

## اثر شش هفته تمرین هوازی بر بیان ژن های درگیر در پیروپتوزیس بافت آنورت

### موش های نر سالم و دیابتی

سمیرا حسن پورسلیمانی<sup>۱</sup>، آسیه عباسی دلویی<sup>۲</sup>، احمد عبدی<sup>۳</sup>، شیرین زیلائی بوری<sup>۴</sup>

۱- گروه فیزیولوژی ورزشی واحد آیت الله املی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.

۲- گروه فیزیولوژی ورزشی واحد آیت الله املی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران. [abbasi.dalooii@gmail.com](mailto:abbasi.dalooii@gmail.com)

۳- گروه فیزیولوژی ورزشی واحد آیت الله املی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.

۴- دانشکده تربیت بدنی علوم ورزشی واحد مسجد سلیمان، دانشگاه آزاد اسلامی، مسجد سلیمان، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۹/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۶

### چکیده

زمینه و هدف: در بیماری دیابت، فرآیندهای التهابی نقش کلیدی را ایفا می کنند و همه عوارض ناشی از دیابت را تحت تأثیر قرار می دهند. التهاب با فرایند *caspase-1* همراه است که سیتوکین های ضد التهابی *IL-1 $\beta$*  و *IL-18* را فعال می کند و منجر به مرگ و میر پروتئین های التهابی می شود، که یکی از رخدادهای پیروپتوزیس است. هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر شش هفته تمرین هوازی بر بیان ژن های درگیر در آپوپتوزیس بافت آنورت موش های سالم و دیابتی بود.

روش کار: بدین منظور، ۴۰ سر موش صحرایی نر (۸ هفته ای) پس از آشنایی با پروتکل تمرین به ۴ گروه تقسیم شدند (۱۰ سر در هر گروه): (۱) کنترل سالم، (۲) کنترل - دیابت، (۳) تمرین - دیابت و (۴) تمرین - سالم. ابتدا مدل دیابت القاء شد سپس جهت تمرینی ۵ روز دویدن بر روی تردمیل به مدت ۶ هفته اجرا گردید. به دنبال ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتایی و ۲۲ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، نمونه گیری بافت آنورت جهت تجزیه و تحلیل *IL-1 $\beta$* ، *IL-18*، *Caspase-1* و *NLRP3* با تکنیک PCR Real Time انجام شد. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک راهه، در صورت مشاهده تفاوت معنی دار از آزمون تعقیبی توکی جهت تعیین محل اختلاف بین گروهی استفاده گردید ( $P \leq 0/05$ ).

یافته ها: القای دیابت منجر به افزایش معنی دار بیان ژن های *IL-1 $\beta$* ، *IL-18*، *Caspase-1* و *NLRP3* در بافت آنورت موش ها شد، که انجام تمرین هوازی سبب کاهش معنی دار این ژن ها شد. هم چنین انجام تمرین هوازی در موش های سالم نیز مقادیر بیان ژن های *IL-1 $\beta$* ، *IL-18*، *Caspase-1* و *NLRP3* بافت آنورت را کاهش داد.

نتیجه گیری: تمرین هوازی ممکن است به عنوان یک روش غیردارویی موثر برای بهبود التهاب ناشی از دیابت و جلوگیری از اختلالات عروقی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: دیابت، تمرین منظم هوازی، پیروپتوزیس، *NLRP3*.

### مقدمه

التهابی تحت تأثیر اختلالات متابولیک و همودینامیک در دیابت دارد، بلکه علاوه بر این، این اختلالات منجر به فعال شدن *NLRP3* می شود (۲۸). هم چنین تحقیقات نشان داده است که این ژن عامل مهم و خطرناک برای

در حال حاضر در زمینه عوارض دیابت، فرآیندهای التهابی نقش کلیدی را ایفا نموده و همه عوارض ناشی از دیابت را تحت تأثیر قرار می دهند (۳۵). در حال حاضر استرس اکسیداتیو نه تنها نقش کلیدی را در مسیرهای

ژن *NLRP3*، *ASC*، *caspase-1* و *IL-1 $\beta$*  و *IL-18* به طور قابل توجهی در پلاک های آترواسکلروز ناپایدار کاروتید در مقایسه با افراد سالم افزایش می یابد (۲۹، ۲۰). چنان چه گفته شد شواهد حاصل از تحقیقات درباره عوارض دیابت تأکید دارد که این عوارض از حالت کاملاً متابولیک به یک حالت التهابی تغییر می کند (۲۵، ۲۱)، در نتیجه روش درمانی در حال حاضر نیز شامل رژیم های دارویی است که التهاب را افزایش می دهد و نیاز به اصلاح دارد. در این میان کاربرد مداخلات غیر نهاجمی نیز چندان دور از ذهن نیست. چراکه اثر بخشی تمرین ورزشی منظم برای پیشگیری و درمان دیابت نوع ۲ و بیماری قلبی عروقی آترواسکلروز به خوبی شناخته شده است (۳۲). در بیماران مبتلا به دیابت یا در معرض خطر ابتلا به دیابت نوع ۲، به نظر می رسد به طور عمده بر روی عضله اسکلتی افزایش حساسیت به انسولین پس از هر تمرین رخ دهد و عوارض دیابت با افزایش آمادگی جسمانی کاهش می یابد (۳۱). هم چنین درباره اثر تمرین ورزشی بر پیش گیری از آترواسکلروز، کاهش تری گلیسیرید پلاسمی و فشار خون و افزایش HDL کلسترول موجب گزارشاتی در دسترس است (۳۲). از سوی دیگر، در هر دو مدل آزمایشی حیوانات و انسان، ورزش می تواند اثرات مفید بر روی هر دو آترواسکلروز و اختلال عملکرد سلول های اندوتلیال حتی در صورت عدم تغییرات منفی در کلسترول سرم و دیگر چربی ها داشته باشد و تاثیر مستقیم بر اندوتلیوم دیده شده است (۳۶). یک شیوه زندگی فیزیکی مناسب برای حفظ سلامت اندوتلیال و پیشگیری از بیماری قلبی عروقی که همراه با دیابت است، در انسان و جوندگان اهمیت دارد (۴). فعالیت فیزیکی سبب می شود که EDR (endothelium-dependent relaxation) ناشی از استیل کولین در آنورت سینه و شریان مزانتریک در موش های صحرائی چاق فعال در مقایسه با موش های

آترواسکلروز (آترواسکلروز یک بیماری چند فاکتوری در شریان های بزرگ است که با رسوب و انباشت لیپیدها و سلول های التهابی مشخص می شود) در بیماران دیابتی است که میزان بروز آن ۲ تا ۴ برابر بیشتر از جمعیت غیر دیابتی است (۱۳). فراوانی اطلاعات حاصل از تجزیه و تحلیل پلاک های آترواسکلروز جوندگان و انسان ها نشان داده است که *IL-1 $\beta$*  و *IL-18* که هر دو از محصولات فعال سازی التهابی *NLRP3* هستند و نقش کلیدی در شروع و پیشرفت آترواسکلروز دارند. کمبود *IL-1 $\beta$*  یا *IL-18* و هم چنین تحویل آنتاگونیست به گیرنده *IL-1 $\beta$* ، با کاهش مشخصی در میزان ضایعه آترواسکلروتیک مربوط است (۲۳). پیروپتوزیس (Pyroptosis) یک شکل از مرگ سلولی بوده که به فعال شدن *Caspase-1* وابسته است. از ویژگی های پیروپتوزیس پارگی سریع پلازما و انتشار محتوای پروتئین التهابی داخل سلولی است. تخریب سلول در طی پیروپتوزیس حاصل از فرایندهای *Caspase-1* می باشد (۳). منافذ غشاء پلازما وابسته به *Caspase-1* باعث تخریب شیب یونی سلولی می شود، تولید یک شبکه افزایش فشار اسمزی، نفوذ آب، تورم سلولی و لیز شدن اسمزی، و سپس انتشار محتوای التهابی داخل سلولی رخ می دهد. مرگ سلولی به علت پیروپتوزیس منجر به افزایش اندازه سلول و تجزیه DNA کروموزومی می شود (۸). یکی از رخدادهای پیروپتوزیس، التهاب با فرایند *Caspase-1* همراه است که سیتوکین های ضد التهابی *IL-1 $\beta$*  و *IL-18* را فعال می کند و منجر به مرگ و میر پروتئین های التهابی می شود، این التهاب باعث فعال شدن *Caspase-1* از طریق گیرنده *Nod-like (NLRP1)*، ۳، ۶، ۷، ۱۲، *AIM2*، *NLRC4* یا *Pyrin* می گردد. بسیاری از داروهای ضد التهاب، باعث کاهش پردازش خودکار *caspase-1* فعال و کاتالیست فعال *IL-1 $\beta$*  و *pro-IL-18* می گردند (۶). بیان پروتئین و

### محیط پژوهش و تغذیه آزمودنی ها

موش‌ها در آزمایشگاه حیوانات بخش فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز در شرایط کنترل شده نور (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، شروع روشنایی ۶ صبح و شروع خاموشی ۶ عصر) دما (۲۲±۳ سانتی‌گراد)، و رطوبت (حدود ۴۵ درصد) نگهداری شدند. تعداد سه تا پنج عدد موش در قفس‌هایی از جنس پلکسی گلاس با درب توری و به ابعاد ۲۵ در ۲۷ در ۴۳ سانتی متر به گونه‌ای نگهداری می‌شود که آزادانه به آب و غذای استاندارد دسترسی داشته باشند. تمامی مراحل نگهداری و کشتار موش‌ها بر اساس ضوابط کمیته اخلاقی حیوانات دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز انجام و در سرتاسر دوره تحقیق موش‌ها توسط یک نفر نیز جا به جا گردیدند.

### نحوه ایجاد دیابت

برای ایجاد دیابت نوع دو، ابتدا نیکوتین آمید ۱۲۰ (mg/kg) به صورت داخل صفاقی به رت‌ها تزریق شد و ۱۵ دقیقه بعد، یک تک دوز STZ یا استرپتوزوتوسین ۶۰ (mg/kg) حل شده در نرمال بافر سیترات ۰/۱ مولار به صورت داخل صفاقی (IP)، به حیوان تزریق گردید (۱۴). سپس برای اطمینان از دیابتی شدن حیوان، میزان افزایش قند خون، ۷۲ ساعت پس از تزریق STZ با استفاده از گلوکومتر مورد ارزیابی قرار گرفت. رت‌هایی که قند ناشتای آن‌ها بیشتر از ۲۵۰ mg/dl بود، به عنوان دیابتی در نظر گرفته شد (۳۰). به دلیل خطر هایپوگلیسمی ناشی از STZ موش‌ها بعد از ۶ ساعت از تجویز STZ تا ۲۴ ساعت بعد محلول گلوکز ۱۰ درصد دریافت کردند (۱۸).

### پروتکل تمرین

یک هفته بعد از القای دیابت، رت‌ها در گروه مداخله ورزشی به مدت ۶ هفته و ۵ روز در هفته بر روی تردمیل تمرین انجام دادند. قبل از شروع تمرینات اصلی

غیر فعال بهبود یافته است (۲۷، ۱۶). Yang و همکاران (۲۰۱۵) طی پژوهشی نشان دادند که پیروپتوزیس از جمله روش‌های مهم مرگ سلولی است که طی آن تحریکات التهابی با ایجاد آبشار التهابی و تغییرات *NLRP3*, *Caspas-1*, *IL18*, *IL-1β* و *HMGB1* همراه است (۳۶)، هم چنین Sumit Kar و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که تمرینات ورزشی پیروپتوزیس را برای جلوگیری از کاردیومیوپاتی دیابتی ناشی از رژیم غذایی پرچرب کاهش می‌دهد (۳۴). با توجه به موارد مطرحه و نقش التهاب در عوارض ناشی از بیماری دیابت و هم چنین اثرات مفید تمرینات ورزشی در کاهش التهاب و پیشگیری از عوارض ثانویه دیابت به خصوص بیماری‌های قلبی-عروقی این پژوهش به بررسی اثرات فعالیت ورزشی بر ژن‌های درگیر در پیروپتوزیس بافت آئورت رت‌های دیابتی و سالم پرداخت.

### مواد و روش‌ها

نمونه‌های پژوهش حاضر را موش‌های آزمایشگاهی تشکیل دادند. با توجه به این که آزمودنی‌ها در آزمایشگاه به لحاظ بسیاری از متغیرها تحت کنترل بودند، از این رو پژوهش حاضر از نوع تجربی می‌باشد.

### جامعه و نمونه آماری

تعداد ۴۰ سر موش صحرائی نر ۸ هفته‌ای با میانگین وزنی  $200 \pm 20$  گرم از مرکز تحقیقات فیزیولوژی اهواز تهیه شد. سپس رت‌ها به صورت تصادفی به چهار گروه سالم و دیابتی تقسیم گردیدند. (۱) گروه‌های سالم: این گروه‌ها شامل ۲۰ سر رت نر ۸ هفته‌ای بودند که به صورت تصادفی به دو گروه کنترل و تمرین هوازی تقسیم‌بندی شدند. (۲) گروه‌های دیابتی: این گروه شامل ۲۰ سر رت نر و بیستار ۸ هفته‌ای بودند. که به صورت تصادفی به دو گروه دیابتی و دیابت+تمرین هوازی تقسیم‌بندی شدند.

RNase، نوکلئازی است که در هنگام پاره شدن سلول ها در بافت خارج می شود و روی سطح پوست و درون مایعاتی هم چون عرق و بزاق، به فراوانی موجود است. از طرفی، RNase به دلیل دارا بودن باند های دی سولفیدی درون زنجیره ای، در مقابل جوشاندن طولانی و دنا تورا سیون ملایم به شدت مقاوم است. بنابراین بهترین راه جهت جلوگیری از بروز مشکل، اجتناب از آلودگی ظروف شیشه ای، لوله ها و سطوح، با این آنزیم است. دقت در ساخت و استفاده از بافر ها و پیپتورها نیز یکی از راه های جلوگیری از بروز مشکل می باشد. در صورت آلودگی بافرها با میکروارگانیزم، تنها راه، تعویض بافر است، زیرا RNase با اتوکلاو کردن از بین نمی رود. لذا هنگام کار با RNA رعایت نکات زیر ضروری است:

۱. تمامی ظروف و پیپت های مورد استفاده باید به ترتیب زیر عاری از آنزیم RNase شوند: ابتدا به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و یا ۲۴ ساعت در دمای اتاق در محلول ۰/۱ درصد DEPC قرار داده شدند تا DEPC از بین برود. وجود DEPC می تواند مانعی در روند بررسی و تجزیه و تحلیل RNA ایجاد کند.
۲. پوشیدن دستکش و زدن ماسک در تمامی مراحل کار با RNA الزامی است.
۳. تمام بافر ها و محلول ها باید در آب مقطر تیمار شده با DEPC تهیه شود.
۴. مراحل استخراج RNA زیر هود که نیم ساعت قبل از آن با UV استریل شده باشد انجام شود [۱۹].

#### روش تجزیه و تحلیل داده ها

در بخش آمار توصیفی از شاخص های مرکزی میانگین و پراکندگی انحراف معیار، و رسم نمودار استفاده شد. در بخش آمار استنباطی جهت تعیین نرمال بودن توزیع داده ها از آزمون کولموگروف -

و به منظور آشناسازی، رت ها به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه با سرعت ۵-۷ متر در دقیقه با شیب صفر درجه برای دو روز متوالی بر روی تردمیل شروع به دویدن کردند. ۲ روز پس از تمرینات آشناسازی، تمرینات اصلی آغاز شدند و رت ها به مدت ۶ هفته به اجرای فعالیت روی تردمیل پرداختند. پروتکل تمرینی هوازی در هفته اول با سرعت ۱۰ متر در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در شیب صفر درجه اجرا شد. در هفته های بعد سرعت و مدت زمان دویدن روی تردمیل افزایش یافت به طوری که حیوانات در هفته دوم با سرعت ۱۰ متر در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه، در هفته سوم با سرعت ۱۴-۱۵ متر در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه، در هفته چهارم با سرعت ۱۴-۱۵ متر در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه و هفته پنجم و ششم با سرعت ۱۸ متر بر دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه روی تردمیل دویدند (۵) (جدول ۱).

#### اندازه گیری مولکولی بیان ژن

برای بررسی بیان ژن *IL-1*، *IL-18*، *NLRP1* و *Caspase-1* در هر گروه بررسی بافت ها با تکنیک PCR Real Time استفاده شد. ابتدا طراحی پرایمر انجام شد و سپس RNA کل از بافت ها استخراج و به cdNA تبدیل گردید. سپس cdNA به روش PCR تکثیر شده و از نظر بیان ژن های ذکر شده مورد بررسی قرار گرفت. این تکنیک دارای ۴ مرحله اساسی می باشد:

۱. RNA کل از سلول های جمع آوری شده در هر گروه استخراج گردید.
۲. با استفاده از آنزیم کپی برداری معکوس به cdNA تبدیل شد.
۳. cdNA حاصل جهت حذف DNA ژنومی با آنزیم DNase I تیمار شد.
۴. به روش PCR Real time تکثیر گردید (۱۹).

اولین و مهم ترین مسئله در هنگام کار با RNA، دقت در جلوگیری از آلودگی با RNase است. آنزیم

سالم (87/75%,  $p=0/0001$ ) نسبت به گروه کنترل دیابت کاهش داشتند. بررسی میانگین و انحراف معیار سطوح  $IL-1\beta$  بافت آئورت رت ها در گروه های مختلف پژوهش نشان می دهد که بیشترین سطوح  $IL-1\beta$  مربوط به گروه کنترل دیابت و کمترین سطوح آن متعلق به گروه سالم تمرین هوازی بود. نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه سطوح  $IL-1\beta$  نشان از وجود تفاوت معنی دار بین گروه های مختلف پژوهش بود ( $p=0/0001$ ). آزمون تعقیبی توکی نشان داد که سطوح  $IL-1\beta$  گروه دیابت تمرین هوازی (70/96%,  $p=0/0001$ )، سالم تمرین هوازی (88/38%,  $p=0/0001$ ) و کنترل سالم (80/96%,  $p=0/0001$ ) نسبت به گروه کنترل دیابت کاهش داشتند. هم چنین سطوح  $IL-1\beta$  بافت آئورت در گروه سالم تمرین هوازی (62/5%,  $p=0/017$ ) از گروه دیابت تمرین هوازی کمتر بود. بررسی میانگین و انحراف معیار سطوح  $IL-18$  بافت آئورت رت ها در گروه های مختلف پژوهش نشان می دهد که بیشترین سطوح  $IL-18$  مربوط به گروه کنترل دیابت و کمترین سطوح آن متعلق به گروه سالم تمرین هوازی بود. نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه سطوح  $IL-18$  نشان از وجود تفاوت معنی دار بین گروه های مختلف پژوهش می باشد ( $p=0/0001$ ). آزمون تعقیبی توکی نشان داد که سطوح  $IL-18$  گروه دیابت تمرین هوازی (72/56%,  $p=0/0001$ )، سالم تمرین هوازی (91/84%,  $p=0/0001$ ) و کنترل سالم (78/20%,  $p=0/0001$ ) نسبت به گروه کنترل دیابت کاهش داشتند. هم چنین سطوح  $IL-18$  بافت آئورت در گروه سالم تمرین هوازی (70/28%,  $p=0/014$ ) از گروه دیابت تمرین هوازی کمتر بود.

اسمیرنوف (KS) استفاده گردید. هم چنین همسان بودن واریانس ها با آزمون لون سنجیده و جهت تعیین معنادار بودن تفاوت بین متغیرها و تعامل آن ها از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی (post hoc Tukey's test) استفاده شد. یافته ها در سطح اطمینان ۹۵٪ ( $P<0/05$ ) بررسی شد. کلیه محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام گردید.

### نتایج

میانگین و انحراف معیار متغیرهای پژوهش در جدول ۳ می توان مشاهده نمود. هم چنین نمودار های ۱ تا ۵ نقطه ذوب و آستانه چرخه (CT) ژن های  $NLRP3$ ,  $IL-18$ ,  $IL-1\beta$ ,  $Caspase-1$ ,  $Beta-Actin$  را نشان می دهد که دارای تک منحنی بوده و اتصال اختصاصی آن ها را نشان می دهد. در مورد ژن  $NLRP3$  بافت آئورت رت ها بیشترین سطح مربوط به گروه کنترل دیابت و کمترین سطح آن متعلق به گروه سالم تمرین هوازی بود. نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه سطوح  $NLRP3$  نشان از وجود تفاوت معنی دار بین گروه های مختلف پژوهش داشت ( $p=0/0001$ ). آزمون تعقیبی توکی نشان داد که سطوح  $NLRP3$  گروه دیابت تمرین هوازی (78/679%,  $p=0/0001$ )، سالم تمرین هوازی (89/92%,  $p=0/0001$ ) و کنترل سالم (79/84% نسبت به گروه کنترل دیابت کاهش داشتند. هم چنین بیشترین سطوح  $Caspase-1$  مربوط به گروه کنترل دیابت و کمترین سطوح آن متعلق به گروه سالم تمرین هوازی بود. نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه سطوح  $Caspase-1$  نشان از وجود تفاوت معنی دار بین گروه های مختلف پژوهش داشت ( $p=0/0001$ ). آزمون تعقیبی توکی نشان داد که سطوح  $Caspase-1$  گروه دیابت تمرین هوازی (86/63%,  $p=0/0001$ )، سالم تمرین هوازی (94/20%,  $p=0/0001$ ) و کنترل

۱. جدول ۱- پروتکل تمرین هوازی

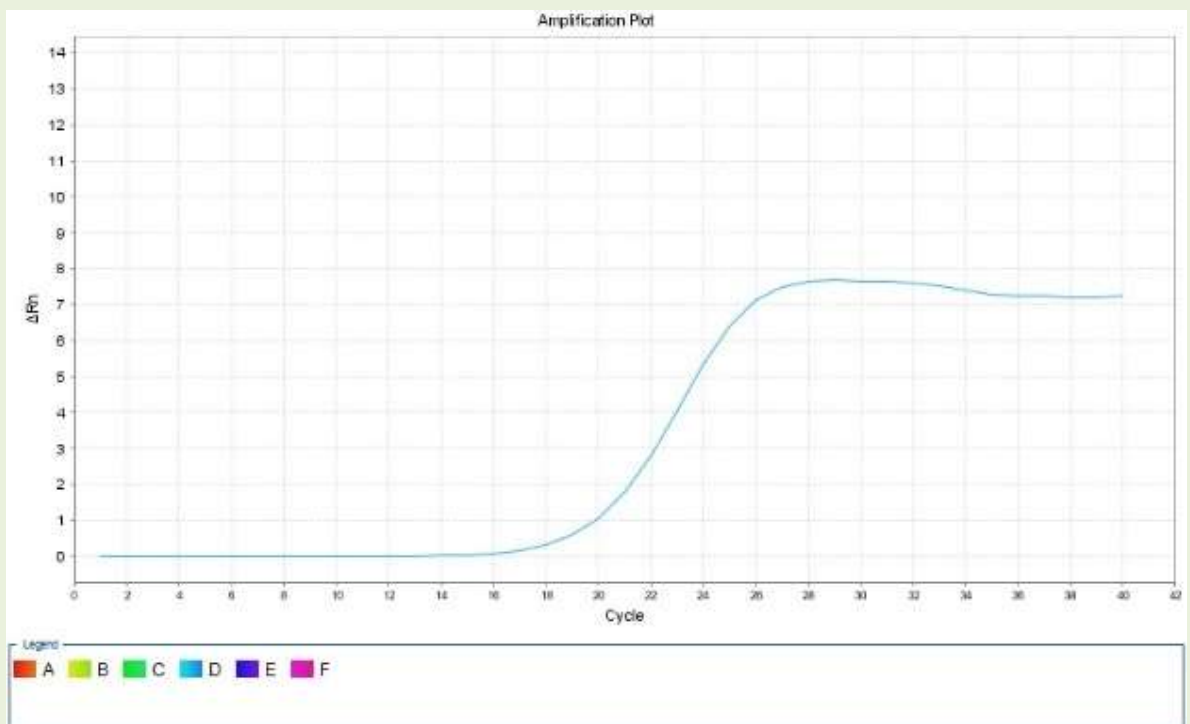
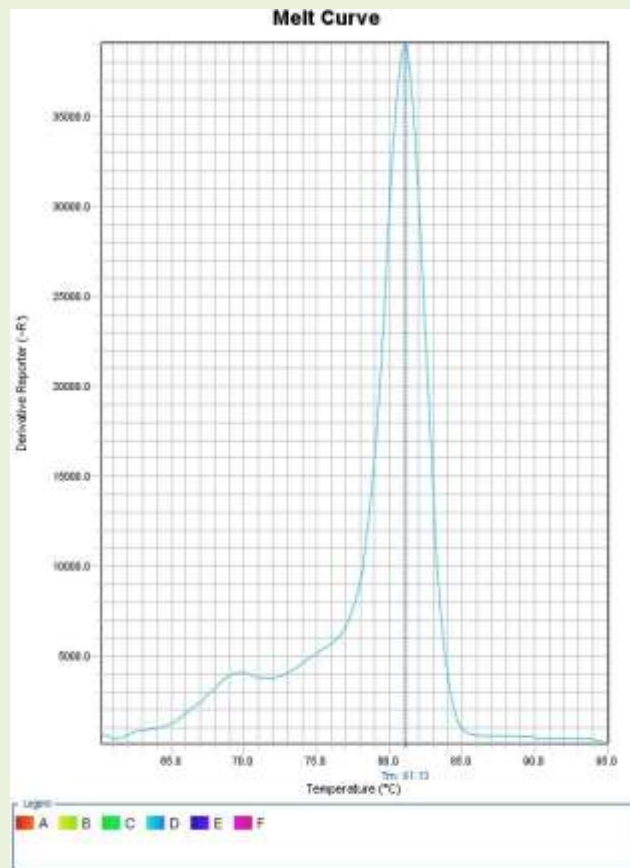
هفته	مدت تمرین	سرعت تمرین
هفته اول	۱۰ دقیقه	۱۰ متر بر دقیقه
هفته دوم	۲۰ دقیقه	
هفته سوم	۲۰ دقیقه	۱۴-۱۵ متر بر دقیقه
هفته چهارم	۳۰ دقیقه	
هفته پنجم	۳۰ دقیقه	۱۸ متر بر دقیقه
هفته ششم	۳۰ دقیقه	

جدول ۲- توالی پرایمرها برای RT-PCR

نام ژن	توالی پرایمرها [5'→3']	نقطه ذوب	سیکل (تعداد)
<i>NLRP3</i>	Fwd: TGTACTAGGCAAGGTTAGTGG Rev: GGAGTGGATAGGTTTGTCTGG	۸۴	۴۰
<i>Caspase- 1</i>	Fwd: GTGGAGAGAAAAGAAGGAGTGGT Rev: GATGAGTGACTGAATGAAGAGG	۸۲	۳۰
<i>IL-1β</i>	Fwd: TGTGACTGGTGGGATGATGA Rev: GTTCTGTCTATTGAGGTGGAGA	۸۴	۳۰
<i>IL-18</i>	Fwd: TATGTGAAGGATGGAAGGATGT Rev: TTGATGTAAGGTAGTAAGAGTGA	۸۳	۴۰
<i>Beta-Actin</i>	Fwd: AATAGACTCCGGCGCTACCT Rev: GAGCTCACACCTCCCTGT	۸۱	۴۰

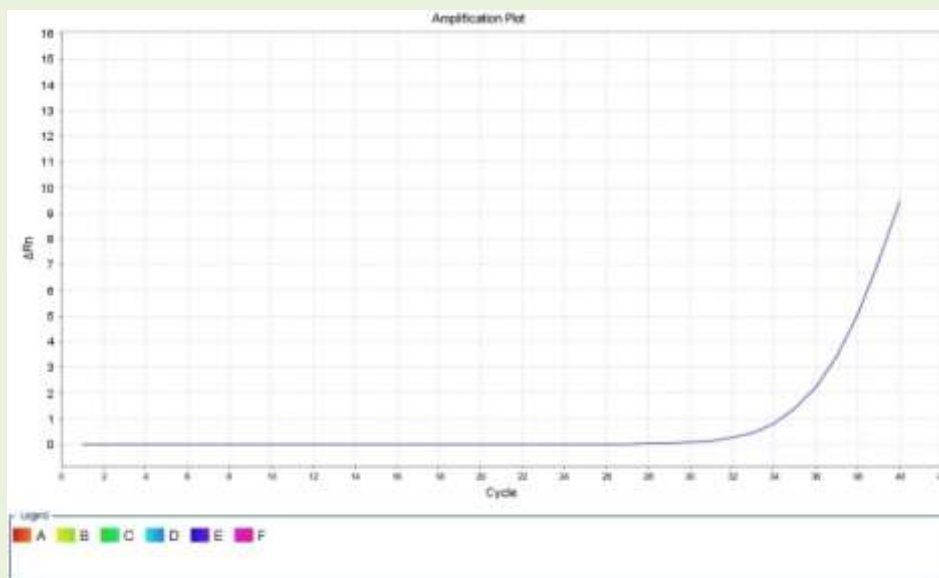
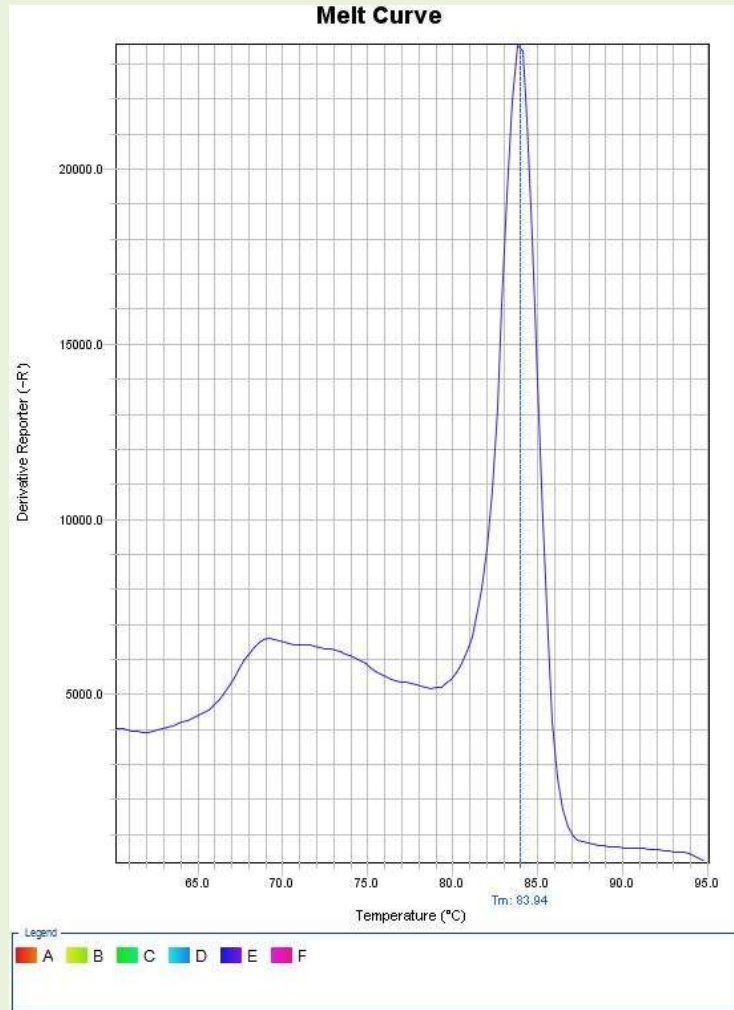
جدول ۳- میانگین ± انحراف معیار ژن های درگیر در مسیر پیروپتوزیس بافت آنورت در گروه های مختلف پژوهش

نوع ژن	کنترل دیابت	دیابت تمرین هوازی	سالم تمرین هوازی	کنترل سالم
<i>NLRP3</i>	۲۷/۶۸±۰/۵۸۸	۲۸/۵۵±۰/۳۸۰	۲۷/۴۳±۰/۷۱۹	۲۵/۳۷±۰/۲۷۸
<i>Casp 1</i>	۳۴/۴۲±۰/۲۱۷	۳۵/۲۱±۰/۳۰۱	۳۴/۰۷±۰/۱۶۲	۳۱/۲۸±۰/۰۵۷
<i>IL-18</i>	۲۳/۰۸±۰/۵۹۷	۲۳/۵۳±۰/۳۰۱	۲۲/۱۹±۰/۱۶۲	۲۰/۴۲±۰/۰۵۷
<i>IL-1β</i>	۱۹/۵۵±۰/۵۱۷	۲۰/۷۸±۱/۰۶	۱۸/۹۹±۰/۴۹۹	۱۷/۴۵±۰/۰۹۷



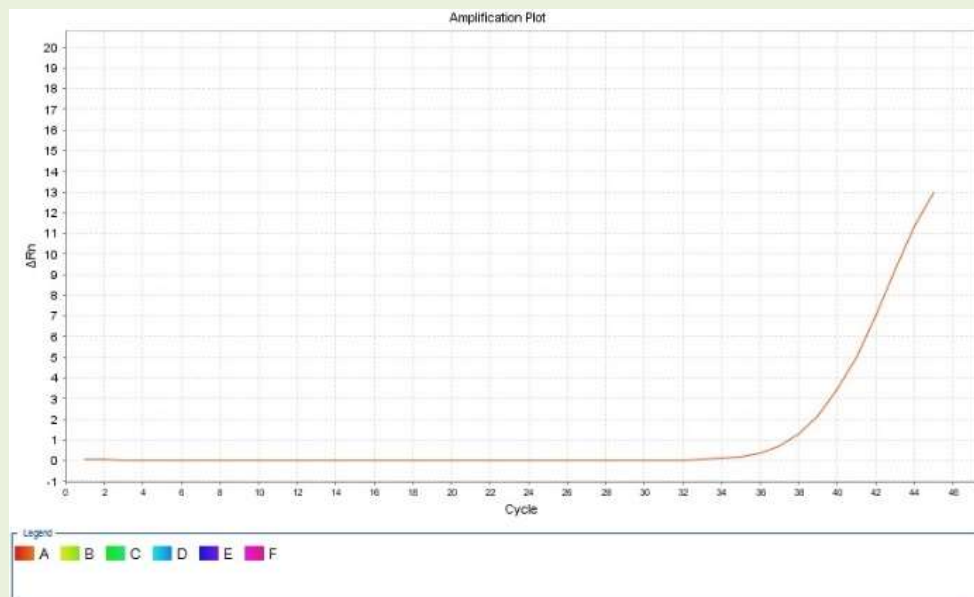
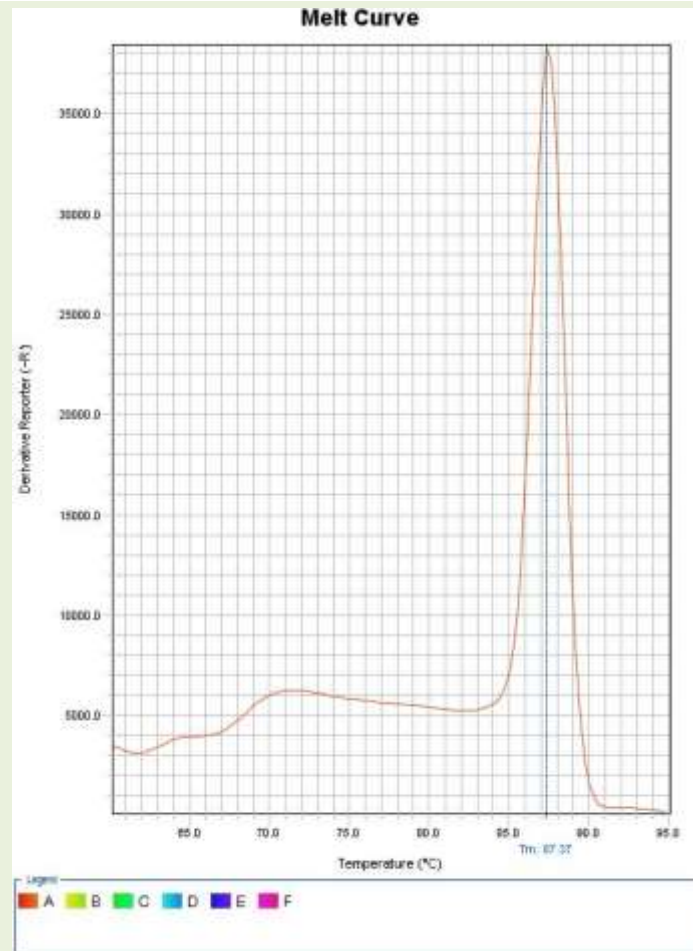
نمودار ۱- منحنی نقطه ذوب (بالا) و آستانه چرخه (پایین) *Beta-Actin*



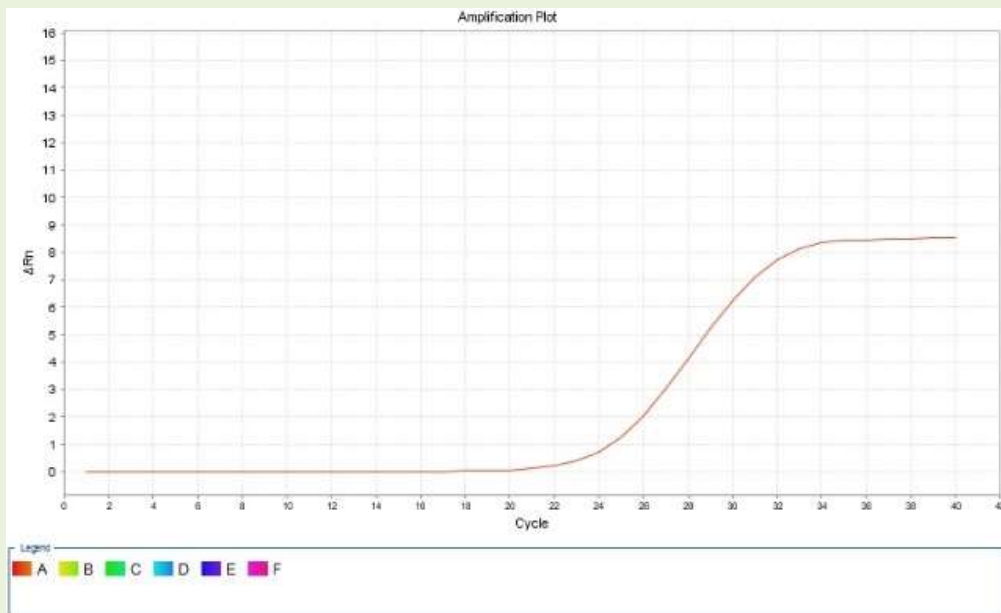
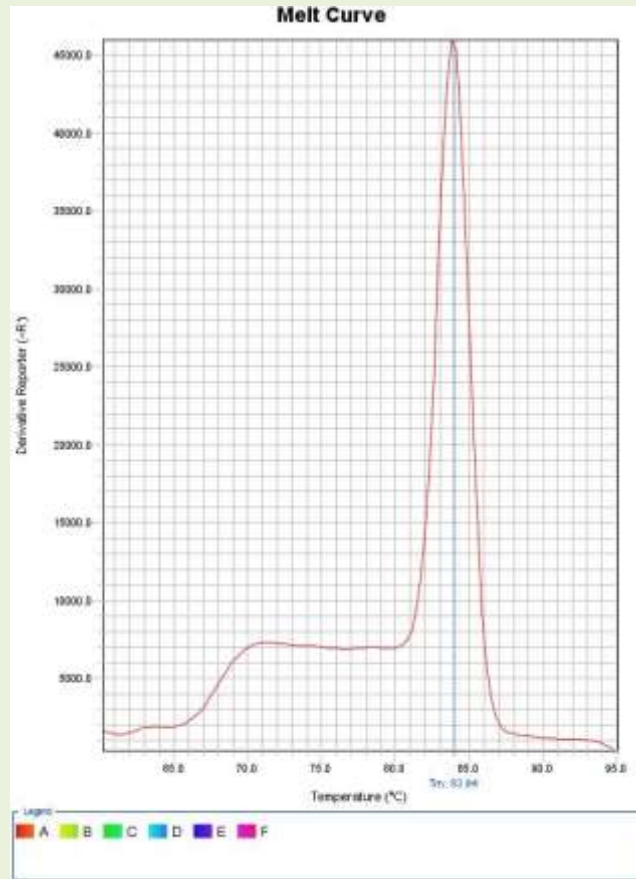


نمودار ۲- منحنی نقطه ذوب (بالا) و آستانه چرخه (پایین) ژن *NLRP3*

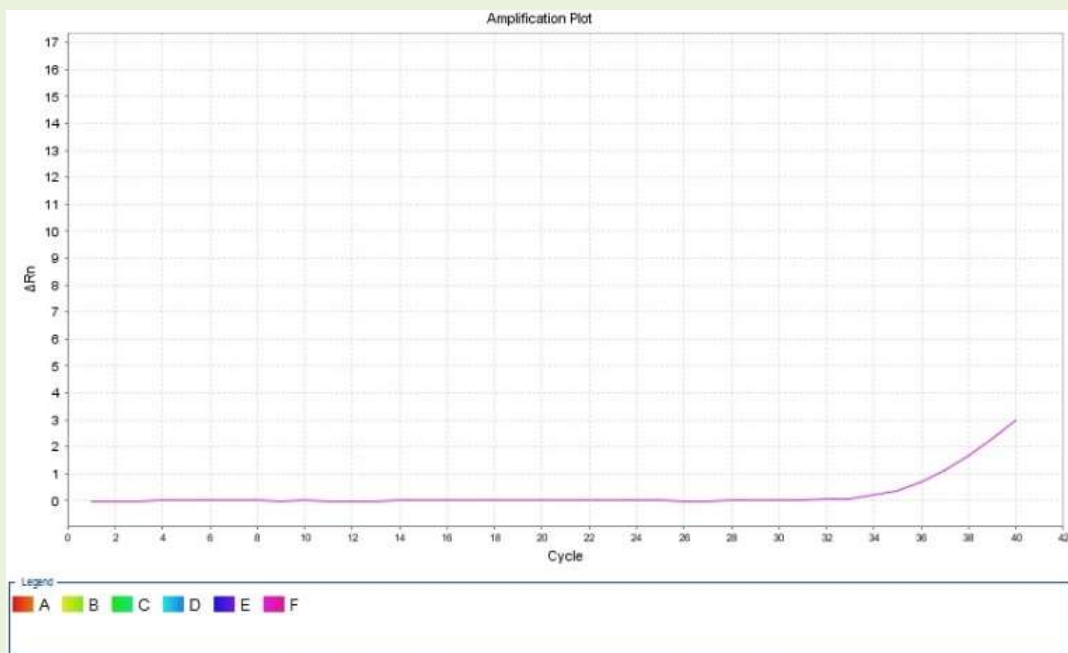
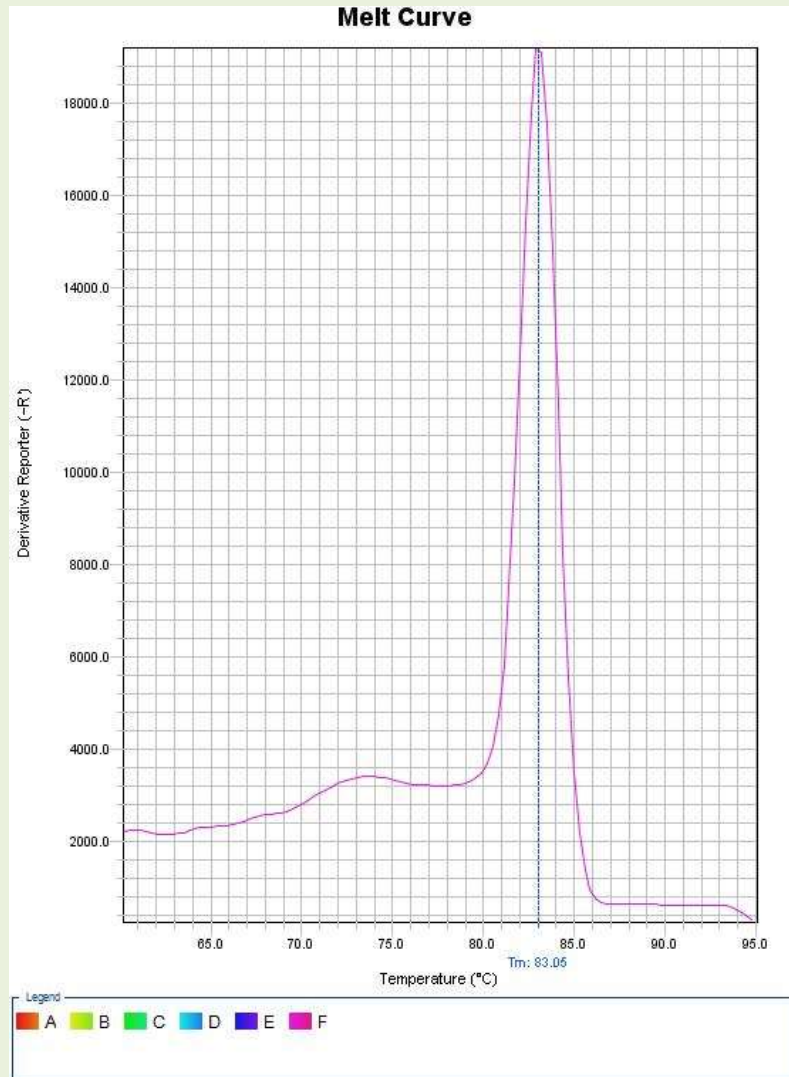




نمودار ۳- منحنی نقطه ذوب (بالا) و آستانه چرخه (پایین) ژن Caspase-1



نمودار ۴- منحنی نقطه ذوب (بالا) و آستانه چرخه (پایین) ژن  $IL-1\beta$



نمودار ۵- منحنی نقطه ذوب (بالا) و آستانه چرخه (پایین) ژن IL-18

## بحث و نتیجه گیری

نتایج پژوهش نشان داد که سطوح بیان ژن های *IL-18*، *IL-1β*، *Caspase-1* و *NLRP3* بافت آنورت در اثر القای دیابت افزایش معنی داری یافتند که با انجام تمرین هوازی منجر به کاهش معنی دار این ژن ها شد هم چنین در گروه تمرین هوازی نسبت به گروه کنترل سالم کاهش داشتیم که این کاهش معنی دار نبود. مطالعات قبلی نشان می دهد که قرارگیری پریسیت ها (pericytes) در معرض گلوکز بالا باعث کاهش تکثیر و القای آپوپتوز می شود (۲). گزارش شده است که مهار مسیر *IL-1β* *Caspase-1* از دست ردادن سلول مولر ناشی از دیابت جلوگیری می کند، این نشان می دهد که پیروپتوزیس می تواند در فرایند مرگ سلول مولر درگیر باشد (۱۱). در پژوهش حاضر القای دیابت سبب فعال شدن مسیر *IL-1β* *Caspase-1* شد، که انجام تمرین هوازی باعث مهار این مسیر شد که ممکن است از این طریق و کاهش پیروپتوز نقش حفاظتی در ابتلا به آترواسکلروز در موش های دیابتی باشد. فعال سازی پیروپتوز در چاقی، سندرم متابولیک و دیابت به خوبی به اثبات رسیده است زیرا آزادسازی *IL-1β* باعث تسریع در مرگ سلول های بتای پانکراس شد (۳۳). در مطالعه ی سومیت کار و همکاران رژیم غذایی پرچرب سه مؤلفه ی اصلی مرگ سلولی پیروپتوز: تشکیل التهاب، فعال سازی کاسپاز-۱، و التهاب ناشی از تولید *IL-1β* را فعال کرد (۳۴). هم چنین، آسیب میتوکندری و تجمع قطرات چربی فعال کننده های قوی التهاب قلبی و پیروپتوزیس هستند (۱۷). وانگ و همکاران ثابت کردند که تمرینات ورزشی سولفید هیدروژن را در کبد از طریق تنظیم افزایشی آنزیم های درگیر در بیوستنز سولفید هیدروژن افزایش می دهد. چندین مکانیسم برای چگونگی محافظت H2S در برابر مرگ سلولی از جمله با کاهش سیتوکین های التهابی مانند *IL-1β* (۲۴)،

تحریک تولید آنتی اکسیدان (۷) و تنظیم کاهشی اتوفازی (۱۵)، نشان داده شده است. در پژوهش حاضر ممکن است کاهش *IL-1β* و *IL-18* و متعاقب آن کاهش کاسپاز-۱ و *NLRP3* در اثر اجرای تمرین هوازی از بافت آنورت در برابر مرگ سلولی محافظت نماید. در پژوهش کن شیراتوو همکاران نشان دادند که ۸ هفته تمرینات اختیاری ترشح *IL-1β* و *IL-18* از ماکروفاژها را تقویت کرد بدون آن که روی سطوح mRNA ی آن ها و یا مسیر سیگنالینگ *MAPK* و *NF-κB* مرتبط با *TLR4* تاثیر بگذارد (۱۲). پیش سازهای بدون رهبر *IL-1β* و *IL-18* نیاز به شکافته شدن بعد از ترجمه توسط کاسپاز-۱ فعال شده با التهاب دارند (۲۶). به نظر می رسد، به احتمال زیاد تمرینات اختیاری منظم روی فعالیت التهاب در ماکروفاژها اثر می گذارند. در واقع، نشان داده شده است که در میان اجزای التهابی *NLRP3* (*NLRP3*، *ASC* و پروکاسپاز-۱)، سطوح پروتئین پروکاسپاز-۱ در ماکروفاژها بعد از فعالیت ورزشی منظم افزایش یافت. فعالیت منظم ورزشی فعالیت پایه ی التهاب ها را توسط افزایش سطوح بستر پروکاسپاز-۱ بالا می برد که بر ایند کارآمدی کاسپاز-۱ تقویت ترشح *IL-1β* و *IL-18* در ماکروفاژها می باشد (۱۲). یوجان وانگ و همکاران نشان دادند که فقدان تخمدان منجر به فعال سازی التهاب *NLRP3* در هیپوکمپ می شود و متعاقباً منجر به افزایش *IL-18* و *IL-1β* در هیپوکمپ شد. که تمرین ورزشی با شدت متوسط توانست فعال سازی التهاب *NLRP3* را معکوس و سطح *IL-18* و *IL-1β* را در هیپوکمپ موش های فاقد تخمدان کاهش دهد (۳۷). التهاب عصبی ناشی از فقدان عملکرد تخمدان منجر به فعال سازی التهاب *NLRP3* می شود که تمرین ورزشی می تواند فعال سازی التهاب *NLRP3* را سرکوب کند، که منجر به بهبود رفتار شبه افسردگی در موش های فاقد تخمدان می شود (۳۷). التهاب عصبی،

تواند فعالیت سمپاتیک و جریان خون را در بافت های مختلف افزایش دهد، که هم چنین ممکن است به مهار فعال سازی التهاب *NLRP3* کمک کند (۳۷). یافته های پژوهش حاضر نشان داد سطوح بیان ژن های *IL-1 $\beta$* ، *IL-18*، *NLRP3* و *Caspase-1* بافت آئورت در اثر القای دیابت افزایش معنی داری یافتند که احتمال دارد از این طریق سبب ابتلا به بیماری قلبی-عروقی گردد، که تمرین منظم ورزشی سطوح بیان ژن های *IL-1 $\beta$* ، *IL-18*، *NLRP3* و *Caspase-1* بافت آئورت و پیروپتوزیس را کاهش داد که ممکن است اثر حفاظتی خود را اعمال نموده و از این طریق از ابتلا به بیماری های عروقی به خصوص آترواسکلروز در مدل تجربی دیابت پیشگیری نماید.

### تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب رساله دکتری در دانشگاه آزاد اسلامی واحد جندی شاپور اهواز با کد اخلاق IR.IAU.M.REC.1399.007 انجام شد. بدین وسیله، نویسندگان تشکر و قدردانی خود را از این واحد دانشگاهی اعلام می دارند.

### منابع

1. Abderrazak, T., Syrovets, D., Couchie, K., El Hadri, B., Friguet, T. (2015). *NLRP3* inflammasome: from a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. *Redox Biol*, 4; 296–307.

2. Byun, B.-J., Kim, Y. S., Lee, I.-S., Kim, J. S. (2017). Homoinositol and its major component, myricitrin, inhibit high glucose-induced apoptosis of human retinal pericytes. *Integrative Medicine Research*, 6(3); 300–309.

3. Brennan, MA., Cookson, BT. (2000). *Salmonella* induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Mol Microbiol*, 38(1); 31–40.

4. Carlsson, LM., Marklund, SL., Edlund, T. (1996). The rat extra cellular super oxide dismutase dimer is converted to a tetramer by

که با تولید بیش از حد سیتوکین های پیش التهابی در مغز همراه است، به عنوان مرکزی از توسعه ی علائم افسردگی و اضطراب مورد توجه قرار گرفته است (۹). بسیاری از مطالعات نشان داده اند که اثرات تمرین ورزشی روی سلامتی به مدت و شدت پروتکل تمرینی بستگی دارد (۲۲). فعالیت ورزشی متوسط (حدود ۶۰–۸۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی) اثرات مفیدی بر عملکرد بافت های مختلف بدن دارد و وضعیت کاهش تعادل اکسیداسیون را بهبود می بخشد (۳۸)، در حالی که یک تمرین ورزشی حاد سنگین می تواند طیف وسیعی از عوارض جانبی از جمله استرس اکسیداتیو پاسخ التهابی ایجاد کند (۱۰). تمرین ورزشی تاثیر بیشتری روی بیان *NLRP3* نسبت به سطح *E2* داشت، این نشان می دهد که تمرین ورزشی فعال سازی التهاب *NLRP3* را از طریق سایر عوامل غیر از افزایش *E2* سرکوب می کند. التهاب *NLRP3* می تواند توسط استرس اکسیداتیو فعال شود (۱). تمرین ورزشی می تواند سطوح و فعالیت سیستم های آنتی اکسیدانی اندوژن (درون زا) را افزایش دهد (۳۷)، ممکن است که فعالیت ورزشی فعال سازی التهاب *NLRP3* را از طریق کاهش استرس اکسیداتیو سرکوب کند، مشخص شده است که تمرین ورزشی می the exchange of a single amino acid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93; 5219–5222.

5. Chae, CH., Jung, SL., An, SH., Jung, CK., Nam, SN., Kim, HT. (2011). Treadmill exercise suppresses muscle cell apoptosis by increasing nerve growth factor levels and stimulating p-phosphatidylinositol 3-kinase activation in the soleus of diabetic rats. *J Physiol Biochem*, 7; 235–241.

6. Chae, JJ., Cho, YH., Lee, GS., Cheng, J., Liu, PP., Feigenbaum, L. (2011). Gain-of-function Pylrin mutations induce *NLRP3* protein-independent interleukin-1 $\beta$  activation and severe autoinflammation in mice. *Immunity*, (5); 755–68.

7. Contreras, C., González-García, I., Martínez-Sánchez, N., Seoane-Collazo, P., Jacas, J., Morgan, D.A. (2014). Central ceramide-induced hypothalamic lipotoxicity and ER

- stress regulate energy balance. *Cell Rep*, 9; 366–377.
8. Fink, S.L., Cookson, B.T. (2006). *Caspase-1*-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell Microbiol*, 8(11); 1812–25.
9. Fyre, H., Baune, B.T. (2012). Neuroplastic changes in depression: a role for the immunesystem. *Psycho Neuroendo Crinology*, 37; 1397–1416.
10. Ji, H., Miao, W., Ma, J., Xv, Z., Bo, H., Li, J. (2016). Acute exercise-induced mitochondrial stress triggers an inflammatory response in the myocardium via *NLRP3* inflammasome activation with mitophagy. *Oxid. Med. Cell. Longevity*, 19; 87-149.
11. Jinhua, Gan., Liu, L., Fangyuan Xu. (2020). High glucose induces the loss of retinal pericytes partly via *NLRP3*-*Caspase-1*-*GSDMD*-mediated pyroptosis. *Hindawi. BioMed Research International*. Article ID 4510628, 12 pages.
12. Ken, Sh., Kazuhiko, I., Takuya, S. (2017). Regular voluntary exercise potentiates interleukin-1 $\beta$  and interleukin-18 secretion by increasing *Caspase-1* expression in murine macrophages. *Hindawi, Mediators of Inflammation*. Article ID 9290416, 11 pages.
13. Khaleeli, E., Peters, S. R., Bobrowsky, K., Oudiz, R. J., Ko, J. Y., Budoff, M.J. (2001). Diabetes and the associated incidence of subclinical atherosclerosis and coronary artery disease: implications for management. *Am. Heart J.*, 141; 637–644.
14. Malekshahi Nia, H., Dekhoda, MR., Ahangarpour, A., Rajabi, H. (2018). The effect of 6 weeks aerobic training on insulin resistance, nitric oxide and some lipid profiles of type 2 diabetic male rats. *Jundishapur Sci Med J*, 17(4); 401-413. [Farsi]
15. Menu, P., Mayor, A., Zhou, R., Tardivel, A., Ichijo, H., Mori, K., Tschopp, J. (2012). ER stress activates the *NLRP3* inflammasome via an UPR-independent pathway. *Cell Death Dis.*, 3, e261.
16. Minami, A., Ishimura, N., Harada, N., Sakamoto, S., Niwa, Y., Nakaya, Y. (2002). Exercise training improves acetylcholine-induced endothelium-dependent hyperpolarization in type 2 diabetic rats, Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *Atherosclerosis*, 162; 85–92.
17. Mishra, P.K., Adameová, A., Hill, J.A., Baines, C.P., Kang, P.M., Downey, J. (2019). Guidelines for evaluating myocardial cell death. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*, 317; H891–H922.
18. Palsamy, P., Subra Mahian, S. (2008). Reaveratrol, a natural phytoalexin normalizes hyperglycemia in streptozotocin nicotinamide induced experimental diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 62; 598 – 605.
19. Panahzadeh, F., Mirnasuri, R., Rahmati, M. (2020). The effect of endurance training on the expression of *PRDX6* and *KAT2B* genes in hippocampus of beta amyloid-induced rat model of Alzheimer's disease: An Experimental Study. *J Rafsanjan Univ Med Sci*, 19(5); 485-98. [Farsi]
20. Paramel Varghese, G., Folkersen, L., Strawbridge, R. J., Halvorsen, B., Yndestad, A., Ranheim, T. (2016). *NLRP3* inflammasome expression and activation in human atherosclerosis. *J. Am. Heart Assoc*, 5; e003031.
21. Paterniti, I., Di Paola, R., Campolo, M., Siracusa, R., Cordaro, M., Bruschetta, G. (2015). Palmitoyl ethanolamide treatment reduces retinal inflammation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol*, 769; 313–323.
22. Reaburn, P., Stanton, R. (2014). Exercise and the treatment of depression: a review of the exercise program variables. *J. Sci. Med. Sport*, 17; 177–182.
23. Rader, D. J. (2012). IL-1 and atherosclerosis: a murine twist to an evolving human story. *J. Clin. Invest*, 122; 27–30.
24. Rios, E.C.S., Szczesny, B., Soriano, F.G., Olah, G., Szabo, C. (2015). Hydrogen sulfide attenuates cytokine production through the modulation of chromatin remodeling. *Int. J. Mol. Med*, 35; 1741–1746.
25. Ruiz, S., Pergola, P. E., Zager, R. A., Vaziri, N. D. (2013). Targeting the transcription factor Nrf2 to ameliorate oxidative stress and inflammation in chronic kidney disease. *Kidney Int*, 83; 1029–1041.
26. Rubartelli, A., Carta, S., Laviere, R. (2013). Different members of the IL-1 family come out in different ways: DAMPs vs. cytokines? *Frontiers in Immunology*, 4; article 123.
27. Sakamoto, S., Minami, K., Niwa, Y., Ohnaka, M., Shima, K. (1998). Effect of exercise training and food restriction on endothelium-dependent relaxation in the Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rat, a model of spontaneous NIDDM. *Diabetes*, 47; 82–86.



28. Sharma, A., Tate, M., Mathew, G., Vince, JE., Ritchie, RH., de Haan, JB. (2018). Oxidative stress and NLRP3-inflammasome activity as significant drivers of diabetic cardiovascular complications: therapeutic implications. *Front. Physiol*, 9; 114.
29. Shi, X., Xie, W. L., Kong, W. W., Chen, D., (2015). Expression of the *NLRP3* inflammasome in carotid atherosclerosis. *J. stroke cerebrovasc. Dis.*, 24; 2455–2466.
30. Shirwaikar, A., Rajendran, K., Punitha, ISR. (2005). Antidiabetic activity of alcoholic stem extract of *Coscinium fenestratum* in streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 97; 369–374.
31. Sigal, RJ., Kenny, GP., Wasserman, DH., Castaneda-Sceppa, C., White, RD. (2006). Physical activity/exercise and type 2 diabetes: a consensus statement from the American Diabetes Association. *Diabetes Care*, 29; 1433–1438.
32. Skerrett, PJ., Horton, E. (2002). Exercise and diabetes prevention: reduction in risk of coronary heart disease. In: *Handbook of Exercise in Diabetes*, edited by Ruderman NB, Devlin JT, Schneider SH, and Kriska A. Alexandria: American Diabetes Association, 155–182.
33. Strowig, T.; Henao-Mejia, J.; Elinav, E.; Flavell, R. (2012). Inflammasomes in health and disease. *Nature*, 481, 278.
34. Sumit, Kar., Hamid, R. (2019). Exercise training promotes cardiac hydrogen sulfide biosynthesis and mitigates pyroptosis to prevent high-fat diet-induced diabetic cardiomyopathy. *Antioxidants*, 8; 638.
35. Wilding, J. P. H. (2018). Medication use for the treatment of diabetes in obese individuals. *Diabetologia*, 61; 265–272.
36. Yang, Y. Giang, J. Ghang, P. Fan, J. (2015). Programmed cell death and its role in inflammation. *Military Medical Research*, 2; 12.
37. Yujun, W., Yongjun, Xu. (2016). Exercise amelioration of depression-like behavior in OVX mice is associated with suppression of NLRP3 inflammasome activation in hippocampus. *Behavioural Brain Research*, 307; 18–24.
38. Zapasi, Z.F., Catlin, P.A., Beck, J. (2001). The role of endogenous opioids in moderate exercise training-induced enhancement of the secondary antibody response in mice, *Phys. Ther*, 81; 1801–1809.





# The Effect of Six Weeks of Aerobic Exercise on the Expression of Genes Involved in Aortic Tissue Pyroptosis of Healthy and Diabetic Male Mice

S. Hasanpor Soleimani <sup>1</sup>, A. Abbasi-Dalooi <sup>2</sup>, A. Abdi <sup>3</sup>, SH. Zilaei Bouri <sup>4</sup>

1. PhD student of Exercise Physiology, Department of Physical Education & Sport Sciences, Islamic Azad University, Ayatollah Amoli Branch Amol, Iran.

2. Associate Professor, Department of Physical Education & Sport Sciences, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran. [abbasi.dalooi@gmail.com](mailto:abbasi.dalooi@gmail.com).

3. Associate Professor, Department of Physical Education & Sport Sciences, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.

4. Assistant Professor, Department of Physical Education & Sport Sciences, Masjed Soleiman Branch, Islamic Azad University, Masjed-Soleiman, Iran.

Received: 2021.11.12

Accepted: 2022.5.2

## Abstract

**Introduction & Objective:** In diabetes, inflammatory processes play a key role and affect all the complications of diabetes. Inflammation is associated with the caspase-1 process, which activates the anti-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18, leading to the death of inflammatory proteins, which is one of the occurrences of pyroptosis. The aim of this study was to investigate the effect of six weeks of aerobic exercise on the expression of genes involved in aortic tissue apoptosis in healthy and diabetic mice.

**Materials and Methods:** For this purpose, forty male rats (8 weeks old) were divided into 4 groups (10 in each group) after familiarization with exercise protocol: 1) control-healthy, 2) control-diabetes, 3) exercise-diabetes, and 4) exercise. -Healthy. Diabetes model was first induced, then run for 5 days on treadmill for 6 weeks. After 12 to 14 hours of fasting and 72 hours after the last training session, aortic tissue sampling was performed for IL-1 $\beta$ , IL-18, NLRP3 and Caspase-1 analysis by Real Time PCR technique. Data analysis was performed using one-way ANOVA, if significant difference was seen by Tukey post hoc test to determine the difference between groups ( $P < 0.05$ ).

**Results:** Induction of diabetes led to a significant increase in IL-1 $\beta$ , IL-18, NLRP3 and Caspase-1 genes expression in rat aorta, which resulted in a significant decrease in aerobic exercise. Also, aerobic exercise in healthy mice also decreased the expression of IL-1 $\beta$ , IL-18, NLRP3 and Caspase-1 gene in aortic tissue.

**Conclusion:** Aerobic exercise may be used as an effective non-pharmacological method to improve diabetes-induced inflammation and prevent vascular disorders.

**Keywords:** Diabetes, Regular Aerobic Exercise, Pyroptosis, NLRP3.