس در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. پلیت حاوی RNA در اتانول شستشو و در ۲۰ میکرولیتر آب RNase-Free حل شد. غلظت RNA با استفاده از دستگاه Eppendorf (آلمان) مورد سنجش قرار گرفت و نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ به عنوان تخلیص مطلوب تعریف شد. سنتز cDNA با استفاده از ۱ میکروگرم RNA و با استفاده از کیت سنتز cDNA (Thermo fisher scientific, Fermentas, USA, cat NO: K1621) و آنزیم Mulv Reverse Transcriptase انجام گرفت.

اندازه‌گیری سطوح بیان ژن‌های Atrogin-1 و Fn14، Tweak با استفاده از روش کمی Real time-PCR و با کمک Primix SYBER Green II (USA Applied Biosystems) انجام گرفت. مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر و هر واکنش به صورت جفتی صورت پذیرفت. طراحی پرایمرها بر اساس اطلاعات ژن‌های Tweak, Atrogin-1, Fn14 و Gapdh در بانک ژنی National Center for Biotechnology Information (NCBI) و توسط شرکت ماکروژن (کره‌ی جنوبی) انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۲ ارائه شده است، ضمن این که از Gapdh به عنوان ژن شاهد استفاده گردید. برنامه‌ی دمایی مورد استفاده در روش Real time-PCR شامل ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۹۵- درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه بود و مطابق دستورالعمل در ۴۰ سیکل تکرار شد. میزان بیان ژن‌های مورد نظر نیز با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ اندازه‌گیری گردید.

و بر اساس شدت مورد نظر برای اجرای تمرینات استفاده شد. رابطه‌ی ۱

$$VO_2 \text{ (ml/kg 0.75 Per min) and } x, \text{ running } y, \text{ represents) } y = 162x - 1$$

پس از آشناسازی با محیط نگهداری و نحوه‌ی انجام تمرینات و پایلوت کار، حیوانات به مدت ۸ هفته و هر هفته ۵ جلسه دویدن روی تردمیل را با ۹۰ حداکثر اکسیژن مصرفی به مدت ۳۰ ثانیه انجام دادند. در هفته‌ی اول تمرین مذکور با ۵ تکرار انجام و هر هفته یک تکرار به آن اضافه شد؛ به طوری که تا هفته‌ی هشتم به ۱۲ تکرار رسید. در ابتدا و انتهای هر جلسه‌ی تمرینی، گرم کردن (با شدت ۴۰ تا ۵۰ درصد سرعت پیشینه) و سرد کردن (با شدت ۲۰ تا ۳۰ درصد سرعت پیشینه) هر کدام ۵ دقیقه انجام گرفت و در تمامی هفته‌ها، رت‌ها بین هر تناوب به مدت یک دقیقه استراحت فعال داشتند (جدول ۱) (۲۹، ۲۶). لازم به ذکر است که قبل از شروع پروتکل تمرینی، رت‌ها به مدت یک هفته برنامه‌ی آماده‌سازی همراه با افزایش پیش‌رونده‌ی سرعت تردمیل را داشتند و گروه شاهد در مدت انجام تمرینات هیچ‌گونه فعالیتی نداشت.

جدول ۱. برنامه‌ی تمرین High-intensity interval training

(HIIT) در رت‌های گروه‌های تمرین

هفته	تکرار	سرعت (متر بر دقیقه)	مدت هر تکرار (ثانیه)	زمان تمرین (دقیقه)
اول	۵	۲۶/۱	۳۰	۱۷/۵
دوم	۶	۲۶/۱	۳۰	۱۹/۰
سوم	۷	۲۶/۱	۳۰	۲۰/۵
چهارم	۸	۲۶/۱	۳۰	۲۲/۰
پنجم	۹	۲۶/۱	۳۰	۲۳/۵
ششم	۱۰	۲۶/۱	۳۰	۲۵/۰
هفتم	۱۱	۲۶/۱	۳۰	۲۶/۵
هشتم	۱۲	۲۶/۱	۳۰	۲۸/۰

شیب در تمامی جلسات تمرین صفر بود. گرم کردن و سرد کردن در ابتدای هر جلسه به مدت ۵ دقیقه انجام شد. بین تکرارها، استراحت فعال به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۸۷ متر بر دقیقه انجام شد.

استخراج بافت و پایش‌های بیوشیمیایی: برای از بین بردن آثار حاد

تمرین و متغیرهای غیر قابل کنترل استرس آزمودنی‌ها در زمان اجرای برنامه‌ی تمرینی، نمونه‌برداری‌ها ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه‌ی تمرین و پس از ۸ ساعت ناشتایی انجام شد (۳۰). برای جمع‌آوری نمونه‌ها، ابتدا رت‌ها توسط تزریق درون صفاقی ترکیبی از داروهای زایلازین (۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) و کتامین (۹۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) بیهوش شدند. پس از بیهوشی کامل (به طوری که رت‌ها به تحریک اعمال شده پاسخ ندادند)، عضله‌ی نعلی در شرایط استریل از پای چپ حیوان برداشته و در سرم فیزیولوژیک شستشو داده شد.

جدول ۲. توالی پرایمرهای اختصاصی جهت استفاده در روش (Real time-PCR) Real-time polymerase chain reaction

ژن‌ها	توالی پرایمر	بانک ژن NCBI	طول پرایمر (جفت بازی)
Tweak	F= CCTTCTCAGGAGGCTGAC R= CCTGGCTGTGGATGAACCTC	NM_011614.3	۱۹۱
Fn14	F= CACAGCGACTTCTGCCTGGG R= CTCTCCACCAGTCTCCTCT	NM_001161746.1	۱۸۴
Atrogin-1	F=AGCTTGTGCGATGTTACCCA R=GATGGTCAGTGCCCTTCCAG	NM_026346.3	۹۶
Gapdh	F: GCATCTTCTTGTGCAGTGCC R: GATGGTGATGGGTTCCCGT	NM_007393.4	۲۶۲

NCBI: National Center for Biotechnology Information

توده‌ی بدن، میزان بیان ژن‌های Tweak، Fn14، Atrogin-1 و توده‌ی عضله‌ی نعلی، بیانگر توزیع نرمال و تجانس واریانس‌های تمام متغیرهای مذکور بود. در جدول ۳ تغییرات توده‌ی بدنی رت‌های مورد بررسی در گروه‌های مختلف، پیش و پس از دوره‌ی تمرین ارائه شده است و توده‌ی عضله‌ی نعلی نیز به صورت مطلق و نسبی گزارش گردید. نتایج آزمون برای توده‌ی بدنی، تفاوت معنی‌داری را بین گروه‌های مورد بررسی نشان داد ($P = 0/002$). نتایج آزمون تعقیبی Tukey نیز حاکی از کاهش معنی‌دار توده‌ی بدنی در گروه‌های HIIT و HIIT + مکمل و مکمل نسبت به گروه‌های شاهد و شم ($P = 0/001$) بود که نشان دهنده‌ی اثرگذاری هر دو عامل تمرین و مکمل بر توده‌ی بدن می‌باشد، اما در این میان، گروه HIIT + مکمل کاهش بیشتری را نسبت به گروه شاهد و شم داشت. یافته‌ها در مورد توده‌ی عضله‌ی نعلی حاکی از وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های مختلف بود ($F = 4/242, P = 0/004$) و نتایج آزمون تعقیبی، افزایش معنی‌داری را در گروه‌های HIIT ($P = 0/002$) و HIIT + مکمل ($P = 0/010$) نسبت به گروه شاهد نشان داد و بین سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. نتایج نشان داد که بین سطوح بیان ژن‌های Tweak ($F = 146/54, P = 0/001$)، Fn14 ($F = 53/12, P = 0/001$) و Atrogin-1 ($F = 287/74, P = 0/001$) عضله‌ی نعلی رت‌ها در گروه‌های مختلف، تفاوت معنی‌داری وجود داشت (جدول ۴).

نحوه‌ی مصرف اسپیرولینا و اعمال دارونما: مکمل مورد استفاده بودر جلبک اسپیرولینا از شرکت Microalgae Far East (تایوان) بود که از طریق نمایندگی این شرکت در ایران (شرکت سینا ریزجلبک قشم) تهیه شد. پودر اسپیرولینا در هر جلسه به میزان ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن (۳۱) با محلول نرمال سالیین رقیق شد و سپس این محلول پنج روز در هفته و برای یک دوره‌ی هشت هفته‌ای به صورت گاواژ به حیوانات در گروه‌های مصرف مکمل خوراند. به منظور برقراری شرایط یکسان و کورسازی بین آزمودنی‌ها، در تمامی گروه‌ها غیر از گروه‌های مصرف‌کننده‌ی مکمل، به همان میزان از محلول نرمال سالیین به عنوان دارونما استفاده گردید. از میانگین و انحراف معیار جهت گزارش توصیفی داده‌ها استفاده شد. پس از تأیید طبیعی بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk و بررسی همسان بودن واریانس‌ها به کمک آزمون Levene، به منظور تعیین معنی‌دار بودن تفاوت میانگین متغیرهای گروه‌های تحقیق، از آزمون One-way ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey استفاده گردید. اطلاعات مورد نیاز پس از جمع‌آوری، در نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۳ (version 23, IBM Corporation, Armonk, NY) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. $P < 0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری داده‌ها در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

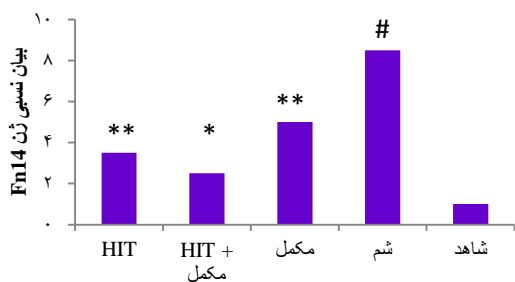
نتایج آزمون‌های Shapiro-Wilk و Levene برای متغیرهای

جدول ۳. میانگین تغییرات توده‌ی بدنی و توده‌ی عضله‌ی نعلی پیش و پس از دوره‌ی تمرین در گروه‌های مورد بررسی

متغیر	گروه			
	شاهد پایه	شاهد سالم	شم + دارونما	مکمل
توده‌ی بدنی (گرم)	۵۰۷/۵۳ ± ۳/۵۹	۵۰۷/۵۴ ± ۷/۰۸	۵۰۷/۶۵ ± ۷/۳۳	۵۰۷/۴۸ ± ۸/۳۰
پیش از تمرین	-	۵۶۹/۲۳ ± ۵/۳۶	۵۶۸/۶۳ ± ۲۶/۵۹	۵۰۱/۳۸ ± ۷/۷۰
پس از تمرین	-	۰/۶۲ ± ۰/۰۴	۰/۶۲ ± ۰/۰۵	۰/۶۴ ± ۰/۰۴
توده‌ی عضله‌ی نعلی (گرم)	۰/۵۶ ± ۰/۰۷	۰/۶۲ ± ۰/۰۴	۰/۶۲ ± ۰/۰۵	۰/۶۴ ± ۰/۰۴
نسبت توده‌ی عضله‌ی نعلی	۰/۱۱	۰/۱۱	۰/۱۱	۰/۱۳
به توده‌ی بدن (درصد)	۰/۱۱	۰/۱۱	۰/۱۱	۰/۱۳

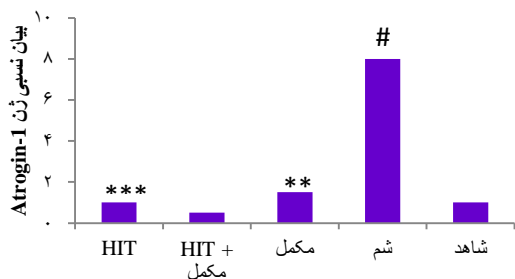
* تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد پایه، ** تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد سالم و شم

نتایج آزمون تعقیبی نشان داد که سطوح بیان ژن Fn14 در گروه HIIT نسبت به گروه‌های شم ($P = 0/001$) و شاهد ($P = 0/001$) کاهش معنی‌داری داشت و با سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. در گروه HIIT + مکمل، کاهش معنی‌داری نسبت به گروه‌های مکمل و شم ($P = 0/001$) گزارش گردید. همچنین، گروه مکمل نسبت به گروه‌های شاهد و شم ($P = 0/001$) کاهش معنی‌داری را نشان داد. علاوه بر این، بین گروه‌های شم و شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ($P = 0/001$) (شکل ۲).



شکل ۲. تغییرات بیان ژن Fn14 عضله نعلی در گروه‌های مورد بررسی
 * تفاوت معنی‌دار با گروه مکمل و شم، ** تفاوت معنی‌دار با گروه شم و شاهد،
 # تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد

شکل ۳ نتایج آزمون تعقیبی Tukey در مورد سطوح بیان ژن Atrogin-1 بین گروه‌های مورد بررسی را نشان می‌دهد که گروه HIIT تنها نسبت به گروه شم به طور معنی‌داری کاهش داشت ($P = 0/001$) و نسبت به سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. گروه HIIT + مکمل کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه‌های مکمل و شم ($P = 0/001$) نشان داد. گروه مکمل تنها نسبت به گروه شم کاهش معنی‌داری داشت ($P = 0/001$). علاوه بر این، در گروه شاهد کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شم مشاهده شد ($P = 0/001$) (شکل ۳).



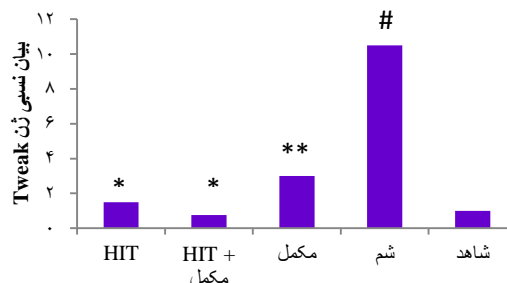
شکل ۳. تغییرات بیان ژن Atrogin-1 عضله نعلی در گروه‌های مورد بررسی
 * تفاوت معنی‌دار با گروه مکمل و شم، ** تفاوت معنی‌دار با گروه شم و شاهد،
 # تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد

جدول ۴. تغییرات بیان نسبی ژن‌های Tweak، Fn14 و Atrogin-1 در گروه‌های مورد بررسی

ژن	گروه	بیان ژن (میانگین ± انحراف معیار)	آماره‌ی F	مقدار P
Tweak	HIIT	2/54 ± 0/71	146/54	0/001
	HIIT + مکمل	1/33 ± 0/61		
	مکمل	5/35 ± 1/45		
	شم	9/17 ± 3/40		
	شاهد	2/02 ± 1/01		
Fn14	HIIT	4/56 ± 0/90	53/12	0/0001
	HIIT + مکمل	2/71 ± 0/72		
	مکمل	6/44 ± 1/42		
	شم	11/43 ± 2/82		
	شاهد	1/17 ± 0/49		
Atrogin-1	HIIT	1/49 ± 0/45	287/74	0/001
	HIIT + مکمل	0/77 ± 0/19		
	مکمل	2/37 ± 0/64		
	شم	11/30 ± 1/33		
	شاهد	1/56 ± 0/59		

HIIT: High-intensity interval training

نتایج آزمون تعقیبی Tukey نشان داد که سطوح بیان ژن Tweak عضله اسکلتی در گروه HIIT نسبت به گروه‌های مکمل ($P = 0/023$) و شم ($P = 0/001$) به طور معنی‌داری کمتر بود اما با سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری نداشت. گروه HIIT + مکمل کاهش معنی‌داری نسبت به گروه‌های مکمل و شم ($P = 0/001$) نشان داد. گروه مکمل نیز نسبت به گروه شاهد ($P = 0/003$) و شم ($P = 0/001$) کاهش معنی‌داری داشت. علاوه بر این، بین گروه شم و شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده گردید ($P = 0/001$) (شکل ۱).



شکل ۱. تغییرات بیان ژن Tweak عضله نعلی در گروه‌های مورد بررسی
 * تفاوت معنی‌دار با گروه مکمل و شم، ** تفاوت معنی‌دار با گروه شم و شاهد،
 # تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد

بحث

هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی اثر هشت هفته HIIT همراه با مصرف اسپیرولینا بر تغییرات بیان ژن‌های مسیر التهاب و آتروفی در عضله‌ی نعلی رت‌های مسن چاق مبتلا به دیابت بود. نتایج نشان داد که سالمندی، چاقی و دیابت، بیان ژن‌های مهم مسیر التهاب و آتروفی شامل *Tweak*، *Fn14* و *Atrogin-1* را به طور معنی‌داری در عضله‌ی نعلی افزایش می‌دهد که بیان‌کننده‌ی شرایط التهاب و آتروفی و خیم در رت‌های مسن و چاق مبتلا به دیابت می‌باشد. نتایج بررسی رت‌های مسن نشان داد که بیان ژن‌های *Tweak* و *Fn14* با پیشرفت سن، تنظیم افزایشی دارد (۱۳) که با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر همسو بود. گزارش تحقیقی در زمینه‌ی نقش ژن‌های *Tweak* و *Fn14* در آتروفی ناشی از افزایش سن نیز حاکی از آن بود که حذف *Fn14*، روند آتروفی مرتبط با پیری را تا حد زیادی مهار می‌کند که با سطوح بیشتر پروتئین‌های *Major histocompatibility complex* (MHC)، تروپونین و آلفا اکتین سارکومریک همراه است. همچنین، در رت‌های فاقد *Fn14* کاهش قابل توجهی در سطوح پروتئین‌های یوبی کوئیتین شده که با پیری افزایش می‌یابد، مشاهده گردید و همان‌گونه که ذکر شد، با مهار *Fn14* و مسیر *Tweak/Fn14*، بیان ژن *MuRF1* نیز کاهش یافت (۳۲)؛ چرا که مسیر *Tweak/Fn14* با فعال‌سازی *TNF Receptor Associated Factor 6* (*TRAF6*) و *NF-κB* و افزایش *MuRF1* در آتروفی مشارکت می‌کند (۳۳). همچنین، مشخص شده است که *Tweak* فعالیت سیگنالینگ *NF-κB* را در سلول‌های عضلانی افزایش می‌دهد (۱۳). از این رو گزارش شده است که با افزایش سن، فعالیت *NF-κB* در عضلات اسکلتی افزایش می‌یابد، اما با حذف *Fn14*، فعالیت *NF-κB* متصل به DNA کاهش پیدا می‌کند (۳۲).

نتایج حاضر در مورد بیان ژن *Atrogin-1* نیز با نتایج برخی تحقیقات (۳۶-۳۴، ۳۰) همسو می‌باشد. در این بررسی‌ها، افزایش سطوح *Atrogin-1* را با گلوکز پلاسمای بالای رت‌های مبتلا به دیابت مربوط دانستند (۳۶، ۳۵) و همکاران مشاهده کردند که بیان *Atrogin-1* و پروتئین *Forkhead box protein O* (*FOXO*) در شرایط آتروفی افزایش می‌یابد (۳۶). نتایج پژوهش دیگری گزارش کرد که افزایش استرس اکسیداتیو و کاهش ظرفیت اکسیدانی بدن به دنبال سالمندی و دیابت (۳۷) که به دلیل بدعملکردی میتوکندری، تجمع *Reactive oxygen species* (*ROS*) در بافت‌های مختلف از جمله عضله‌ی اسکلتی اتفاق می‌افتد (۳۴)، می‌تواند موجب افزایش بیان *Macrophage stimulating 1* (*MST1*) شود که یکی از مکانیسم‌های درگیر در افزایش *Atrogin-1* می‌باشد. *MST1* از طریق فسفوریله کردن *serin7* در *Foxo3*،

می‌تواند موجب افزایش و انتقال هسته‌ای آن در عضلات اسکلتی شود. مشخص شده است که تحت شرایط استرس اکسایشی در نورون‌های عصبی، *MST1* با فسفریله کردن *FOXO3*، موجب انتقال آن به هسته می‌شود و فعال‌سازی ژن‌های پیش‌آپوپتوزیس را به دنبال دارد. *FOXO3* یکی از عوامل پایین‌دست *MST1* است که می‌تواند بیان عوامل آتروژنیکی متفاوت را تنظیم کند. *FOXO3* با اتصال به ناحیه‌ی پروموتور ژن *Atrogin-1*، بیان آن را تنظیم افزایشی می‌کند (۳۸). افزایش سن با تخریب نورون‌های حرکتی به ویژه در تارهای عضلانی نوع دو همراه است. از بین رفتن عصب تارهای عضلانی، بیان پروتئولیزهای یوبی کوئیتین را در عضله افزایش می‌دهد. در نتیجه، این تخریب عصبی ناشی از پیری می‌تواند دلیل افزایش *Atrogin-1* باشد (۳۴).

شواهد نشان می‌دهد که بیان سایتوکاین‌های التهابی مانند *IL-1β* و *TNF-α*، با افزایش سن، دیابت و چاقی در عضلات اسکلتی افزایش می‌یابد (۵) و بین نشانگرهای التهاب سیستمیک و کاهش توده‌ی عضلانی و قدرت در سالمندی و دیابت، همبستگی وجود دارد و نسبت به افراد بالغ، بیان سایتوکاین‌های التهابی در افراد مسن، بالاتر است (۲). مشخص شده است که *TNF-α* می‌تواند به طور مستقیم از طریق افزایش فعالیت و بیان مسیر *UPS* یا از طریق افزایش آپوپتوزیس، آتروفی عضلانی را در دوران سالمندی ایجاد کند (۱۰). همچنین، *TNF-α* از طریق مسیرهای *p38 MAPK* و *NF-κB*، بیان *Atrogin-1* و *MuRF1* را در عضلات اسکلتی افزایش می‌دهد (۳۴). بنابراین، با توجه به ادبیات موجود و با احتیاط، می‌توان گفت احتمالاً افزایش التهاب دوران سالمندی به ویژه در تعامل با دیابت و چاقی، می‌تواند یکی از مکانیسم‌های افزایش *Atrogin-1* و *Tweak* و گیرنده‌اش (*Fn14*) و در نتیجه، افزایش آتروفی در دوران سالمندی باشد.

سالمندی و بیماری‌های مزمن، مکانیسم‌های متداول زیادی دارند که می‌توانند به روش افزایشی یا هم‌افزایی، در ایجاد آتروفی عضلات نقش داشته باشند (۲). ورزش (هوای و مقاومتی) و مداخلات رژیم غذایی می‌توانند هم در سالمندی و هم در بیماری‌هایی مانند دیابت و چاقی برای حفظ توده و قدرت عضلانی استفاده شوند (۲). از آنجایی که مطالعات اندکی در زمینه‌ی بررسی اثرات HIIT بر تغییرات بیان ژن‌های *Tweak*، *Fn14* و *Atrogin-1* آن هم روی آزمودنی‌ها و با شرایط متفاوتی انجام شده بود، در تحلیل نتایج از تحقیقات موجود در این زمینه استفاده گردید. یکی از مهم‌ترین یافته‌های پژوهش حاضر این بود که اجرای هشت هفته HIIT به تنهایی و در تعامل با مکمل‌یاری اسپیرولینا، موجب کاهش بیان ژن‌های *Tweak*، *Fn14* و *Atrogin-1* در رت‌های مسن و چاق مبتلا به دیابت شد که این کاهش در گروه HIIT + مکمل از سایر گروه‌ها بیشتر بود.

از طرف دیگر، امروزه استفاده از مکمل‌های غذایی در ورزش بسیار گسترش یافته است (۴۲). اسپیرولینا یک جلبک سبز-آبی است که در پژوهش‌ها به عنوان منبع پروتئین و ویتامین در نظر گرفته شده است (۲۳). نتایج مطالعات نشان می‌دهد که اسپیرولینا می‌تواند قدرت و استقامت ایزومتریک و مقدار سنتز پروتئین در عضله را افزایش دهد (۴۲). چندین شاخص مانند فشارهای مکانیکی و هورمون‌های رشد (به عنوان مثال IGF-1، انسولین و هورمون تیروئید) با فعال‌سازی چندین مسیر سیگنالی مانند (PI3K) Phosphoinositide 3-kinase، Akt و مسیره‌های (mTOR) Mammalian target of rapamycin، موجب بازسازی و سنتز عضلانی می‌شود (۴۲). ورزش با افزایش ترشح هورمون‌های رشد و افزایش IGF-1 سیستمیک در عضلات اسکلتی، می‌تواند بر این مسیر مهم تأثیر گذار باشد (۵). چنانکه گزارش شده است، ورزش‌های مقاومتی، آبخارهای پیام‌رسانی سنتز عضلانی (مسیر mTOR) را فعال می‌کند. علاوه بر ورزش، این مسیرها تحت تأثیر مواد مغذی، داروها و مکمل‌ها و داروهای انرژی‌زا قرار می‌گیرند (۲). در حمایت از این مطالب، احمدی و همکاران تأثیر هشت هفته تمرین مقاومتی همراه با مکمل باری اسپیرولینا را بر مسیر سیگنالینگ mTOR در ۳۲ رت اسپراگ داوولی بررسی کردند و دریافتند که بیان mTOR در گروه‌های ورزش مقاومتی و تمرین ورزشی + مکمل، به طور چشمگیری افزایش یافت (۴۲). بنابراین، با توجه به ویژگی‌های عضله‌سازی این مکمل به دلیل داشتن منابع پروتئینی بالا و اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی که منجر به کاهش سطوح سایتوکاین‌های التهابی و آتروفی از جمله Tweak، Fn14 و Atrogin-1 می‌شود، در مطالعه‌ی حاضر می‌توان بخشی از کاهش ژن‌های مذکور در گروه مکمل و کاهش چشم‌گیر آن‌ها در گروه HIIT + مکمل و احتمالاً بخشی از افزایش وزن عضله‌ی نعلی را توجیه کرد.

از دیگر یافته‌های تحقیق حاضر این بود که به دنبال هشت هفته مداخلات (HIIT و مکمل‌یاری)، توده‌ی بدنی رت‌های مورد بررسی در گروه‌های تمرین و مکمل به طور معنی‌داری نسبت به گروه‌های شاهد سالم و شم کاهش یافت، اما توده‌ی عضله‌ی نعلی به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد. پژوهش‌های بسیاری در مورد اثر HIIT بر وزن انجام شده است (۴۳-۴۵) که اغلب با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر همسو و بیانگر اثرات کاهش وزن به دنبال HIIT می‌باشد. Shen و همکاران دریافتند که HIIT در رت‌های تغذیه شده با غذای پرچرب (High-fat diet یا HFD)، موجب کاهش توده‌ی چربی و کاهش وزن شد (۴۵). بر اساس برخی تحقیقات، HIIT حتی تأثیر بیشتری نسبت به تمرین استقامتی بر کاهش وزن، کنترل گلوکز و مقاومت به انسولین دارد (۴۴). در مورد افزایش وزن عضله‌ی نعلی در

همسو با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر، برخی تحقیقات کاهش سطح بیان ژن‌های Tweak و Fn14 (۳۹، ۳۳-۳۲، ۲۰، ۱۳) و Atrogin-1 (۳۴، ۴۱-۳۴) را به دنبال HIIT و تمرین مقاومتی گزارش کردند. کاظمی و همکاران به این نتیجه رسیدند که چهار هفته HIIT، موجب کاهش بیان ژن‌های Tweak، Fn14 (۱۳) در رت‌های پیر شد. کاظمی و دهش نیز دریافتند که چهار هفته HIIT منجر به کاهش بیان Atrogin-1 (۳۴) در رت‌های پیر می‌شود. از آنجایی که افزایش سن و التهاب ناشی از چاقی و دیابت (۱۰) منجر به تخریب اعصاب حرکتی در عضلات اسکلتی می‌شود و مشخص شده است که تمرین ورزشی عوامل تخریب عصبی را کاهش می‌دهد و عوامل رشد عصبی به دنبال اجرای تمرینات ورزشی افزایش می‌یابد (۱۳)، آن‌ها این کاهش در بیان ژن‌های مذکور را در نتیجه‌ی تأثیرگذاری تمرین و اثرات حمایتی و تعدیل‌کننده‌ی تمرین بر بازسازی عصبی دانستند. به طور مشابه، شیبانی و همکاران پس از شش هفته HIIT، کاهش معنی‌داری را در Atrogin-1 عضله‌ی نعلی رت‌ها مشاهده نمودند و نتیجه‌گیری کردند که HIIT با افزایش فعالیت AKT فعالیت Foxo3α را کاهش می‌دهد و سبب رشد عضلانی و هایپرتروفی می‌شود (۴۰). نتایج پژوهش‌های پیشین نشان داده است که تمرین ورزشی، عوامل التهابی (۲) و لیگازهای یوبی‌کوئیتین (۱۳) را در عضلات اسکلتی کاهش می‌دهد. بنابراین، احتمالاً با افزایش ترمیم عصبی، بیان این ژن‌ها کاهش می‌یابد. در حمایت از اثرات تعدیلی HIIT بر محور Tweak/TRAF6/NFκB/MuRF1 که موجب کاهش آتروفی و حفظ توده‌ی عضلانی می‌شود، یافته‌های Mittal و همکاران نشان داد که در رت‌های فاقد Tweak، سطح مقطع تارعضلانی تا ۱۲ درصد افزایش یافت (۳۳) که می‌تواند در تحلیل یافته‌های بررسی حاضر نیز صدق کند. در همین راستا، Ribeiro و همکاران گزارش کردند که ۱۲ هفته تمرین مقاومتی، موجب کاهش معنی‌دار ژن‌های مسیر آتروفی در رت‌های پیر و جوان تمرین کرده شد. آن‌ها کاهش مسیره‌های درون سلولی کاتابولیکی و به ویژه التهابی (محور TNF-α، Tweak/Fn14، FOXO1، Atrogin-1، MuRF1؛ میوستاتین) و افزایش مسیره‌های درون سلولی آنابولیکی (محور IGF-1، mTOR-p70S6sk-1 و MyoD) را از دلایل احتمالی جلوگیری و کاهش آتروفی و هایپرتروفی به دنبال تمرینات مقاومتی در سالمندی معرفی کردند (۳۹)، اما همکاران با بررسی تأثیر چهار هفته‌ی پنج جلسه‌ای تمرین تداومی استقامتی و HIIT بر ژن‌های مسیر آتروفی در رت‌ها، دریافتند که هیچ تغییری در وضعیت شاخص‌های آتروفی از جمله Atrogin-1 ایجاد نشد (۴۱). عدم همخوانی این نتایج با یافته‌های تحقیق حاضر، شاید به نوع آزمودنی‌ها، شرایط بیماری و مدت زمان کم تمرین آن‌ها ارتباط داشته باشد.

موجب تعدیل آتروفی ناشی از سالمندی و دیابت می‌شود. بنابراین، به سالمندان توصیه می‌گردد ضمن ارتقای آگاهی در زمینه‌ی امکان استفاده از مکمل‌های غذایی و انجام ورزش‌های مناسب در برنامه‌ی روزانه‌ی خود، جهت افزایش سلامت عصبی-عضلانی، از ترکیب HIIT به همراه مکمل به عنوان یک روش مؤثر استفاده کنند. از محدودیت‌های اصلی تحقیق حاضر می‌توان به عدم بررسی تغییرات بیان ژن‌های مذکور در عضلات تندرتهای جهت مقایسه و امکان استفاده از دزهای مختلف مکمل و شدت‌های متفاوت HIIT اشاره نمود. بنابراین، به منظور نتیجه‌گیری بهتر، می‌توان در پژوهش‌های آینده از این متغیرها بهره برد.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر برگرفته از پایان‌نامه‌ی مقطع دکتری تخصصی فیزیولوژی ورزشی با کد اخلاق JR.HSU.REC.1400.007، مصوب دانشگاه حکیم سبزواری می‌باشد. تألیف این مطالعه هیچ‌گونه منافع متقابل برای نویسندگان ندارد و بدون حمایت مالی صورت گرفته است. بدین وسیله نویسندگان از کلیه‌ی کسانی که در تهیه و تدوین این تحقیق همکاری نمودند، تشکر و قدردانی به عمل می‌آورند.

گروه‌های تمرین، شاید به دلیل اثر کاهشی HIIT و مکمل اسپیرولینا بر التهاب و آتروفی ناشی از دیابت و سالمندی و از طرف دیگر، اثرات احتمالی مداخلات مذکور بر بایوژنز میتوکندریایی تا حدودی قابل توجه باشد. چنانکه مشخص شده است، HIIT موجب افزایش بیان Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC-1 α) و بایوژنز میتوکندریایی در عضله‌ی پهن جانبی (کندانقباض) می‌شود (۱۳). بنابراین، می‌توان گفت که HIIT به سبب مشابهت مکانیسم جهت پیشگیری از آتروفی و سایتوکاین‌هایی که نقش شاخص‌های رشد را ایفا می‌کنند و امکان عملیاتی شدن بهتر آن برای سالمندان نسبت به تمرینات مقاومتی، ممکن است در مطالعه‌ی حاضر موجب تغییرات هیبریدی تارهای کند در جهت تارهای اکسیداتیو تندرتهای شده باشد و در تعامل با مکمل اسپیرولینا که دارای ویژگی‌های ضد التهابی و آنابولیکی برای عضلات است، منجر به افزایش توده‌ی عضلانی شده باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج مطالعه‌ی حاضر و پیشینه‌ی پژوهشی، می‌توان گفت که HIIT و مکمل یاری اسپیرولینا، احتمالاً با تغییر در بیان ژن‌ها و عوامل بالادستی و پایین‌دستی درگیر در مسیرهای التهاب و آتروفی،

References

- Gil-Iturbe E, Felix-Soriano E, Sainz N, Idoate-Bayon A, Castilla-Madrigal R, Moreno-Aliaga MJ, et al. Effect of aging and obesity on GLUT12 expression in small intestine, adipose tissue, muscle, and kidney and its regulation by docosahexaenoic acid and exercise in mice. *Appl Physiol Nutr Metab* 2020; 45(9): 957-67.
- Kalyani RR, Corriere M, Ferrucci L. Age-related and disease-related muscle loss: the effect of diabetes, obesity, and other diseases. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014; 2(10): 819-29.
- Narain JP, Kumar R. Textbook of chronic noncommunicable diseases: the health challenge of 21st century. New Delhi, India: Jaypee Brothers Medical Publishers; 2016.
- Chen GQ, Mou CY, Yang YQ, Wang S, Zhao ZW. Exercise training has beneficial anti-atrophy effects by inhibiting oxidative stress-induced MuRF1 upregulation in rats with diabetes. *Life Sci* 2011; 89(1-2): 44-9.
- Perry BD, Caldow MK, Brennan-Speranza TC, Sbaraglia M, Jerums G, Garnham A, et al. Muscle atrophy in patients with Type 2 Diabetes Mellitus: roles of inflammatory pathways, physical activity and exercise. *Exerc Immunol Rev* 2016; 22: 94-109.
- Panahi S, Agha Alinejad H, Gharakhanloo R, Fayazmilani R, Hedayati M, Safarzadeh A, et al. The effect of 4 weeks resistance training on murf1 gene expression and muscle atrophy in diabetic Wistar rats. *Med J Tabriz Univ Med Sci* 2016; 38(2): 6-13. [In Persian].
- Dogra C, Changotra H, Mohan S, Kumar A. Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis inhibits skeletal myogenesis through sustained activation of nuclear factor-kappaB and degradation of MyoD protein. *J Biol Chem* 2006; 281(15): 10327-36.
- Burkly LC, Michaelson JS, Zheng TS. TWEAK/Fn14 pathway: An immunological switch for shaping tissue responses. *Immunol Rev* 2011; 244(1): 99-114.
- Peterson JM, Bakkar N, Guttridge DC. NF-kappaB signaling in skeletal muscle health and disease. *Curr Top Dev Biol* 2011; 96: 85-119.
- Teng S, Huang P. The effect of type 2 diabetes mellitus and obesity on muscle progenitor cell function. *Stem Cell Res Ther* 2019; 10(1): 103.
- Rusbana TB, Agista AZ, Saputra WD, Ohsaki Y, Watanabe K, Ardiansyah A, et al. Supplementation with fermented rice bran attenuates muscle atrophy in a diabetic rat model. *Nutrients* 2020; 12(8): 2409.
- Tchernof A, Nolan A, Sites CK, Ades PA, Poehlman ET. Weight loss reduces C-reactive protein levels in obese postmenopausal women. *Circulation* 2002; 105(5): 564-9.
- Kazemi AR, Haghpanah AR, Dakhili AB. The effect of high-intensity exercise training on gene expression of tweak and Fn14 in EDL muscle of aged and adult mice. *Research in Sport Medicine and Technology* 2020; 9(18): 1-11. [In Persian].
- Delfan M, peeri M, Ghouchi Asl S. The comparison

- of eight weeks of high intensity interval training vs. continuous training on the genes expression of IL-6 and CRP in adipose tissue of diabetic Rats induced by high-fat foods and fructose. *Research in Medicine* 2020; 44(4): 573-9. [In Persian].
15. Mascher H, Tannerstedt J, Brink-Elfegoun T, Ekblom B, Gustafsson T, Blomstrand E. Repeated resistance exercise training induces different changes in mRNA expression of MAFbx and MuRF-1 in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 294(1): E43-E51.
 16. Apro W, Moberg M, Hamilton DL, Ekblom B, van HG, Holmberg HC, et al. Resistance exercise-induced S6K1 kinase activity is not inhibited in human skeletal muscle despite prior activation of AMPK by high-intensity interval cycling. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2015; 308(6): E470-E481.
 17. Clavel S, Coldefy AS, Kurkdjian E, Salles J, Margaritis I, Derijard B. Atrophy-related ubiquitin ligases, atrogen-1 and MuRF1 are up-regulated in aged rat Tibialis Anterior muscle. *Mech Ageing Dev* 2006; 127(10): 794-801.
 18. Haddad F, Adams GR. Aging-sensitive cellular and molecular mechanisms associated with skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol* (1985) 2006; 100(4): 1188-203.
 19. Altun M, Besche HC, Overkleeft HS, Piccirillo R, Edelmann MJ, Kessler BM, et al. Muscle wasting in aged, sarcopenic rats is associated with enhanced activity of the ubiquitin proteasome pathway. *J Biol Chem* 2010; 285(51): 39597-608.
 20. Raue U, Jemiolo B, Yang Y, Trappe S. TWEAK-Fn14 pathway activation after exercise in human skeletal muscle: Insights from two exercise modes and a time course investigation. *J Appl Physiol* (1985) 2015; 118(5): 569-78.
 21. Golestani F, Mogharnasi M, Erfani-Far M, Abtahi-Eivari SH. The effects of spirulina under high-intensity interval training on levels of nesfatin-1, omentin-1, and lipid profiles in overweight and obese females: A randomized, controlled, single-blind trial. *J Res Med Sci* 2021; 26: 10.
 22. Hozayen WG, Mahmoud AM, Soliman HA, Mostafa SR. Spirulina versicolor improves insulin sensitivity and attenuates hyperglycemia-mediated oxidative stress in fructose-fed rats. *J Intercult Ethnopharmacol* 2016; 5(1): 57-64.
 23. Akbarpour M, Samari Z. The effect of aerobic training and Spirulina supplementation on Resistin and C - reactive protein in women with type 2 diabetes with overweight. *FEYZ* 2020; 24(5): 576-84.
 24. Lee EH, Park JE, Choi YJ, Huh KB, Kim WY. A randomized study to establish the effects of spirulina in type 2 diabetes mellitus patients. *Nutr Res Pract* 2008; 2(4): 295-300.
 25. Hooshmand B, Attarzade Hosseini SR, Kordi MR, Davaloo T. The Effect of 8-week Aerobic Exercise with Spirulina Supplementation Consumption on Plasma levels of MDA, SOD and TAC in Men with Type 2 Diabetes. *SPMI* 2019; 10(4): 139-48. [In Persian].
 26. Asad M, Fashami M. The effect of 8 weeks of endurance training and high intensity interval training on gene expression of MEF2A and MEF2DIN obese male Wistar rats. *Sport Physiology and Management Investigations* 2017; 9(2): 131-40. [In Persian].
 27. Hedayati S, Riyahi Malayeri S, Hoseini M. The effect of eight weeks of high and moderate intensity interval training along with aloe vera consumption on serum levels of chemerin, glucose and insulin in streptozotocin-induced diabetic rats: An experimental study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2018; 17(9): 801-14. [In Persian].
 28. Hoydal MA, Wisloff U, Kemi OJ, Ellingsen O. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2007; 14(6): 753-60.
 29. Gibala MJ, McGee SL. Metabolic adaptations to short-term high-intensity interval training: a little pain for a lot of gain? *Exerc Sport Sci Rev* 2008; 36(2): 58-63.
 30. Khoramshahi S, Kordi MR, Delfan M, Gaeini A, Safa M. Effect of five weeks of high-intensity interval training on the expression of miR-23a and atrogen-1 in gastrocnemius muscles of diabetic male rats. *Iran J Endocrinol Metab* 2017; 18(5): 361-7. [In Persian].
 31. Simon JP, Baskaran UL, Shallaudin KB, Ramalingam G, Evan PS. Evidence of anti-diabetic activity of Spirulina fusiformis against streptozotocin-induced diabetic Wistar albino rats. *3 Biotech* 2018; 8(2): 129.
 32. Tajrishi MM, Sato S, Shin J, Zheng TS, Burkly LC, Kumar A. The TWEAK-Fn14 dyad is involved in age-associated pathological changes in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 446(4): 1219-24.
 33. Mittal A, Bhatnagar S, Kumar A, Lach-Trifilieff E, Wauters S, Li H, et al. The TWEAK-Fn14 system is a critical regulator of denervation-induced skeletal muscle atrophy in mice. *J Cell Biol* 2010; 188(6): 833-49.
 34. Kazemi A, Dahesh T. The effect of 4 weeks of high intensity training on gene expression of MST1 and MAFbx in EDL muscle of aged mice. *SPMI* 2019; 11(3): 47-58. [In Persian].
 35. Hudson MB, Woodworth-Hobbs ME, Zheng B, Rahner JA, Blount MA, Gooch JL, et al. miR-23a is decreased during muscle atrophy by a mechanism that includes calcineurin signaling and exosome-mediated export. *Am J Physiol Cell Physiol* 2014; 306(6): C551-C558.
 36. Wada S, Kato Y, Okutsu M, Miyaki S, Suzuki K, Asahara H, et al. Mir-23a attenuates skeletal muscle atrophy by targeting Mafbx/ATROGIN-1 AND Murf1. *Journal of Physiological Sciences* 2009; 59(Suppl 1): 216.
 37. Jackson MJ, McArdle A. Age-related changes in skeletal muscle reactive oxygen species generation and adaptive responses to reactive oxygen species. *J Physiol* 2011; 589(Pt 9): 2139-45.
 38. Wei B, Dui W, Liu D, Xing Y, Yuan Z, Ji G. MST1, a key player, in enhancing fast skeletal muscle atrophy. *BMC Biol* 2013; 11: 12.
 39. Ribeiro MBT, Guzzoni V, Hord JM, Lopes GN, Marqueti RC, de Andrade RV, et al. Resistance training regulates gene expression of molecules associated with intramyocellular lipids, glucose signaling and fiber size in old rats. *Sci Rep* 2017; 7(1): 8593.
 40. Shebani S, Daryanoosh F, Tanideh N, Rahimi M,

- Jamhiri I, Refahiat MA. Effect of high intensity interval training and detraining on gene expression of AKT/FoxO3a in cardiac and soleus muscle of male rats. *Ebnesina* 2020; 22(2): 15-23. [In Persian].
41. Holloway TM, Bloemberg D, da Silva ML, Simpson JA, Quadriatero J, Spriet LL. High intensity interval and endurance training have opposing effects on markers of heart failure and cardiac remodeling in hypertensive rats. *PLoS One* 2015; 10(3): e0121138.
42. Ahmadi F, Ghanbar Zadeh M, Habibi AH, Karimi F. Effect of resistance training with *Spirulina platensis* on PI3K/Akt/mTOR/p70S6k signaling pathway in cardiac muscle. *Sci Sports* 2020; 35(2): 91-8.
43. Karimi M, Eizadi M. The effect of interval training on FOXO1 expression in pancreas tissue of diabetes rats with high fat diet and STZ. *Razi J Med Sci* 2019; 26(6): 95-104. [In Persian].
44. Mirghani SJ, Azarbayjani MA, Peeri M. Effects of endurance training and isocaloric high intensity interval training on anthropometric indices and insulin resistance in high fat diet-fed Wistar rats. *Med Lab J* 2018; 12(6): 12-8. [In Persian].
45. Shen Y, Xu X, Yue K, Xu G. Effect of different exercise protocols on metabolic profiles and fatty acid metabolism in skeletal muscle in high-fat diet-fed rats. *Obesity (Silver Spring)* 2015; 23(5): 1000-6.

The Effect of High-Intensity Intermittent Training with Spirulina Powder on Changes in Gene Expression of Inflammation and Atrophy in the Soleus Muscle of Obese Elderly Diabetic Rats

Marzieh Sadat Azarniveh¹, Roya Askari², Amir Hossein Haghighi²

Original Article

Abstract

Background: Exercise is a suggested way to reduce inflammation and atrophy and control diabetes. Spirulina supplement also has anti-inflammatory effects. The aim of this study was to investigate the effect of eight weeks of high-intensity interval training (HIIT) with spirulina on changes in the expression of genes of inflammation and atrophy in the soleus muscle of obese elderly diabetic rats.

Methods: In this experimental study, 40 old male Wistar rats (20-month-old) with an average weight of 280-325 g became obese after purchase for 8 weeks on a high-fat diet, and then became diabetic by intraperitoneal injection of streptozocin (40 mg/kg). They were divided in 5 equal groups of HIIT, HIIT + supplement, supplement, sham and control. They did 5 sessions of activities on treadmill with an intensity of 90% VO₂max per week for eight weeks to perform HIIT in training groups, and used spirulina consumption (50 mg/kg body weight) as supplementation on training days. Expression of genes were measured using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). One-way ANOVA and Tukey post hoc test were used to analyze the data.

Findings: Induction of diabetes significantly increased the expression of TWEAK, Fn14, and atrogen-1 genes in study groups compared to controls; but exercise and supplementation significantly reduced these variables more in exercise and supplementation groups compared to other groups. After training, body mass in HIIT, supplement, and HIIT + supplement groups decreased significantly compared to sham and control groups; and soleus muscle mass increased significantly only in HIIT and HIIT + supplement groups compared to control group.

Conclusion: According to the results of HIIT + supplementation, it is recommended as an effective method to reduce atrophy and improve muscle health in diabetic elderly.

Keywords: High-intensity interval training; Spirulina; Atrophy; Cytokine TWEAK; Atrogen-1, mouse

Citation: Azarniveh MS, Askari R, Haghighi AH. The Effect of High-Intensity Intermittent Training with Spirulina Powder on Changes in Gene Expression of Inflammation and Atrophy in the Soleus Muscle of Obese Elderly Diabetic Rats. J Isfahan Med Sch 2022; 39(652): 922-33.

1- PhD Student, Department of Sports Sciences, University of Hakim Sabzevari, Sabzevar AND Instructor, Department of Sport Sciences, School of Literature and Humanities, University of Zabol, Zabol, Iran

2. Associate Professor, Department of Sports Sciences, University of Hakim Sabzevari, Sabzevar, Iran

Corresponding Author: Roya Askari, Associate Professor, Department of Sports Sciences, University of Hakim Sabzevari, Sabzevar, Iran; Email: r.askari@hsu.ac.ir