زیست‌شناسی جانوری، سال پانزدهم، شماره سوم، بهار ۱۴۰۲، صفحات ۷۶- ۶۵

مقاله پژوهشی

آثار هشت هفته تمرین تناوبی شدید (HIIT) بر بیان پروتئین‌های GPR120 و AMPK در بافت قلبی موش‌های نر دیابتی

ابراهیم حسینی حوری‌پسند، سعید دباغ نیکوخصلت*، جواد وکیلی

گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

*مسئول مکاتبات: nikookheslat@tabrizu.ac.ir

DOI: 10.22034/ascij.2023.1956548.1379

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۱۱

چکیده

فرآیند انتقال معکوس کلسترول نقش مثبتی در کاهش پلاک‌های آترواسکلروزیس در طی بیماری دیابت دارد. لذا، هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر هشت هفته تمرینات تناوبی با شدت بالا روی پروتئین‌های GPR120 و AMPK در بافت قلبی موش‌های مبتلاء به دیابت نوع دو بود. در طرحی تجربی، ۴۰ سر موش صحرایی نر ویستار سه ماهه با میانگین وزنی (۳۰۰-۲۲۵ گرم) به طور تصادفی در چهار گروه ۱۰ سری شامل: کنترل سالم (C: تزریق درون صفاقی سرم سالین)، سالم تمرین کرده (T: دویدن با شدت ۹۰- ۸۵ درصد سرعت بیشینه در ۶ الی ۱۲ وهله‌ی دو دقیقه‌ای؛ ۵ روز در هفته به مدت هشت هفته)، کنترل دیابتی (D: دیابتی شده با رژیم غذایی پرچرب همراه با تزریق درون صفاقی استرپتوزوسین) و دیابتی تمرین کرده (D+T: دیابتی شده به همراه تمرین) تقسیم شدند. برای تعیین تغییرات در نیمرخ بیان پروتئین‌های GPR120 و AMPK در بافت عضله‌ی قلبی (بطن چپ) موش‌ها از روش مبتنی بر روش وسترن بلات استفاده شد. از تحلیل واریانس دو طرفه و آزمون پس‌تعقیبی بونفرونی برای تحلیل داده‌ها استفاده گردید. القاء دیابت (D) موجب کاهش معنی‌دار پروتئین‌های GPR120 و AMPK می‌گردد ($p \leq ۰/۰۵$). در حالیکه اعمال تمرین HIIT در گروه سالم تمرین کرده (T) باعث افزایش ۸۱ و ۴۷ درصد به‌ترتیب در میزان GPR120 و AMPK در مقایسه با گروه کنترل دیابتی (D) می‌شود ($p = ۰/۰۰۱$). همچنین، مداخله‌ی تمرین توانایی جلوگیری از کاهش در هردوی پروتئین در گروه دیابتی تمرین کرده (D+T) در مقایسه با گروه دیابتی (D) می‌گردد ($p = ۰/۰۲۳$). بر اساس یافته‌های این مطالعه می‌توان اظهار داشت که، هشت هفته تمرینات تناوبی با شدت بالا (HIIT) یک راهکار پیشگیرانه در مقابل کاهش فعالیت پروتئین‌های GPR120 و AMPK درگیر در مسیر پیام‌رسانی انتقال معکوس کلسترول در طی ابتلاء به بیماری دیابت نوع دو دارد.

کلمات کلیدی: تمرین تناوبی با شدت بالا، آترواسکلروز، دیابت نوع دو، انتقال معکوس کلسترول.

مقدمه

امروزه دیابت به‌عنوان یکی از مهم‌ترین مشکلات بهداشتی-درمانی و اجتماعی-اقتصادی توجه بسیاری از سیاست‌گذاران بهداشت جهانی را به سوی خود جلب کرده است. تغییرات عروقی ناشی از این بیماری خاموش، شایع می‌باشد و حتی در غیاب بیماری عروقی آشکار، اختلال عملکرد اندوتلیالی ممکن است علت اصلی بسیاری از مشکلات پیش‌آمده از جمله آترواسکلروز باشد (۳، ۲۱). تجمع سلول‌های فوم

(Foam) ماکروفاژ مملو از کلسترول در دیواره شریان، مشخصه تصلب شرایین یا آترواسکلروزیس می‌باشد. تشکیل سلول‌های فوم درنتیجه عدم تعادل بین میزان جذب کلسترول-LDL و انتقال معکوس کلسترول است. انتقال معکوس کلسترول از سلول‌های فوم ماکروفاژ فرایندی است که طی آن کلسترول از دیواره شریانی برداشته شده و برای متابولیسم و دفع بیشتر از طریق کلسترول-HDL به کبد منتقل می‌گردد (۱۸، ۲۰). از این رو، بررسی مسیرهای پیام‌رسانی که منجر به افزایش انتقال معکوس کلسترول می‌شوند برای توسعه مداخلات درمانی آینده بسیار مهم هستند (۱۴). در این راستا، یکی از پروتئین‌های محوری در مطالعه‌ی این مسیرها پروتئین GPR120 (G protein-coupled receptor 120) می‌باشد. GPR120 یک گیرنده جفت شونده با پروتئین G (GPCR) و نیز شناخته شده به‌عنوان گیرنده نوع چهار اسید چرب آزاد (FFAR4) که بطور خاص دارای آثار ضدالتهابی و حساس کننده به انسولین اسیدهای ایکوزاپنتانوئیک (EPA) و دوکوزاهگزانوئیک (DHA) در ماکروفاژها و افزایش دهنده‌ی جذب گلوکز و القاء آدیپوژنز در سلول‌های چربی است (۲).

با این حال، نقش GPR120 درتنظیم انتقال معکوس کلسترول به‌عنوان یکی از عملکردهای اساسی برای تعادل هومئوستاز چربی‌های ماکروفاژها هنوز نامعلوم است (۱۴). در پژوهشی آن و همکاران (۲۰۲۰) بیان کردند که GPR120 به‌عنوان یک گیرنده هفت غشائی (Seven transmembrane receptor(7-TM))، ممکن است از طریق مسیر پروتئین‌کیناز وابسته به کلسیم/کالمودولین (Ca^{2+}/CaMMK) باعث فعال شدن پروتئین AMPK شده و سپس انتقال کلسترول را در سلول‌های خط THP-1 ماکروفاژها افزایش دهد.

اخیراً، شواهد فزاینده‌ای نشان می‌دهند که فسفوریلاسیون باقیمانده Thr172 در زیرواحد AMPKα یک اثر محافظتی عروقی را در برابر تشکیل سلول‌های فوم ماکروفاژ از طریق بالابردن انتشار معکوس کلسترول از ماکروفاژها نشان می‌دهد (۲). این در حالی است که، شواهد روبه رشدی پیشنهاد کننده‌ی این موضوع است که مسیرها و پروتئین‌های وابسته به انتقال معکوس کلسترول ممکن است توسط برخی از مداخلات دارویی و فیزیولوژیایی مورد تأثیر قرار گیرند (۲، ۱۱).

در این زمینه، گاسپر و همکاران (۲۰۱۸) با مطالعه‌ی گیرنده‌های GPR120/40 در بافت کبدی موش‌های چاق و مبتلاء به دیابت نوع دو اظهار داشتند که انجام چهار هفته فعالیت‌بدنی مزمن (۵ روز در هفته، دویدن بر روی نوارگردان با شدت ۶۰ درصد بارکاری اوج) با و بدون تجویز روغن بذر کتان غنی از اُمگا-۳ سبب افزایش در بیان گیرنده‌ی GPR120، فعال‌سازی بتا-آریستن-۲ (β-arrestin-2) و کاهش در پاسخ التهابی می‌گردد (۱۱).

به‌علاوه، گروه تحقیقاتی بختیاری و همکاران (۲۰۲۱) با بررسی دو نوع شدت تمرینی بیان نمودند، تمرینات تناوبی با شدت بالا (۹۰-۸۵٪ VO_{2max}) در مقایسه با تمرینات تداومی با شدت متوسط (۵۰-۴۵٪ VO_{2max}) سبب افزایش در بیان پروتئین AMPK به‌عنوان پروتئین دخیل در آبشار وابسته به گیرنده GPR120 در موش‌های سالمند می‌شود (۵).

در دهه‌های اخیر به خوبی نشان داده شده است که استفاده از تمرینات تناوبی با شدت بالا ((HIIT) high-intensity interval training) می‌تواند جایگزین بمراتب بهتری در مقایسه با تمرینات تداومی با شدت متوسط ((MICT) Medium intensity continuous exercises) برای افراد دیابتی جهت کنترل و بهبود علائم وابسته به بیماری باشد. از این منظر، آثار و

ویژگی‌های سلولی-مولکولی ناشی از این‌گونه تمرینات بر سلسله مسیرهای پیام‌رسانی سوخت-وسازی به درستی درک نشده و نیز نتایج قطعی در این زمینه وجود ندارد (٤). بنابراین، تحقیق پیش‌رو باتوجه به وجود مطالعات محدود، به بررسی تأثیر اعمال تمرینات تناوبی شدید (HIIT) بر میزان بیان برخی از پروتئین‌های کلیدی مسیر وابسته به انتقال معکوس کلسترول یعنی پروتئین‌های GPR120 و AMPK در بافت سوماتیک قلبی متعاقب القای دیابت نوع دو در موش‌های نر ویستار می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر از نوع مطالعات حیوانی بالینی مداخله‌ای تجربی در قالب یک طرح پس‌آزمون دو عاملی است که با استفاده از چهار گروه ۱۰ سری از موش‌ها بر اساس مقررات نحوه کار با حیوانات آزمایشگاهی در محل آزمایشگاه حیوانی علوم رفتاری مرکز تحقیقات آناتومی دانشگاه علوم پزشکی ایران پس از تصویب در کمیته‌ی اخلاق در پژوهش از دانشگاه تبریز IR.TABRIZU.REC.1400.061 انجام شد. بدین منظور، تعداد ٤٠ سر موش‌های صحرایی نر سفید نژاد ویستار به روش در دسترس از مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی مدزیست کرج با سن حدود سه ماه و در محدوده‌ی وزنی ۲۲۵ الی ۳۰۰ گرمی انتخاب شدند. در ادامه، به‌منظور ایجاد حالت سازش با محیط، جلوگیری از استرس و تغییر شرایط فیزیولوژیایی، شرایط تمامی مداخلات پس از گذشت دست کم دو هفته استقرار حیوانات و آغاز چرخه‌ی روزانه-شبانه در آزمایشگاه حیوانات انجام شد. به‌طوری‌که آزمودنی‌ها در محیط آزمایشگاهی ویژه حیوانات با دارا بودن شرایط ذیل؛ دما ۲±۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۵±۵۰ درصد، با کمترین سروصدا و چرخه‌ی روشنایی-تاریکی ۱۲:۱۲ ساعته (شروع روشنایی از ساعت ٦:۰۰ صبح الی ۱۸:۰۰ عصر) به‌صورت ۳ تا ۵ عدد موش در هر قفس از جنس پلی‌کربنات شفاف قرار داده شدند. در طی این دوره، تمامی حیوانات به‌صورت آزادانه به آب و غذای استاندارد حیوانی (پلت تهیه شده از شرکت خوراک‌سازان بهپرور) به‌مدت سه ماه (فصل پاییز) دسترسی داشتند که این میزان غذای مصرفی به‌صورت دقیق اندازه‌گیری و ثبت شد. به‌علاوه، در این تحقیق از آن دسته موش‌های صحرایی استفاده گردید که در شرایط طبیعی بدون برقراری حالت روزه‌داری، میزان گلوکز سرم آن‌ها پائین‌تر از ۲۵۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر بود. سپس موش‌ها در پایان این دوره (سازگاری)، پس از مطابقت وزنی ابتدا به‌طور تصادفی ساده در یکی از دو گروه ۲۰ سری سالم و دیابتی تقسیم شدند؛ پس از القای دیابت که در ادامه توضیح داده خواهد شد، موش‌ها در یکی از گروه‌های کنترل سالم (C)، سالم تمرین کرده (T)، کنترل دیابتی (D) و دیابتی تمرین کرده (D+T) جایگزین شدند.

روش القاء دیابت: پس از گذشت دو هفته از شرایط سازگاری با محیط آزمایشگاه، برای القای دیابت نوع دو، طبق روش گروه مطالعاتی ساسیدهاران و همکاران (۲۰۱۳)، دو هفته مصرف غذای پُرچرب (٤٥ درصد چربی، ۲۱ درصد پروتئین و ۳٤ درصد کربوهیدرات) که توسط محققان و با همکاری شرکت خوراک‌سازان بهپرور تهیه و سپس تزریق درون صفاقی سم استرپتوزوسین (STZ) (شرکت سیگما آلدریچ، آمریکا) در یک دوز ۳۵ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن حل شده در بافر سیترات ۰/۱ مولار (PH=٤/٥) بعد از شش ساعت ناشتایی به‌صورت تک وهله‌ای اعمال شد (۱۷). برای گروه‌های کنترل سالم و تمرین نیز همان مقدار سرم فیزیولوژیک (سالین) برای ایجاد شرایط کاملاً یکسان با گروه‌های دریافت کننده‌ی STZ تزریق گردید. یک هفته پس از روش دیابتی

کردن، میزان گلوکز نمونه خونی از ورید دُمی حیوان جمع‌آوری و با استفاده از روش آنزیمی گلوکز اُکسیداز بررسی و غلظت گلوکز خون بالاتر از ۲۵۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر به‌عنوان موش‌های صحرایی دیابتی نوع دو وارد تحقیق شدند (۸). به‌منظور کنترل وزن، وزن موش‌های صحرایی در ابتدا، وسط و انتهای تحقیق توسط ترازوی دیجیتالی انجام گردید.

پروتکل تمرینی: موش‌های دو گروه تمرینی تحقیق حاضر (T+D و T) برای ۵ روز در هفته (شنبه، یکشنبه، سه‌شنبه، چهارشنبه و پنج‌شنبه) برای مدت ۸ هفته در یک برنامه‌ی تمرین تناوبی شدید (HIIT) در پایان دوره استراحتی و شروع فعالیت حیوانات (ساعت ۱۹ عصر) بر روی نوارگردان الکترونیکی هوشمند حیوانی (Bionic mobin مُدل DSI-580، ساخت شرکت کیمیا کهربای مبین، تهران، ایران) شرکت نمودند. قبل از اجرای پروتکل، آزمون رسیدن به واماندگی بیدفورد (Bedford) و همکاران (۱۹۷۹) برای محاسبه‌ی سرعت بیشینه موش‌ها انجام گرفت. بطوری‌که، سرعت دویدن با ۱۰ متر بر دقیقه شروع و در هر سه دقیقه یک‌بار، سرعتی معادل با سه متر بر دقیقه به آن تا زمان رسیدن به حالت واماندگی افزوده شد. زمان رسیدن به خستگی با عدم توانایی موش‌ها در دویدن روی نوارگردان باوجود ایجاد شوک الکتریکی مشخص گردید (۱۳). به‌طوری‌که میانگین بیشینه سرعت بدست آمده به‌هنگام واماندگی معادل ۲۵±۳ متر بر دقیقه بود. روش تمرین HIIT شامل سه مرحله‌ی گرم‌کردن، بدنه‌ی اصلی تمرین و سرد کردن بود. تمرینات در مرحله‌ی گرم و سرد کردن بمدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰ متر در دقیقه (معادل با شدت ۴۰-۳۰ درصد VO_{2max}) برای موش‌ها در نظر گرفته شد. بدنه‌ی اصلی تمرین نیز برابر با شدت ۹۰-۸۵٪ سرعت بیشینه در آزمون وامانده ساز (تقریباً برابر با ۲۵/۵-۲۴ متر بر دقیقه) سرعت بیشینه در ۶ تا ۱۲ وهله (هر هفته یک نوبت به وهله‌های فعالیتی حیوانات اضافه گردید) بود. به‌علاوه، تناوب‌های سه دقیقه‌ای استراحت فعال که شامل دویدن‌های ادامه‌دار روی نوارگردان با سرعت ۱۰ متر در دقیقه بود که میان وهله‌های فعالیتی اعمال گردید. همچنین، دو گروه کنترل سالم (C) و کنترل دیابتی (D) که در هیچگونه برنامه‌ی فعالیتی شرکت نکردند، برای ایجاد شرایط کاملاً یکسان با سایر گروه‌های تمرینی، ۵ روز در هفته بمدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در هر جلسه برای سازگاری با محیط بر روی نوارگردان بی‌حرکت قرار داده شدند. به‌منظور تحریک موش‌ها برای دویدن از محرک الکتریکی با وُلتاژ کم تعبیه شده در قسمت عقبی نوارگردان، استفاده گردید.

روش وسترن بلاتینگ: تمامی موش‌های صحرایی، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه‌ی تمرینی (جهت از بین بردن اثرات حاد تمرین) و پس از ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتایی، با تزریق داخل صفاقی کتامین (۹۰ $mg.kg^{-1}$) و زایلازین (۱۰ $mg.kg^{-1}$) به روش بدون درد توسط متخصص کارآزموده بیهوش و جراحی شدند. سپس بخشی از بافت قسمت آپکس بطن چپ (Left ventricle apex) آزمودنی‌ها با دقت برداشته شده و پس از شستشو با سرم نرمال سالین در نیتروژن مایع (۱۹۶ C°-) منجمد و در دمای (۷۰ C°-) نگهداری شد. در ادامه نیز برای ارزیابی میزان بیان پروتئین‌های GPR120 و AMPK از روش وسترن بلات (western blot) استفاده گردید. ابتدا، برای تهیه‌ی هموژنه ۱۰ درصد وزنی حجم بافت قلب از بافر ریپا (شرکت سیگما) حاوی مهارکننده‌ی پروتئاز کوکتیل (سیگما) استفاده گردید. غلظت تام پروتئین‌ها با روش برآدفورد (Bradford) (سیگما) اندازه‌گیری خواهد شد. سپس پروتئین‌ها در ژل ۱۰٪ دِناتوره کننده‌ی پلی‌آکریل‌آمید حاوی سدیم دودسیل سولفات (Sodium dodecyl sulfate) با دستگاه الکتروفورز

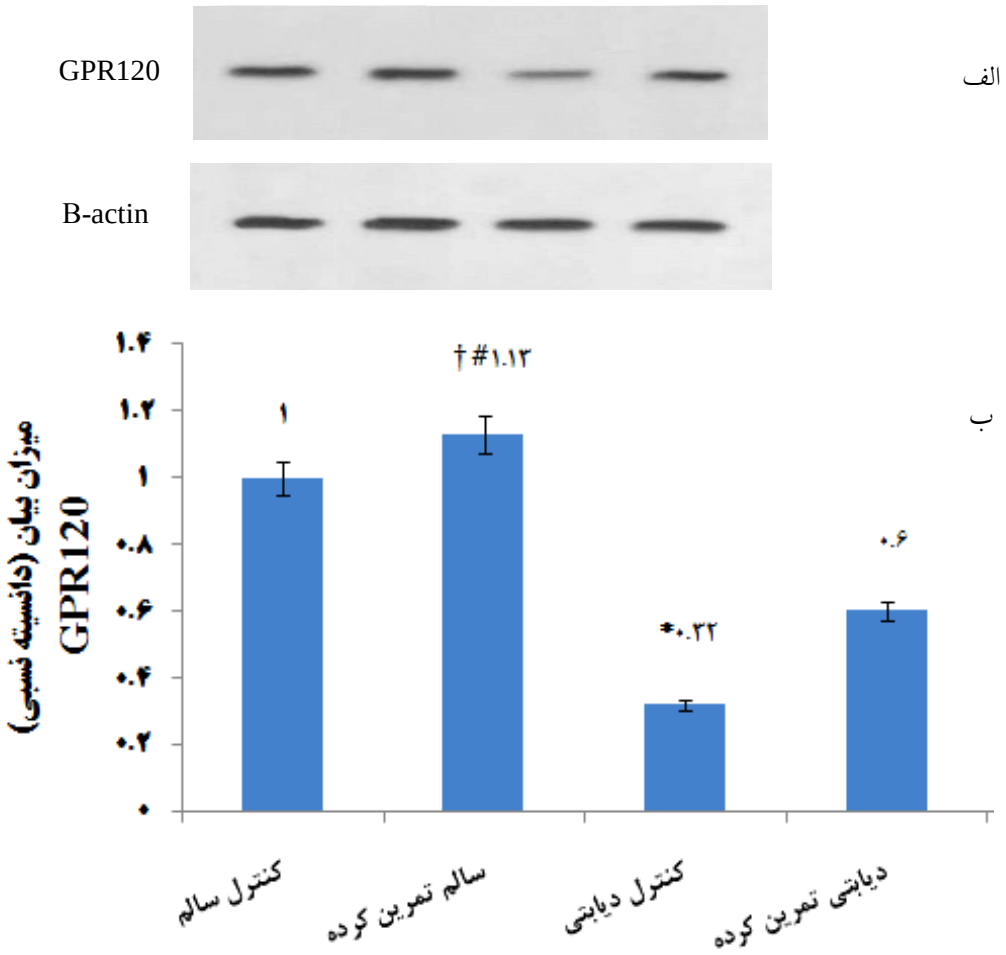
(Biorad) تفکیک شد. بعد از تفکیک، باندهای پروتئینی بر روی غشاء پلی وینیلیدین دی فلوراید (Sodium dodecyl sulfate) سیگما منتقل گردید. بعد از استفاده از بافر بلاکینگ برای پوشش دادن نواحی خالی از پروتئین غشاء از آنتی‌بادی اولیه خرگوشی ضد GPR120 و ضد AMPK ساخت شرکت سانتاکروز بیوتکنولوژی آمریکا به ترتیب با کُد SC-390752 و SC-33524 به نسبت ۱ به ۵۰۰ (در طول شب) استفاده شد. غشاها پس از چهار بار شستشو هر بار به مدت ۵ دقیقه با بافر فسفات نمکی حاوی ۰/۰۵٪ توین ۲۰، در معرض آنتی بادی ثانویه کونژوگه با Hrp (Horseradish peroxidase) به‌مدت یک ساعت قرار گرفتند. پس از شستشوی مجدد با روش قبلی این بار به صورت سه تکرار از کیت (BioRad،ECL) که برای آشکارسازی مجموعه‌های ایمنی تشکیل شده استفاده گردید. غشاها در معرض فیلم رادیوگرافی قرار گرفته و دانسیته باندها توسط نرم‌افزار Image J اندازه‌گیری و دانسیته‌ی باندهای پروتئین هدف در مقابل لودینگ کنترل بتا-اکتین نرمالیزه شدند. در انتها نیز نتایج بصورت دانسیته‌ی نسبی (نسبت به گروه کنترل) ارائه گردیدند.

تجزیه و تحلیل آماری: ابتدا توزیع طبیعی داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیروویلک بررسی گردید. سپس اثرات متغیرهای مستقل (تمرین و دیابت) روی متغیرهای وابسته در قالب یک طرح آماری عاملی دو طرفه و پس آزمون تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل گردید. سهم اثر هریک از متغیرها نیز با استفاده از درصد تغییرات مشخص شد. تمامی عملیات آماری در سطح معنی‌داری کمتر از ۵ صدم و با استفاده از نرم‌افزار SPSS 22 تحت ویندوز انجام شد.

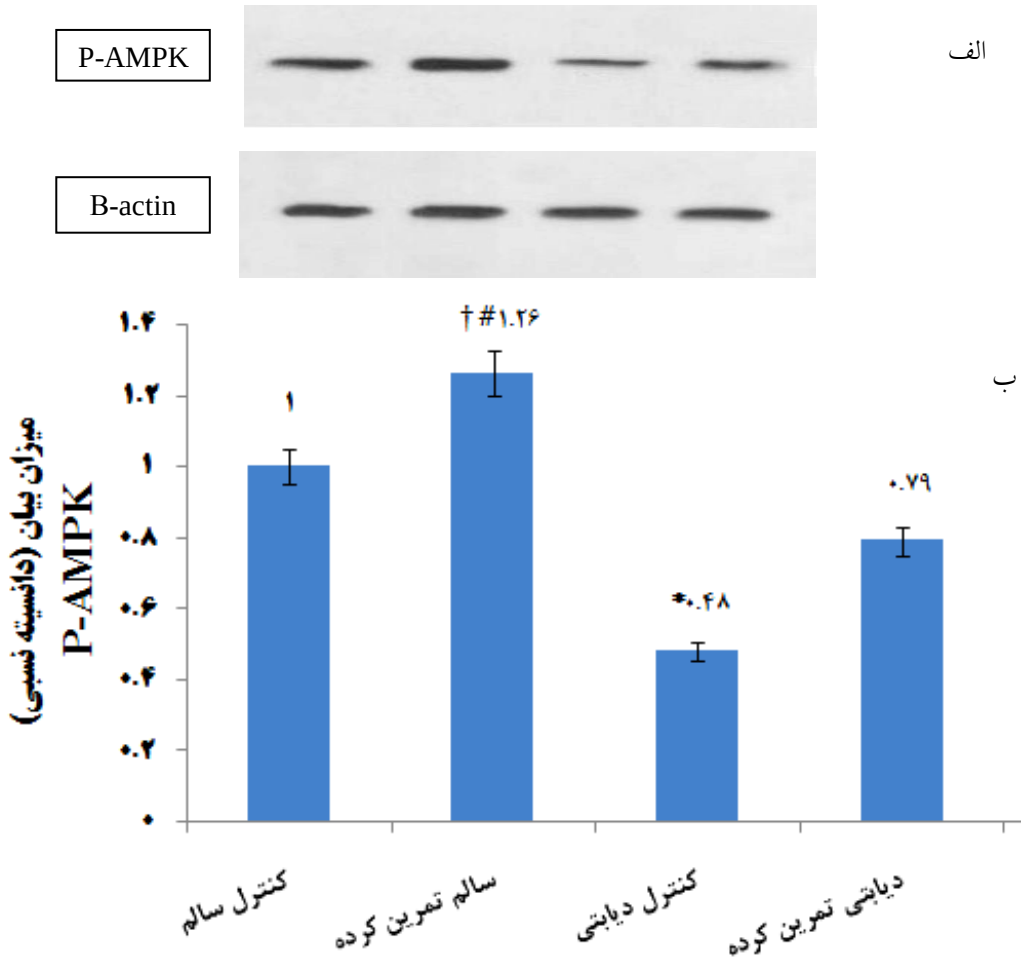
نتایج

میانگین و انحراف استاندارد شاخص‌های مورد مطالعه به صورت نمودار در ادامه ارائه شده است. چنانچه نتایج آزمون تحلیل واریانس دو راهه نشان دهنده‌ی وجود اثرات تقابلی قابل توجه در میزان بیان پروتئین‌های GPR120 و AMPK در آزمودنی‌ها به‌دنبال القاء دیابت نوع دو و اعمال تمرینات HIIT می‌باشد (GPR120: p =۰/۰۰۱ ،F=۱۴/۲۹ و AMPK: p =۰/۰۰۲ ،F=۱۲/۳۱). چنانچه القاء دیابت منجربه کاهش معنی‌دار و ۶۸ درصدی در میزان بیان پروتئین GPR120 در گروه کنترل دیابتی (D) در مقایسه با گروه کنترل سالم (C) گردید (p =۰/۰۰۵) (نمودار ۱). در همین راستا، نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد اعمال تمرینات تناوبی شدید (HIIT) در گروه سالم تمرین کرده (T) سبب افزایش غیرمعنی‌دار ۱۳ درصدی و معنی‌دار ۸۱ درصدی در سطوح پروتئین مذکور به‌ترتیب در مقایسه با گروه‌های کنترل سالم (C) (p =۰/۷۸) و کنترل دیابتی (D) (p =۰/۰۰۲) می‌شود. همچنین، یافته‌ها نشان داد که انجام تمرینات HIIT در موش‌های مبتلاء به دیابت (D+T) باعث جلوگیری از کاهش بیش ازحد ولی غیرمعنی‌دار در بیان پروتئین GPR120 به میزان ۲۸ درصد در مقایسه با گروه کنترل دیابتی (D) می‌شود (p =۰/۲۵۳)

همچنین، نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد که دیگر پروتئین مورد مطالعه یعنی AMPK متعاقب ابتلاء به دیابت (D) کاهش معنی‌دار و ۵۲ درصدی در مقایسه با گروه کنترل سالم (C) پیدا می‌نماید (p =۰/۰۱۹) (نمودار ۲). هرچند، تغییرات این پروتئین در گروه دیابتی تمرین کرده (D+T) در حدود ۳۱ درصد کمتر از گروه کنترل دیابتی (D) بود (p =۰/۱۶). درحالیکه، سطوح این پروتئین در گروه سالم تمرین کرده (T) بطور معنی‌داری (p =۰/۰۳۳) بیشتر از (۴۷ درصد) گروه دیابتی تمرین کرده (D+T) بود (شکل ۲)



نمودار ۱- نشان دهنده‌ی میزان بیان پروتئین GPR120 در گروه‌های تجربی مورد مطالعه در مقابل بتا-آکتین به‌عنوان گروه کنترل. الف) تصویر ایمونوبلاتینگ پروتئین نسبت به گروه کنترل. ب) نمودار ستونی جهت نمایش میزان کمی چگالی نسبی باندهای پروتئنی در گروه‌ها. * معنی داری در مقایسه با گروه کنترل سالم (C) در سطح P<۰/۰۵، † معنی داری در مقایسه با گروه کنترل دیابتی (D) در سطح P<۰/۰۵، # معنی داری در مقایسه با گروه دیابتی تمرین کرده (D+T) در سطح P<۰/۰۵.



نمودار ۲- نشان دهنده‌ی میزان بیان پروتئین P-AMPK در گروه‌های تجربی مورد مطالعه در مقابل بتا-آکتین به‌عنوان گروه کنترل. الف) تصویر ایمونوبلاتینگ پروتئین نسبت به گروه کنترل. ب) نمودار ستونی جهت نمایش میزان کمی چگالی نسبی باندهای پروتئنی در گروه‌ها. * معنی داری در مقایسه با گروه کنترل سالم (C) در سطح $p <$ ۰/۰۵، † معنی داری در مقایسه با گروه کنترل دیابتی (D) در سطح $p <$ ۰/۰۵، # معنی داری در مقایسه با گروه دیابتی تمرین کرده (D+T) در سطح $p <$ ۰/۰۵

بحث

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد هشت هفته تمرینات تناوبی با شدت بالا (HIIT) دارای آثار افزایشی بر بیان گیرنده GPR120 در بافت میوکارد موش‌های سالم تمرین کرده (T) و جلوگیری از کاهش این پروتئین در موش‌های دیابتی تمرین کرده (D+T) دارد. چنانچه، نتایج تحقیق گاسپر و همکاران (۲۰۱۸) همسو با پژوهش پیش‌رو نشان داد اعمال چهار هفته فعالیت بدنی مزمن (۵ روز در هفته، دویدن روی نوارگردان با شدت ۶۰ درصد بارکاری اوج) همراه با تجویز روغن بذر کتان (Flaxseed Oil) در بافت کبدی موش‌های لاغر و چاق موجب افزایش در بیان GPR120 و آبشار درون سلولی وابسته به آن می‌شود (۱۱). همچنین، امینی و همکاران (۲۰۲۰) اذعان داشتند که هشت هفته تمرینات هوازی با شدت ۷۰-

۴۰٪ ضربان قلب ذخیره بمدت ۱۵ تا ۴۵ دقیقه با تواتر سه جلسه در هفته در ترکیب با مصرف خیار تلخ (Momordica charantia L.) در مردان مبتلاء به دیابت نوع دو منجربه افزایش در بیان شاخص‌های دخیل در انتقال معکوس کلسترول همچون؛ (Apo lipoprotein AI)، Apo-A1، Apo-E، (Paraoxonase-1) PON-1 و کلسترول–HDL در گروه‌های تجربی در مقایسه با گروه کنترل می‌گردد (۱).

از طرفی، در تناقض با یافته‌های پژوهش حاضر، فِنگ و همکاران (۲۰۲۱) با بررسی همزمان دو مداخله‌ی رژیم غذایی پُرچرب و انجام تمرینات هوازی با شدت متوسط ۷۰-۶۰٪ VO_{2max} بمدت یک ساعت در روز با توالی ۵ روز در هفته در بافت بیضه‌ی موش‌ها به این نتیجه رسیدند که فعالیت‌بدنی می‌تواند سطح بیان پروتئین و ژن سیستم KISS-1/GPR54 را کاهش داده و اثر مهاری رژیم غذایی پُرچرب بر رشد بیضه‌ها را تغییر دهد (۱۰). احتمالاً تناقض در مطالعه ما با یافته‌های تحقیق فِنگ می‌تواند ناشی از بکارگیری روش‌های تمرینی متفاوت همچون؛ شدت، مدت و نوع دستگاه انرژی و نیز بافت مورد مطالعه باشد.

گیرنده‌های جفت شونده با پروتئین G (GPCRs) بزرگترین خانواده از گیرنده‌های غشای پلاسمایی موجود در ژنوم انسان هستند که به‌عنوان تنظیم کننده-های مهم اعمال فیزیولوژیکی درون سلولی بحساب می‌آیند. اخیراً، این گیرنده‌ها برای طراحی داروهای جدید در طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها شامل اختلالات عصبی، چاقی و دیابت نوع دو مورد توجه قرارگرفته و تلاش‌های مهمی نیز در جهت توسعه استراتژی‌های جدید برای تعیین پتانسیل‌های درمانی آن‌ها انجام شده است (۱۴). با این حال، سازوکارهای سلولی ناشی از انجام فعالیت‌های بدنی که بیان GPR120 را تعدیل می‌نمایند، به‌خوبی شناخته نشده است. فعال‌سازی آبشار پیام‌رسانی GPR120 باعث ترشح پپتید شبه گلوکاگون (GLP-1) و در نتیجه افزایش ترشح انسولین می‌شود. بنابراین، GPR120 و آگونیست‌های مربوط به آن به‌عنوان اهداف دارویی بالقوه برای درمان دیابت و چاقی در نظر گرفته می-شوند (۲۱). بطور نمونه، آن و همکاران (۲۰۲۰) در مطالعه‌شان برای تعیین نقش GPR120 در جریان انتقال معکوس کلسترول، سلول‌های فوم مشتق شده از ماکروفاژ THP-1 انسانی و ماکروفاژهای RAW264/7 موش را با آگونیست GPR120 و GW9508 تحریک کردند. آن‌ها نشان دادند که GPR120 فعال باعث افزایش جریان کلسترول با واسطه ABCA1 و ABCG1 (ATP Binding Cassette Subfamily A & G Member) و کاهش در محتوای استرهای کلسترول سلولی در ماکروفاژها از طریق یک مسیر پیام‌رسانی وابسته به PLC/Ca2+/CaMMK/AMPK می‌شود (۲).

در این زمینه، پروتئین AMPK به‌عنوان حسگر انرژی درون‌سلولی و یک تنظیم کننده‌ی مهم هومئوستاز سوخت و سازی بحساب می‌آید. به خوبی ثابت شده است که AMPK یک مولکول پائین دستی گیرنده‌ی GPR120 و آبشار درون سلولی وابسته به آن می‌باشد (۹، ۱۵). فعال‌سازی AMPK سبب تحریک برداشت گلوکز، اکسایش اسیدهای چرب آزاد، جابجایی و فعال‌سازی انتقال دهنده‌ی گلوکز نوع ۴ (Glut4)، بیوژنز میتوکندری و مهار سنتز پروتئین و گلیکوژن را در پی دارد (۱۹). چنانکه، در مطالعه حاضر میزان فسفوریلاسیون پروتئین AMPK به‌دنبال القاء دیابت نوع دو منجربه کاهش قابل توجه در گروه دیابتی (D) در مقایسه با سایر گروه‌ها شد. در تأئید یافته‌های مطالعه‌ی حاضر، نتایج پژوهش جوکار و همکاران (۱۳۹۹) به‌دنبال بررسی وسترن بلات پروتئین مذکور در بافت بطن چپ قلب موش‌های نژاد اسپرادوگاولی نشان دادند که القاء دیابت نوع دو سبب کاهش در

میزان پروتئین AMPK و درنتیجه افزایش میزان مرگ سلولی اتوفاژیکی و ارتقاء کاردیومیوپاتی می‌شود (۱۲). همچنین، اسماعیلی و همکاران (۱۴۰۰) اظهار داشتند که ابتلاء به بیماری دیابت نوع دو با کاهش در میزان بیان AMPK در کاردیومیوسیت‌های موش‌های نر ویستار آشکار شده که این تنظیم منفی در پروتئین یادشده آثار خود را با تقویت در آتروفی و کاهش در عملکرد انقباضی قلب نشان می‌دهد (۸). این درحالی بود که اعمال تمرینات بدنی در تحقیق حاضر سبب افزایش معنی‌دار در میزان بیان شکل فسفریله (فعال) AMPK و یا جلوگیری از کاهش فعالیت این پروتئین در خلال ابتلاء به بیماری دیابت می‌شود. در این راستا، لیو و همکاران (۲۰۱۹) با مطالعه‌ی تمرین شدید (دویدن روی نوارگردان با سرعت ۲۵ تا ۳۵ متر بر دقیقه تا رسیدن به حد خستگی) در موش‌های صحرایی به افزایش در محتوای پروتئین AMPK عنوان داشتند (۱۶). در تحقیق ما نیز تجویز هشت هفته تمرینات تناوبی با شدت ۹۰-۸۵ درصد سرعت بیشینه سبب افزایش ۷۸ درصد در مقایسه با گروه کنترل دیابتی گردید. همچنین، اعمال تمرینات بدنی در گروه مبتلاء به دیابت در مقایسه با گروه کنترل دیابتی از کاهش ۳۱ درصد در فعالیت پروتئین AMPK جلوگیری نمود. محققین معتقدند که فعالیت ورزشی باعث کاهش گلوکز خون، افزایش فسفوریلاسیون (روشن کردن) و بیان AMPK، کاهش دِفسفوریلاسیون سوبسترای AMPK و استیل کوآ کربوکسیلاز (ACC) می‌گردد. همچنین، تمرین بدنی از طریق مصرف ATP و کاهش نسبت ATP/AMP افزایش در فعالیت AMPK را به دنبال خواهد داشت (۷). برخی مطالعات نیز به خوبی عنوان کرده‌اند که استفاده از فعال کننده‌های مسیر AMPK می‌تواند سبب افزایش در انتقال معکوس کلسترول (RCT) گردد. بطور نمونه، ژائو و همکاران (۲۰۲۱) دریافتند که تیمار موش‌ها با داروی کاناگلیفلوزین (داروی ضددیابت Canagliflozin) سبب فعال‌سازی در AMPK و درنتیجه تسهیل در جریان انتقال کلسترول کبدی و روده‌ای می‌شود (۲۲). به‌علاوه، چِن و همکاران (۲۰۲۱) اظهار نمودند که تجویز هسپرتین (Hesperetin) به‌عنوان یک فلاونوئید موجود در میوه دارای آثار ضدآتروژنیکی (Anti-Atherogenic) در کلسترول-HDL ازطریق مهار تشکیل سلول فوم و بهبود در جریان کلسترول ماکروفاژهای مشتق شده از THP-1 توسط فعال‌سازی پیام‌رسانی LXRa (liver X receptor alpha) در یک روش وابسته به AMPK می‌شود (۶). چنانکه، یکی از محدویت‌های مطالعه‌ی حاضر عدم اندازه‌گیری دیگر پروتئین‌های مرتبط با مسیرهای انتقال معکوس کلسترول همچون؛ ABCA1، ABCG1 و کلسترول-HDL می‌باشد.

نتیجه‌گیری

به هر حال، نتایج مطالعه حاکی است که القاء دیابت نوع دو موجب کاهش در فعالیت پروتئین‌های مسیر انتقال معکوس کلسترول از طریق کاهش در بیان GPR120 و AMPK می‌گردد. هر چند، اعمال تمرین تناوبی شدید سبب افزایش و ممانعت از کاهش در پروتئین‌ها به‌ترتیب در گروه سالم و دیابتی می‌شود. از این‌رو، به‌نظر می‌رسد انجام فعالیت‌های بدنی مداخله‌ی مناسبی برای برقراری تعادل در مسیر انتقال معکوس کلسترول ناشی از ابتلاء به دیابت در بافت قلبی موش‌ها باشد. البته، برای نتیجه‌گیری قطعی در این مورد نیاز به مطالعات بیشتری است.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از تمامی افرادی که به هر نحوی زمینه انجام مطالعه حاضر را فراهم آوردند، نهایت تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید. هیچگونه تعارض منافعی با فرد یا دستگاهی برای انتشار این مقاله وجود ندارد.

منابع

1. Amini M., Abdi A., Abbassi-Daloii A. 2020. Effects of moderate-intensity exercise with *Momordica charantia* L. consumption on serum reverse cholesterol transport elements and lipid profile in men with type 2 diabetes. *Feyz*, 24(4):374-386. [In Persian]

2. An T., Zhang X., Li H., Dou L., Huang X., Man Y., Zhang X., Shen T., Li, G., Li J., Tang W., 2020. GPR120 facilitates cholesterol efflux in macrophages through activation of AMPK signaling pathway. *The FEBS Journal*, 287(23):5080-5095.

3. Moller A.B., Kampmann U., Hedegaard J., Thorsen K., Nordentoft I., Vendelbo M.H., Moller N., Jessen N. 2017. Altered gene expression and repressed markers of autophagy in skeletal muscle of insulin resistant patients with type 2 diabetes. *Scientific Reports*, 7(1): 1-11.

4. Asgari Hazaveh D., Babaei S. 2018. Effect of Eight Weeks High Intensity Interval Training and Medium Intensity Interval Training and Aloe vera Intake on Serum Vaspin and Insulin Resistance in Diabetic Male Rats. *Journal of Arak University of Medical Sciences*, 20(11):67-75. [In Persian]

5. Bakhtiyari A, Gaeni, A., Choobineh S., Kordi M., Hedayati M. 2019. The Comparison of the Influence of ۱۲-Week High Intensity Interval Training and Continuous Moderate Intensity Training on PGC-۱α and Tfam Mitochondrial Proteins Expressions in Gastrocnemius Muscle of Elderly Rats. *Journal of Animal Biology*, 11(4):11-20. [In Persian]

6. Chen X., Zou D., Chen X., Wu H., Xu D. 2021. Hesperetin inhibits foam cell formation and promotes cholesterol efflux in THP-1-derived macrophages by activating LXRα signal in an AMPK-dependent manner. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 77(3):405-417.

7. Chen Z.P., Stephens T.J., Murthy S., Canny B.J., Hargreaves M., Witters L.A., Kemp, B.E., McConell, G.K. 2003. Effect of exercise intensity on skeletal muscle AMPK signaling in humans. *Diabetes*, 52(9):2205-2212.

8. Esmailee B., Abdi A., Abbassi Daloii A., Farzanegi P. 2020. The effect of aerobic exercise along with resveratrol supplementation on AMPK and MAFbx gene expression of myocardial diabetic rats. *Journal of Birjand University of Medical Sciences*, 27(2):150-160. [In Persian]

9. Fan J., Yang X., Li, J., Shu Z., Dai J., Liu X., Li B., Jia S., Kou X., Yang, Y., Chen N. 2017. Spermidine coupled with exercise rescues skeletal muscle atrophy from D-gal-induced aging rats through enhanced autophagy and reduced apoptosis via AMPK-FOXO3a signal pathway. *Oncotarget*, 8(11):17475.

10. Feng J., Xu R., Li Y., Zhou Q., Song, G., Deng Y., Yan Y., 2021. The effect of high-fat diet and exercise on KISS-1/GPR54 expression in testis of growing rats. *Nutrition and Metabolism*, 18(1):1-10.

11. Gaspar R.C., Veiga C.B., Bessi M.P., Dátilo M.N., Sant'Ana M.R., Rodrigues P.B., de Moura L.P., da Silva A.S.R., Santos G.A., Catharino R.R., Ropelle E.R. 2019. Unsaturated fatty acids from flaxseed oil and exercise modulate GPR120 but not GPR40 in the liver of obese mice: a new anti-inflammatory approach. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 66:52-62.

12. Jokar M., Salesi M. 2020. The Effect of Endurance Exercise On the Content of Ampk and Pgc-1α Proteins in The Left Ventricular Heart Tissue of Rats with Type ۲Diabetes. *Iranian Journal of Diabetes and Metabolism*, 19(5): 252-260. [In Persian]

13. Leandro CG., Levada AC., Hirabara SM., Manhaes-de-Castro R., De-Castro CB., Curi R., Pithon-Curi TC. 2007. A program of moderate physical training for

Wistar rats based on maximal oxygen consumption. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 21(3):751-756.

14. Liu, D., Wang, L., Meng, Q., Kuang, H. and Liu, X. 2012. G-protein coupled receptor 120 is involved in glucose metabolism in fat cells. *Cellular and Molecular Biology*, 58(2):1757-62.

15. Liu H.D., Wang W.B., Xu Z.G., Liu C.H., He, D.F., Du, L.P., Li, M.Y., Yu, X. and Sun, J.P. 2015. FFA4 receptor (GPR120): A hot target for the development of anti-diabetic therapies. *European Journal of Pharmacology*, 763:160-168.

16. Liu W., Wang, Z., Xia, Y., Kuang, H., Liu S., Li L., Tang C., Yin D. 2019. The balance of apoptosis and autophagy via regulation of the AMPK signal pathway in aging rat striatum during regular aerobic exercise. *Experimental Gerontology*, 124:110647.

17. Sasidharan S.R., Joseph J.A., Anandakumar S., Venkatesan V., Ariyattu Madhavan C.N., Agarwal A. 2013. An experimental approach for selecting appropriate rodent diets for research studies on metabolic disorders. *BioMed Research International*, 2013:752870.

18. Steinberg G.R., Kemp B.E. 2009. AMPK in health and disease. *Physiological Reviews*, 89(3):1025-1078.

19. Tiwari N., Thakur A.K., Kumar V., Dey A., Kumar V. 2014. Therapeutic targets for diabetes mellitus: an update. *Clinical Pharmacology Biopharmacology*, 3(1):1.

20. Tuttle L.J., Hastings M.K., Mueller M.J. 2012. A moderate-intensity weight-bearing exercise program for a person with type 2 diabetes and peripheral neuropathy. *Physical Therapy*, 92(1):133-141.

21. Zhang D., Leung P.S. 2014. Potential roles of GPR120 and its agonists in the management of diabetes. *Drug Design, Development and Therapy*, 8:1013.

22. Zhao Y., Li Y., Liu Q., Tang Q., Zhang Z., Zhang J., Huang C., Huang H., Zhang G., Zhou J., Yan J. 2021. Canagliflozin Facilitates Reverse Cholesterol Transport Through Activation of AMPK/ABC Transporter Pathway. *Drug Design, Development and Therapy*, 15:2117.

Effects of Eight Weeks of High-Intensity Interval Training (HIIT) on the Expression of GPR120 and AMPK Proteins in the Heart Tissue of Diabetic Male Rats

Ebrahim Hoseini Houri Pasand, Saeed Dabbagh Nikoo Kheslat*, Javad Vakili

Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Abstract

The reverse cholesterol transfer process has a positive role in reducing atherosclerotic plaques during diabetes. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the effect of eight weeks of high-intensity interval training on GPR120 and AMPK proteins in the cardiac tissue of mice with type 2 diabetes. In an experimental study, 40 three-month-old adult male Wistar rats with an average weight (250-300 g) were randomly divided into four groups of 10 series including: healthy control (C: intraperitoneal injection of saline), healthy training (T: running at 85-90 % of maximum speed in 6 to 12 bouts in two-minute periods; 5 days per week for eight weeks), diabetic control (D: diabetic on a high-fat diet with intraperitoneal injection of streptozotocin) and trained diabetics (D+T: diabetic with training) were divided. A method based on Western blotting was used to determine changes in the expression profile of GPR120 and AMPK proteins in the heart muscle tissue (left ventricle) of rats. The two-way analysis of variance and Bonferroni post hoc test were used to analyze the data. Induction of diabetes (D) significantly reduced GPR120 and AMPK proteins ($p \leq 0.05$). While HIIT training apply in healthy group (T) increased 81% and 47% in GPR120 and AMPK compared to diabetic control group (D) respectively ($p = 0.001$). Also, training intervention has the ability to prevent a decrease in both of proteins in the trained diabetic group (D+T) compared to the diabetic group (D) ($p = 0.023$). Based on the findings of this study, it can be stated that eight weeks of high-intensity interval training (HIIT) is a preventive strategy against reducing the activity of GPR120 and AMPK proteins involved in the reverse cholesterol transmission during type 2 diabetes.

Keywords: High Intensity Interval Training, Atherosclerosis, Type 2 Diabetes, Reverse Cholesterol Transfer.