اثرات حفاظتی دو شیوه تمرین ورزشی همراه با مکمل آستاگزانتین برآپوپتوز بافت قلبی در موش صحرایی نردیابتی نوع ۲: مطالعه مداخله‌ای و تجربی

نسرین عبادی[۱]، محمدرضا ذوالفقاری*[۲]، فیروز قادری پاکدل[۳]

تاریخ دریافت ۱۳۹۸/۱۲/۰۱ تاریخ پذیرش ۱۳۹۹/۰٤/۰۸

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: عوارض مزمن بیماری دیابت دامنه گسترده‌ای داشته و تقریباً همه بافت‌های بدن را شامل می‌شود. آپوپتوز یکی از عوارض قلبی برجسته افراد دیابتی می‌باشد. مطالعه حاضر باهدف بررسی تأثیر تمرینات هوازی و اینتروال همراه با مکمل آستاگزانتین بر آپوپتوز بافت قلبی در رت‌های دیابتی نوع ۲ بود.

مواد و روش کار: از ۳۵ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با میانگین وزنی ۱۵/۵۵±۱۹۷/۴۶ گرم استفاده شد که موش‌ها پس از القای دیابت به‌طور تصادفی در ۷ گروه شامل دیابتی کنترل، دیابتی شم، دیابت+ تمرین هوازی+ مکمل، دیابت + تمرین اینترول+ مکمل، دیابت+اینتروال، دیابت+ هوازی، دیابت+ مکمل قرار گرفتند. جهت القای دیابت نوع ۲ از تزریق نیکوتین آمید و استرپتوزوتوسین استفاده شد. تمرینات اینتروال به مدت ۸ هفته با ۵ جلسه در هفته با شدت ۸۰ درصد vo2max و تمرینات هوازی با شدت حدود ۶۵ تا ۷۵ درصد Vo_2max به‌صورت دویدن روی تردمیل اجرا شد. بیان ژن bax و bcl2 با تکنیک RealTime-PCR و آنالیز داده‌ها با آزمون آنالیز واریانس یک‌راهه انجام شد.

یافته‌ها: بیان ژن Bcl2 و Bax در هر دو گروه ترکیبی هوازی مکمل و اینتروال مکمل تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشت (P<۰/۰۵). علاوه بر این تفاوت معنی‌داری در بیان ژن Bcl2 و Bax در گروه ترکیبی هوازی مکمل در مقایسه با گروه مکمل مشاهده شد (P<۰/۰۵) بااین‌وجود اختلاف معنی‌داری در بیان ژن bcl2 و Bax در گروه ترکیبی اینتروال مکمل در مقایسه با گروه مکمل مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری: ترکیب هردو مداخله تمرینی با مکمل به‌ویژه ترکیب تمرین هوازی مکمل با بیان مضاعف شاخص آنتی‌آپوپتوزی bcl2 و کاهش شاخص آپوپتوزی bax می‌تواند به‌عنوان راهکار درمانی جهت پیشگیری از روند صعودی آپوپتوز در بافت قلبی رت‌های دیابتی باشد.

کلیدواژه‌ها: تمرین، کاردیومیوپاتی دیابتی، رت، آستاگزانتین،bax،bcl2

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و یکم، شماره ششم، ص ٤٧٠-٤٥٩، شهریور ۱۳۹۹

آدرس مکاتبه: دانشکده تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران، تلفن: ۰۹۱۴۳۴۱۳۹۴۱

Email: zolfaghari60@gmail.com

مقدمه

دیابت نوع ۲ یکی از اختلالات تنظیمی آندوکرینی رایج در سراسر جهان بوده که به نسبت همه‌گیر در مقیاس جهانی رسیده است. مطالعات کلینیکال و اپیدومیولوژیکی اشاره کرده‌اند که دیابت می‌تواند مستقل از دیگر ریسک فاکتورهای قلبی عروقی به بافت قلبی آسیب بزند. علی‌رغم همه تلاش‌ها و پیشرفت‌ها برای شناسایی این بار جهانی، عوارض بالای بیماری قلبی در افراد دیابتی به چالشی برای پزشکان تبدیل شده است. یکی از عوارض شایع بیماری دیابت افزایش خطر ابتلا به کاردیومیوپاتی دیابتی (DCM) است که به‌واسطه تجمع لیپید در کاردیومیوسیت‌ها، فعال‌سازی ژن جنینی و هایپرتروفی بطن چپ مشخص گردیده و درنهایت اختلالات انقباضی را در پی خواهند داشت. در بیماری دیابت افزایش متابولیسم گلوکز به علت هایپرگلایسمی مداوم منجر به تغییرات متابولیکی و مولکولی در کاردیومیوسیت‌ها شده و استرس اکسیداتیو را به‌عنوان عاملی کلیدی در بروز DCM، به‌واسطه افزایش تولید رادیکال‌های آزاد ناشی از اتواکسیداسیون گلوکز و تأخیر در تولید دوباره گلوتاتیون و همچنین محصولات انتهایی

[۱] دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

[۲] استادیار فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (نویسنده مسئول)

[۳] دانشیار فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

اکسیداسیون پیشرفته[1] و تحرک پروسه میانجی رسپتور به دلیل مجاورت پروتئین‌های موجود در خون با گلوکز، توسعه می‌دهد (۱-۳). استرس اکسیداتیو ایجادشده با افزایش گونه‌های اکسیژن واکنشی[2] و کاهش هم‌زمان مکانیسم‌های دفاعی در برابر آن می‌تواند منجر به کاهش انقباض پذیری میوکاردی، آپوپتوز کاردیومیوسیت‌ها، آسیب DNA سلولی شده و پراکسیداسیون لیپیدی را افزایش و مقاومت به انسولین را توسعه دهد(۴). در سطح سلول عضله قلبی افراد دیابتی هایپرتروفی میوسیت‌ها، فیبروز بینابینی و آپوپتوز نشانه بدتر شدن عملکرد قلب متعاقب تولید گونه‌های اکسیژن واکنشی است (۵). در بیماری دیابت زیاد بودن گونه‌های اکسیژن واکنشی فرآیند آپوپتوز را از طریق فعال کردن کاسپاز ۳ وکاهش بیان BCL2 فعال می‌کند. آپوپتوز به‌عنوان یک شکل مرگ سلولی در بافت قلبی، منجر به رهایش سیتوکروم c از میتوکندری و فعال‌سازی دسته ویژه‌ای از آنزیم‌های سیتوپلاسمیک با عنوان کاسپازها می‌شود. فعال‌سازی کاسپاز ۳ [3] با نابود کردن ساختارهای سلولی منجر به مرگ سلولی می‌شود(۶). در مقابل پروتئین‌های خانواده سلول بتای لنفومی ۲[4] و پروتئین x وابسته به bcl2 [5]، به‌عنوان پروتئین‌های کلیدی درگیر در تشکیل کانال‌های آپوپتوزی میتوکندریایی و همچنین تنظیم نفوذپذیری میتوکندریایی و سیگنالینگ آپوپتیک وابسته به میتوکندری شناخته شده‌اند. Bcl2 به‌عنوان آنتاگونیست های عمده آپوپتوز با حضور در میتوکندری منجر به مهار رهایش سیتوکروم c شده و بر فعالیت پروآپوپتیک bax و آپوپتوز ناشی از استرس اکسیداتیو مقابله می‌کند. مطالعات هشیش و همکاران[6] مبنی بر افزایش بیان کاسپاز ۳ در طحال موش‌های دیابتی و کاهش بیان bcl2 تاکیدی بر این مدعاست(۷) . اخیراً نشان دادند که میزان افزایش آپوپتوز در قلب موش‌های دیابتی از طریق افزایش چشمگیردر نسبت bax به bcl2 و بیان کاسپاز ۳ و۹ مشخص می‌شود (۸). مطالعات نشان داده‌اند که مداخله از طریق رژیم غذایی سالم و تمرینات ورزشی می‌توانند به‌عنوان ابزارهای غیردارویی برای مبارزه با دیابت نوع ۲ باشند (۹). ورانکی و همکاران دریافتند که تمرینات ورزشی با افزایش پتانسیل درون غشایی رهایش سیتوکروم c را کاهش داده و درنتیجه از آپوپتوز کاردیومیوسیت‌ها پیشگیری کند(۱۰). تمرینات ورزشی همچنین می‌توانند با افزایش بیان bcl2 در میوکارد موش‌های دیابتی فعال‌سازی پروتئین‌های پروآپوپتیک را تحت تأثیر قرار دهد(۱۱). در بیماران دیابتی شدت تمرینات ورزشی هدف بررسی‌های گسترده قرار گرفته است و اشاره شده که تمرینات اینتروال با شدت بالا حفاظت کاردیومتابولیکی بیشتری را بدنبال دارد(۱۲) در حالی‌که تمرینات با شدت متوسط عملکرد قلبی را در بیماران دیابتی نوع ۲ تغییر نداد(۱۳). اما در مطالعه دیگری که توسط تیلور و همکاران بر آمادگی جسمانی و عملکرد جسمانی بیماران دیابتی نوع ۲ انجام شد هیچ تفاوت معنی‌داری بین تمرینات با شدت بالا و متوسط وجود نداشت بلکه هردو شیوه به شیوه مشابهی سبب بهبودهای عوامل ذکرشده گردید(۱۴). اخیراً مطالعه‌ای نشان داده که اثر کاهشی تمرینات با شدت بالا در آپوپتوز کاردیومیوسیت‌ها با مهار بیشتر کاسپاز۳ در مقایسه با تمرینات با شدت پایین نشانگر این موضوع است که تمرینات ورزشی در یک شیوه وابسته به شدت می‌تواند با کاهش استرس شبکه اندوپلاسمیک ناشی ازدیابت در موش‌ها، کاردیومیوپاتی را کاهش دهد(۱۵). خاکدان و همکاران نشان دادند که تمرینات اینتروال با شدت زیاد به‌طور مؤثری بیان sirt1 و bcl2 را در موش‌های دیابتی با بهبود کسر تزریقی بطن چپ و کسر کوتاه شدگی قلب افزایش می‌دهد(۱۶). آستاگزانتین[7] یک کارتنوئید از دسته زانتوفیل ها با منشأ دریایی است که اثرات ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی قوی آن در مطالعات انسانی و حیوانی به اثبات رسیده است. وجود گروه‌های هیدروکسیل و کتونی روی هر حلقه یونی همراه با پیوند دوگانه، فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی آستاگزانتین را شرح می‌دهد(۱۷). آستاگزانتین با حفاظت سلول‌های بتای پانکراس از سمیت گلوکز، یک عامل ایمونولوژیکی عالی در بهبود اختلال عملکردی لنفوسیت‌های موش‌های دیابتی شناخته شده است(۱۸). همچنین چندین گزارش نشان داده‌اند که آن می‌تواند به‌طور ایمن توسط انسان و موش بکارگرفته شود، همانطور که استعمال دارو و غذای ایالات متحده امریکا آستاگزانتین را به‌عنوان یک مکمل غذایی تأیید کرده است علاوه بر فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی آستاگزانتین ، اثرات آن بر سرطان ، دیابت ، سیستم ایمنی و دیگر جنبه‌ها دیده شده است (۱۹) . یافته‌های جدید نشان می‌دهد که فعالیت هیپوگلایسمی آستاگزانتین به بازسازی سلول‌های بتای پانکراس در موش‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین ارتباط داده می‌شود . بنابراین موجب افزایش حساسیت انسولینی و فعال‌سازی برداشت گلوکز توسط بافت‌های پیرامونی می‌شود(۱۸).

[1] Advanced glycation end-products(AGE)
[2] Reactive oxygen species
[3] Caspase-3
[4] B-cell lymphoma 2
[5] Bcl-2-associated X protein
[6] Hashish, et al
[7] Astaxanthin

با توجه به مقادیر زیاد تشکیل رادیکال‌های آزاد در سلول‌های قلبی افراد دیابتی که منجر به اختلالات انقباضی ناشی از پراکسیداسیون لیپیدی و اکسیداسیون پروتئینی و آسیب DNA میتوکندری و شبکه سارکوپلاسمی شده و آپوپتوز سلول‌های قلبی را بدنبال اختلال پتانسیل غشای میتوکندری ایجاد می‌کند، ضروریست با بکارگیری الگوی صحیح فعالیت و گنجاندن مکمل‌های غذایی مناسب به‌منظور هم افزایی اثرات تمرینات ورزشی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی قلب را افزایش داد. علاوه بر این، تغییرات متغیر بافت قلبی بدنبال پروتکل‌های تمرینی با شدت‌های متفاوت، وجوب اجرای پروتکل‌های مقایسه‌ای تمرینی برای بهبود شرایط کاردیومیوپاتی دیابتی را در بیماران دیابتی نوع ۲ آشکار می‌سازد. بنابراین هدف مطالعه حاضر بررسی اثرات دو نوع تمرین ورزشی اینتروال و هوازی همراه با مصرف مکمل آستاگزانتین بر آپوپتوز بافت قلبی موش‌های دیابتی نوع ۲ بود.

مواد و روش کار

در این پژوهش مداخله‌ای تجربی که در آزمایشگاه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی ارومیه و براساس قوانین بین المللی حمایت از حیوانات آزمایشگاهی انجام شده و با کد IR.UMSU.REC.1399.068 توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی ارومیه موردتایید قرارگرفته است، تعداد ۳۵ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با میانگین وزنی ۱۵/۵۵±۱۹۷/۴۶ گرم از مرکز تحقیقات و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه خریداری شدند. حیوانات در شرایط یکسان دوازده ساعت تاریکی و دوازده ساعت روشنایی، رطوبت ۵۰ درصد، دما ۲۰ تا ۲۳ درجه سانتی‌گراد و دسترسی آزادانه به آب و غذا نگهداری شدند و پس از گذشت یک هفته آشنایی رت‌ها با محیط آزمایشگاه، برتمامی ۳۵ سر رت القای دیابت انجام شد. پس از القای دیابت رت‌ها به‌صورت تصادفی در ۷ گروه (با ۵ سر موش در هر گروه) شامل دیابتی کنترل، دیابتی شم، دیابت+ تمرین هوازی+ مکمل، دیابت + تمرین اینترول+ مکمل، دیابت+اینتروال، دیابت+ هوازی، دیابت+ مکمل قرار گرفتند. جهت القای دیابت نوع ۲ از تزریق نیکوتین آمید و استرپتوزوتوسین استفاده شد. ابتدا نیکوتین آمید (۱۱۰ میلی‌گرم به ازای هرکیلوگرم وزن موش محلول در سالین)به صورت درون صفاقی تزریق شده و پس از ۱۵ دقیقه، ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم stz که در محلول بافر سیترات ۰/۱ مولار با ph ۴/۵ حل شده به‌صورت درون صفاقی تزریق شد. برای تشخیص دیابتی بودن موش‌ها، ۵ روز پس ازتزریق با ایجاد جراحت کوچک توسط لانست در دم حیوان یک قطره خون بر روی نوار گلوکومتری قرار داده شده و مقدار قند خون اندازه‌گیری و قند خون بالای ۲۰۰ میلی‌گرم بر دسی لیتر به‌عنوان معیاری برای دیابتی شدن آنها و ورود به مطالعه بود (۲۰). در صورت بروز هرگونه آسیب احتمالی رت‌ها در هر یک از مراحل پژوهش آن رت از پروسه تحقیق خارج می‌شد.

پروتکل تمرینی:

رت‌های گروه تمرین اینتروال و مکمل اینتروال در یک پروتکل هشت هفته‌ای با ۵ جلسه در هفته با شدت ۸۰ درصد vo2max بر روی تردمیل شروع به فعالیت نمودند. لازم به ذکر است یک هفته قبل از شروع تمرینات جهت آشنایی حیوانات با تردمیل آن‌ها با سرعت ۵ متر بردقیقه و شیب صفردرجه و مدت زمان ۱۰ دقیقه شروع به فعالیت کرده و در پایان جلسه آشنایی به سرعت ۱۰ متربردقیقه و مدت زمان ۱۵ دقیقه رسیدند. درآغاز هرجلسه تمرینی با ۴ ست دو دقیقه‌ای با سرعت ۱۸ متر بردقیقه و با ۱ دقیقه استراحت فعال با سرعت ۶ متر بردقیقه شروع شده و با افزایش ۱۰ درصدی درهرهفته ادامه یافت به‌طوری‌که در آخرین جلسه تمرینی موش‌ها با نسبت سرعت ۲۰-۳۲ وزمان کل ۲۹ دقیقه به آزمون خاتمه دادند(۲۱). رت‌های گروه تمرین هوازی نیز در یک پروتکل هشت هفته‌ای دویدن فزاینده روی تردمیل و به مدت ۵ روز متوالی در هفته با شدت حدود ۶۵ تا ۷۵ درصد Vo_2max شرکت کردند. هفته اول موش‌ها با سرعت ۱۲ متر بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه شروع به فعالیت کرده و هر دو هفته شدت فعالیت ۴ متر بر دقیقه و مدت فعالیت ۵ دقیقه افزایش یافت تا در دو هفته آخر موش‌ها با سرعت ۲۴ متر بر دقیقه و زمان کل۳۶ دقیقه به دویدن پرداختند. شیب نوار گردان به‌طور ثابت ۵ درصد در نظر گرفته شد. موش‌های گروه دیابتی کنترل و غیر دیابتی کنترل نیز در طول دوره هشت هفته بر روی نوارگردان قرار گرفته ولی هیچ فعالیتی انجام ندادند(۲۲). درهردوپروتکل سه دقیقه برای گرم کردن و سرد کردن با سرعت ۱۰متربردقیقه اختصاص یافت. تمرینات بکارگرفته شده در پژوهش حاضر همانند دیگر کارهای پژوهشی براساس پایه‌های کاربردی در تمرینات استقامتی و تناوبی طراحی شده بود و در آن شدت‌ها با توجه به سرعت بیشینه به‌دست آمده و تنظیم شدند.

مکمل دهی:

بعد از هرجلسه تمرینی گروه‌های مکمل روزانه ۳ میلی‌گرم مکمل آستاگزانتین (شرکت SIGMA) به ازای هرکیلوگرم از وزن بدن محلول در ۰/۳ میلی لیتر روغن زیتون به‌صورت گاواژ دریافت می‌کردند.

روش استخراج بافت:

۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی (ناشتایی شبانه) موش‌های مورد مطالعه به‌واسطه تزریق داخل صفاقی مخلوط

کتامین با دوز ۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و زایلوزین با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بیهوش شدند. سپس قفسه سینه حیوان شکافته شده و پس از پرفیوژ قلب، بافت قلبی بطن چپ برداشته شده و در نیتروژن مایع فریز شده و برای آنالیزهای بعدی بعدازشست و شو در سالین نگه داشته شد.

سنجش بیان ژن با روش RealTime-Pcr:

حدود ۵۰mg از بافت قلب جدا گردید و با اضافه کردن ۷۰۰ میکرو لیتر محلولROUCHE Trizo بافت مورد نظر با استفاده از گرایندر هموژنیزه شد. پس از هموژن شدن کامل بافت، محلول به میکروتیوپ انتقال داده شد و محلول حاصل به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه به صورت on Ice قرارگرفت. سپس حدود ۲۰۰ میکرولیترکلروفرم اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه به صورت on Ice قرار گرفت. سپس تیوپ به مدت ۱۵ ثانیه به آرامی سرو ته گردید و این عمل تا جایی ادامه پیدا کرد که مخلوط به طول کامل هموژن گردید و ۳ فاز بهم خورد. تیوپ حاوی نمونه دوباره به مدت ۱۵ دقیقه در یخ انکوبه شد. سپس تیوپ را در آورده به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در دور ۱۲۰۰۰rpm با استفاده از سانترفیوژ یخچال دار ساخت کمپانی زیگما سانتریفیوژ شد. بعد از سانتریفیوژ، محلول درون تیوپ به صورت ۳ فازی درآمد که فاز رویی به رنگ آبی شفاف به یک میکروتیوپ Rnase free ۱/۵ میلی لیتری جدید انتقال داده شد و ۱ میلی لیتر ایزوپروپانول سرد به آن اضافه و تیوپ به آرامی سرو ته گردید. به مدت ۲۰ دقیقه درفریزر انکوباسیون انجام گرفت. سپس به مدت ۲۰ دقیقه تیوپ مورد نظر با شرایط قبلی یعنی دور ۱۲۰۰۰rpm و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. بعد از انجام سانتریفیوژ، رسوب RNA به صورت یک plate در کف میکروتیوپ ظاهر شد. ابتدا تمام سوپرناتانت حذف و بعد به میکروتیوپ ۱ میلی لیتر اتانول ۷۰-۷۵٪ اضافه گردید. به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور ۷۵۰۰rpm سانتریفیوژ انجام شد. بعد از انجام سانتریفیوژ، ابتدا سوپرناتانت حذف گردید سپس PLATE به صورت airdry کاملاً خشک شد. سپس حدود ۴۰ میکرولیتر از محلول Depc water اضافه گردید. با استفاده از دستگاه Dry Bath رسوب و RNA در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت تا در آب حل شوند. بعد از انجام Spin غلظت نمونه با استفاده از دستگاه Nano Drop خوانده شد. برای تهیه‌ی اولین رشته از cDNA از روی RNA کل استخراج شده، از کیت با نام تجاری (TAKARA) استفاده گردید. این کیت بر اساس آنزیم ترانسکریپتاز معکوس تهیه شده است. سنتز رشته cDNA به کمک پرایمر اختصاصی ژن‌ها انجام شد که به‌صورت اختصاصی در نقاط مختلفی به رشته RNA اتصال می‌یابد. برای این کار و سایر PCR های معمولی طی این مطالعه از دستگاه ساخت کمپانی BIORAD استفاده شد. میزان بیان ژن BAX و Bcl2 و ژن u6 به‌عنوان کنترل داخلی با استفاده از دستگاه Light Cycler 96 و رنگ syber green I تعیین شد. جفت پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از نرم‌افزار oligo7 طراحی شد و توسط شرکت Roche سنتز شد. برای بررسی بیان هر ژن بر حسب تعداد نمونه ابتدا مخلوطی از ((Syber Green PCR Master Mix Taq (2x، Mix Primer، DEPC-treated Water) تهیه و پس از توزیع ۹ میکرولیتر از مخلوط در تیوپ‌های مخصوص دستگاه، به هر کدام ۱ میکرولیتر از cDNA سنتز شده اضافه گردید. سپس در تیوپ‌ها را بسته و نمونه‌ها در دستگاه Run گردیدند. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده شده است. سیکل زمانی مورد استفاده در Real Time –PCR شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه و ۶۰ درچه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه بود. میزان بیان ژن‌های موردنظر با روش 2-ΔΔCT اندازه‌گیری شد.

جدول (۱): الگوی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش

Genes	Primer sequence	Product length, bp
Bcl2	F: 5'TATATGGCCCCAGCATGCGA3'	136
	R: 5'GGGCAGGTTTGTCGACCTCA3'	
bax	F: 5'ATCCAAGACCAGGGTGGCTG3'	150
	R: 5'CACAGTCCAAGGCAGTGGGA3'	
b actin	F: 5'CTCTGTGTGGATCGGTGGCT3'	138
	R: 5'GCAGCTCAGTAACAGTCCGC3'	

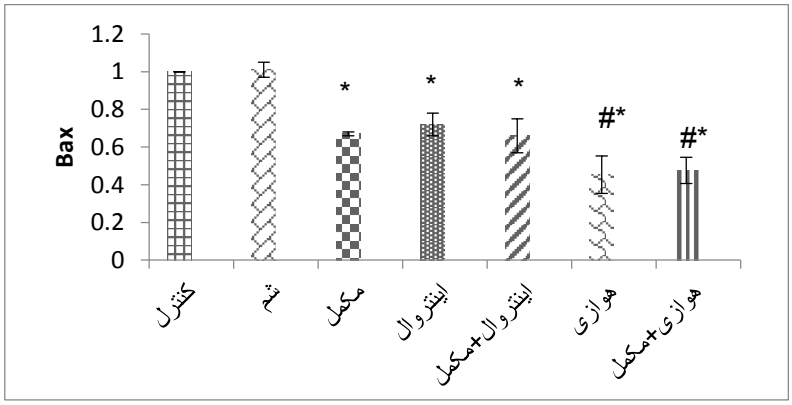
داده‌ها بااستفاده از نرم‌افزار Graph Pad Prism8.0.2 آنالیز شد و از آزمون تحلیل واریانس یک راهه جهت بررسی اختلاف معنی‌داری میانگین‌های بین گروه‌ها و در صورت معنی‌دار بودن نتایج از آزمون پس تعقیبی توکی برای مقایسه‌ی زوج‌ها استفاده شد. سطح معنی‌داری کم‌تر از ۰/۰۵ درنظر گرفته شد.

یافته‌ها

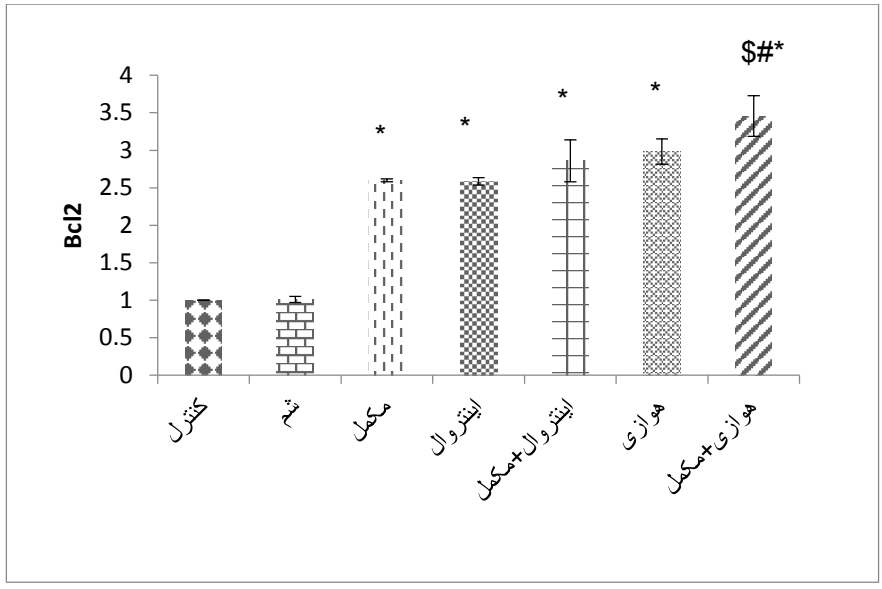
نتایج بیان ژن bax به‌وسیله آزمون تحلیل واریانس یکطرفه نشان داد که بین میانگین گروه‌ها اختلاف معنی‌داری وجود دارد (F=۳۴/۳۹، P=۰/۰۰۰۱). براساس نتایج آزمون تعقیبی توکی بین گروهشم با گروه کنترل تفاوتی وجود نداشت (P=۰/۹۹). میزان بیان ژن bax در گروه مکمل کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل (P=۰/۰۰۰۴) و شم (P=۰/۰۰۰۳) نشان داد اما این کاهش نسبت به گروه اینتروال (P=۰/۹۶) و اینتروال+مکمل (P=۰/۹۹) معنی‌دار نبود. بین میانگین‌های دوگروه تمرین هوازی وتمرین هوازی+مکمل با گروه مکمل اختلاف معنی‌دار بود (به‌ترتیب P=۰/۰۳،P=۰/۰۱) و میزان کاهش بیان bax در گروه تمرین هوازی+مکمل بالاتر بود. همانگونه که در شکل نشان داده شده است همه گروه‌های تمرینی بیان کاهشی bax را نسبت به گروه کنترل نشان دادند که میانگین این کاهش در دو گروه تمرینات هوازی (P=۰/۰۰۰۱) و هوازی+مکمل (p=۰/۰۰۰۱) نسبت به گروه اینتروال (p=۰/۰۰۱) و اینترول+مکمل (p=۰/۰۰۰۳) بالاتر بود (شکل ۱).

نتایج بیان ژن Bcl2 نیز اختلاف معنی‌داری را بین گروه‌ها نشان داد (F=۱۰۳/۷،P=۰/۰۰۰۱). براساس نتایج آزمون تعقیبی توکی بین گروهشم با گروه کنترل تفاوتی وجود نداشت (P=۰/۹۹). گروه مکمل افزایش معنی‌داری را نسبت به دو گروه کنترل و شم نشان داد (P=۰/۰۰۰۱). تمرینات هوازی و اینتروال به‌طور معنی‌داری بیان Bcl2 را در مقایسه با گروه کنترل (P=۰/۰۰۰۱،P=۰/۰۰۰۱) افزایش دادند اما نسبت به گروه مکمل تفاوت‌ها معنی‌دار نبود (P=۰/۱۳،P=۰/۹۹). میزان بیان ژن BL2 در گروه‌های ترکیبی هوازی+مکمل و اینتروال+ مکمل نیز بیان افزایشی نسبت به گروه کنترل نشان داد (p=۰/۰۰۰۱،p=۰/۰۰۰۱). همچنین میانگین این افزایش در گروه هوازی+مکمل نسبت به گروه مکمل (P=۰/۰۰۰۳) تفاوت معنی‌دار داشت اما بین میانگین گروه اینتروال+مکمل با گروه مکمل (P=۰/۴۹) تفاوتی وجود نداشت (شکل ۲).

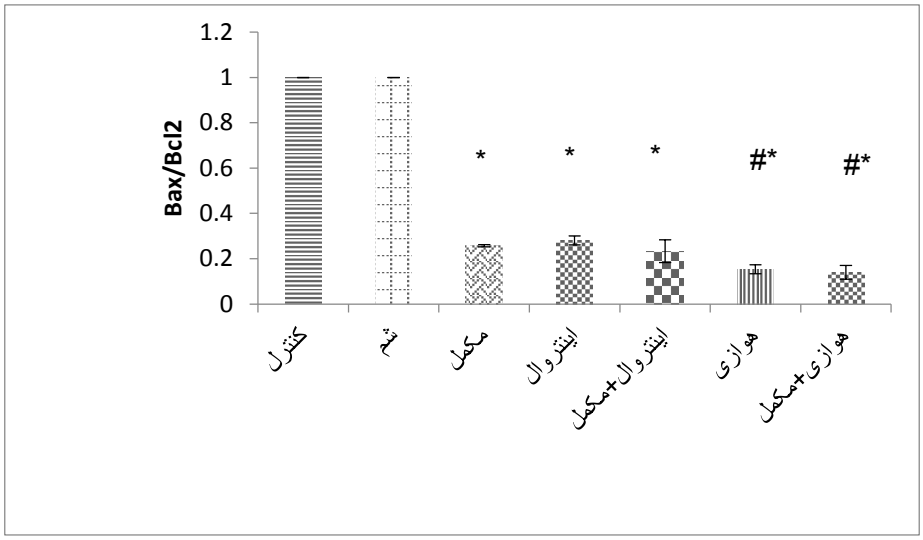
نسبت bax/bcl2 نیز تفاوت معنی‌داری را بین گروه‌ها نشان داد (F=۶۳۰/۹،P=۰/۰۰۰۱) به‌طوری‌که میانگین این نسبت در همه گروه‌ها بجز شم در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌دار مشابهی را نشان داد (P=۰/۰۰۰۱) اما بین میانگین گروهشم با کنترل تفاوتی وجود نداشت (P=۰/۹۹). همچنین میانگین گروه هوازی و هوازی مکمل در مقایسه با گروه مکمل (به‌ترتیب P=۰/۰۰۴، p=۰/۰۰۱) اختلاف معنی‌داری نشان داد ولی بااین‌وجود این تفاوت‌ها در گروه اینتروال و اینتروال مکمل نسبت به گروه مکمل معنی‌دار نبود (به‌ترتیب P=۰/۹۲، p=۰/۹۲)(شکل ۳).



شکل (۱): بیان ژن bax در بافت قلبی گروه‌های مورد مطالعه
×تفاوت معنی‌داربا گروه کنترل، # تفاوت معنی‌دار با گروه مکمل



شکل (۲): بیان ژن bcl2 در بافت قلبی گروه‌های مورد مطالعه
×تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل، # تفاوت معنی‌دار با گروه مکمل، $ تفاوت معنی‌دار باگروه هوازی



شکل (۳): نسبت bax/bcl2 دربافت قلبی گروه‌های مورد مطالعه
×تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل، # تفاوت معنی‌دار با گروه مکمل

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که bax به‌عنوان شاخص آپوپتیک و bcl2 به‌عنوان شاخص آنتی آپوپتیک تحت تأثیرتمرینات ورزشی و مکمل آستاگزانتین در رت‌های دیابتی بیان می‌شوند به‌طوری‌که نه تنها هردوعامل تمرین و مکمل تأثیرمجزایی در بیان ژن در بافت قلبی نشان دادند بلکه اثر توام آنها موجب بیان بیشتر bcl2، کاهش بیان bax و کاهش نسبت bax/bcl2 گردید که این تغییرات در گروه تمرینی هوازی با مکمل بیشتربود.

دیابت ملیتوس در پاتوژنز بیماری‌های مختلف قلبی که به‌عنوان علت عمده مرگ ومیر در سرتاسر جهان شناخته می‌شود، مشارکت دارد. تولید گونه‌های اکسیژن واکنشی اضافی در بافت‌های هایپرگلایسمی منجر به تغییرات ساختاری و عملکردی در قلب می‌شود. استرس اکسیداتیو منجر به تولید رادیکال‌های سوپراکسید

میتوکندریایی همراه با دیگر گونه‌های واکنشی می‌شود که با سیستم آنتی‌اکسیدانی درونی در تعادل نیست. رادیکال‌های سوپراکسید با دیگراجزای داخل سلولی همانند نیتریک اکسید واکنش داده و منجر به تولید گونه‌های نیتروتیروزین می‌شوند که در بایوپسی میوکاردی بیماران دیابتی نوع ۲ تنظیم مجدد می‌شود. این مولکول‌های واکنشی منجر به آپوپتوز سلول‌های کاردیومیوسیت و همچنین چندین بیان ژن غیرطبیعی وابسته به هدایت سیگنال می‌شود. درمان موش‌های دیابتی با آنتی‌اکسیدان ها می‌تواند زیرساخت‌های قلبی و عملکرد قلب را بهبود می‌بخشد (۲۳). براساس یافته‌های اخیرآستاگزانتین با حفاظت از کاردیومیوپاتی دیابتی ناشی از گلوکز بالا از طریق مسیر سیگنالینگ Akt استحقاق بررسی بیشتری به‌عنوان یک عامل حفاظتی قلبی را دارد(۲۴).

مطالعات قبلی نشان داده‌اند که آستاگزانتین می‌تواند علایم دیابت را بهبود بخشیده وتوسعه عوارض دیابت را در مدل‌های دیابتی تجربی به تأخیر اندازد. این بهبودها شامل کاهش قند خون، تسکین رتینوپاتی و نفروپاتی دیابتی می‌شود(۲۵، ۲۶). بااین وجود در مطالعه‌ای سطوح قند خون رت‌های دیابتی توسط آستاگزانتین تحت تأثیر قرار نگرفت اما از آپوپتوز پریسایت ها و تأخیر در توسعه و پیشرفت رتینوپاتی دیابتی در رت‌های دیابتی به‌واسطه کاهش تولید Age ها و رهایش سیتوکین های التهابی و شکستن کاسپاز۳ بعنوان واسطه آپوپتوز پریسایت ها محافظت می‌کند(۲۷). Guo و همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند که مکمل آستاگزانتین می‌تواند میانجی مسیر سیگنالینگ Nrf2 شده و بیان Nrf2 و HO-1 را بالابرده و بدینوسیله فعالیت SOD و T-AOC را افزایش داده و سطح استرس اکسیداتیو و آپوپتوز میوکاردی ناشی از شش هفته تمرینات ورزشی شدید را کاهش دهد(۲۸) که همسو با این تحقیقات xue و همکاران نیز کاهش آپوپتوز کاردیومیوسیت‌ها را بعد از میکروامبولیزاسیون کرونری بدنبال مصرف آستاگزانتین در رت‌ها نشان دادند(۲۹). در این مطالعه نیز بیان bax و bcl2 بدنبال مصرف آستاگزانتین یک مکانیسم مهمی را برای اثرات آنتی آپوپتوزی آستاگزانتین نشان داد. مطالعه دیگری بر اثرات آنتی آپوپتوزی آستاگزانتین برسلول های اپی تلیال حبابچه‌ای نوع II نشان داد که آستاگزانتین از انتقال درون سلولی پروتئین‌های خانواده bcl2 ناشی از هیدروژن پراکسید پیشگیری کرده و سیگنال‌های سمیت سلولی را با مهار تشکیل گونه‌های اکسیژن واکنشی و فعال‌سازی سیگنال‌های حفاظتی در سلول‌های اپی تلیال حبابچه‌ای تعدیل می‌کند(۳۰).

تمرینات ورزشی به‌عنوان سنگ بنای مدیریت دیابت نوع ۲ توانایی کاهش خطر بیماری‌های قلبی عروقی را در بیماران دیابتی دارا می‌باشد. ورزش می‌تواند از میوکارد به‌واسطه بهبود متابولیسم سلول‌های میوکاردی، کاهش آسیب استرس اکسیداتیو، بهبود فیبروز میوکاردی، مهار آپوپتوز و کاهش اختلالات میکروواسولار محافظت کند و در نهایت اثر قوی بر حفاظت درمقابل کاردیومیوپاتی دیابتی داشته باشد. تمرین به‌عنوان یک راهبرد دارویی می‌تواند یک عامل نویدبخش برای درمان‌های جایگزین جهت پیشگیری و درمان دیابت و عوارض قلبی عروقی آن درنظر گرفته شود(۳۱).

حبیبی و همکاران با مطالعه تأثیر برنامه تمرینی شنا و دیابت نوع ۲ بر بیان تعدادی فاکتورهای آنتی آپوپتوزی و آپوپتوزی و تغییرات کلیگوژن در بافت قلبی موش‌های اوواریکتومی شده دریافتند که تمرینات ورزشی از اختلالات قلبی پیشگیری کرده و بیان مارکرهای ضد آپوپتوزی bcl2 و mir-133 را افزایش و بیان bax، کاسپاز ۳ و کاسپاز ۸ را در قلب موش‌های اوواریکتومی شده کاهش می‌دهد. باتوجه به این یافته‌ها می‌توان گفت که تمرینات ورزشی از طریق تعدیل microRNA ها می‌تواند افزایش استرس اکسیداتیو و تعدادی پروتئین‌های هدف در حیوانات دیابتی با چندین مسیر مولکولی را مهار کرده و بدین ترتیب واسطه حفاظت قلبی باشد. ازاین‌رو تمرینات ورزشی منجر به کاهش آپوتوز و رمدلینگ قلبی می‌شود (۳۲). تعدادی از مطالعات نیز نشان داده‌اند که تمرینات ورزشی با کاهش فسفوریلاسیون cJNK در رت‌های چاق انتقال سیگنال‌های آپوپتوزی پایین دست را مسدود می‌کند(۱۱). ورانکی و همکاران نیز دریافتند که تمرینات ورزشی با افزایش پتانسیل درون غشایی میتوکندریایی موجب کاهش رهایش سیتوکروم c به سیتوپلاسم شده و بدین طریق از آپوپتوز کاردیومیوسیت‌ها پیشگیری می‌کند(۱۰). در مطالعه حاضر نیز همسو با تحقیقات قبلی تمرینات ورزشی هوازی بیان bax را مهارکرده و بیان bcl2 رادر بافت قلبی رت‌های دیابتی افزایش داد. نتایج تحقیقات کانتر و همکاران حاکی از آن بود که تمرینات با شدت کم اثرات درمانی روی تغییرات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی و آپوپتوزی ناشی از دیابت دارد (۳۳). بدنبال استرس و محرک خارجی آبشار سیگنالی متقابلی رخ می‌دهد. پروتئین کیناز b یک عامل اساسی در مسیر سیگنالینگ PI3K است که نقش اساسی در بسیاری از فرایندهای سلولی دارد. افزایش بیان این پروتئین مسیر آپوپتوز را با فسفوریلاسیون پروتئین‌های آنتی آپوپتوزی bcl2 و غیرفعال کردن پروتئین‌های آپوپتوزی bax یا با کنترل مستقیم فعالیت کاسپاز مهار می‌کند. مطالعات کاهش سطوح پروتئین کیناز b را در نمونه‌های حیوانی دیابتی نشان دادند(۳۴). علاوه بر این ورزش به‌عنوان یک مکانیسم حفاظت سلولی در برابر آپوپتوزنشان داد که موجب افزایش بیان این پروتئین به‌ویژه در تمرینات هوازی می‌شود(۳۵).

افزایش در نسبت bax/bcl2 با مکانیسم آپوپتوز همراه می‌باشد همانگونه که فرایند آپوپتوز در مسیر داخلی به دلیل بیان bax بالاتر از bcl2 رخ می‌دهد بنابراین منجر به افزایش این نسبت شده و رهایش سیتوکروم c را از سیتوپلاسم برای تشکیل کمپلکس آپوپتوزوم همراه با apaf-1 تسهیل کرده و درنهایت منجر به فعال‌سازی کاسپاز ۹ همراه با کاسپاز ۳ شده و آپوپتوز را ایجاد می‌کند (۳۶). مشابه با یافته‌های ما خاکدان و همکاران نشان دادند که تمرینات اینتروال با شدت زیاد بیان سیرتوئین ۱ و bcl2 را در رت‌های دیابتی با بهبود کسر تزریقی بطن چپ وکسر کوتاه شدگی افزایش می‌دهد(۱۶). رمضانی و همکاران نیز بدنبال چهارهفته تمرینات اینتروال کاهش بیان فاکتورهای آپوتوزی را در بافت قلب رت‌های دیابتی نشان دادند(۳۷). حسن پور و همکاران کاهش بیان bax را بدنبال اجرای هشت هفته تمرینات اینتروال و هوازی مداوم در بافت قلبی رت‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین و رژیم غذایی پرچرب گزارش کردند اما مغایر با یافته‌های ما بیان bcl2 تحت تأثیر هردوشیوه تمرینی قرار نگرفت. محققان براساس شواهد موجود معتقدند که شدت و مدت و تواترتمرینات عامل اساسی مؤثر در کاهش آپوپتوز می‌باشد (۳۸) . بنابراین می‌توان علت تناقض را در نوع القای دیابت نوع ۲ در مطالعه حاضر با مطالعات قبلی و شدت و مدت و تواتر تمرینات بیان نمود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تمرینات هوازی و اینتروال همراه با مصرف مکمل آستاگزانتین کاهش فاکتورهای آپوپتوزی را در بافت قلب به همراه دارد که احتمالاً به‌دلیل اثرات هم افزایی هردو عامل تمرین و مکمل نسبت به اثر مجزای هر کدام از عوامل می‌باشد. در مطالعه‌ای که به بررسی اثرات آستاگزانتین بر انفارکتوس میوکاردی ناشی از ایزوپروترنول و هایپرتروفی قلبی در رت‌های پیر پرداخته شد یافته‌ها نشان داد که در گروه دریافت کننده آستاگزانتین از افزایش وزن ترقلب پیشگیری شده و نفوذ سلول‌های التهابی و فیبروز کاهش یافت که این اثرات حفاظتی آستاگزانتین در گروه رت‌های ایزوپروترنول با بهبود عملکرد آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش مارکرهای استرس اکسیداتیو همانند ما لون دی آلدهید و نیتریک اکساید و محصولات اکسیداسیون پروتئین (APOP) در این رت‌ها بود(۳۹). درمطالعه حاضرمحدودیت هایی نیز وجود داشت که می‌توان عدم نمونه‌برداری از بافت پانکراس در مرحله القای دیابت نوع ۲با استرپتوزوتوسین و نیکوتین آمید به دلیل محدودیت زمانی و عواقب احتمالی ناشی از بایوپسی در رت‌ها نام برد. همچنین می‌توان به استرس ناشی از انجام گاواژ که متوجه رت‌های دریافت کننده مکمل می‌شد اشاره کرد. به دلیل محدودیت‌های مالی جهت بررسی دقیق‌تر آپوپتوز در بافت قلب تکنیک TUNEL انجام نشد که زمینه بررسی در مطالعات آینده را فراهم می‌آورد. علاوه بر این پیشنهاد می‌شود مطالعات پیش رو از تأثیر تمرینات مختلف به همراه مکمل آستاگزانتین بر بافت پانکراس غافل نمانند.

نتیجه‌گیری

به‌طور خلاصه در مطالعه حاضر دریافتیم که ترکیب هردو شیوه تمرینی با مکمل آستاگزانتین با کاهش بیان فاکتورهای آپوپتوزی در بافت قلبی رت‌های مورد آزمایش نسبت به گروه کنترل دیابتی و افزایش بیان فاکتورهای آنتی اپوپتوزی به‌ویژه در گروه ترکیبی هوازی مکمل محافظت قلبی بیشتری را فراهم می‌آورد. این نتایج احتمالاً به دلیل مکانیسم‌های هم سوی هردو عامل درکاهش استرس اکسیداتیو و افزایش عمکرد آنزیم‌های سیستم آنتی‌اکسیدانی و مسیرهاس سیگنالینگ Act و Pkb در رت‌های دیابتی تحت آزمایش بود. پیشنهاد می‌شود یافته‌های این تحقیق در مطالعات کارآزمایی بالینی مورد استفاده قرار گیرد و در صورت کسب نتایج مثبت، به‌عنوان یک شیوه مکمل در برنامه درمانی دیابتی‌های نوع ۲ گنجانده شود.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر برگرفته از نتایج رساله دکتری رشته فیزیولوژی ورزشی گرایش قلب، عروق و تنفس دانشگاه ارومیه مطابق با کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی ارومیه مورد تأیید قرارگرفت. از همکاری و مساعد صمیمانه اساتید دانشکده تربیت‌بدنی و علوم پزشکی ارومیه که موجب تسهیل روند اجرای پژوهش شدند تقدیر می‌گردد.

References:

1. Lee W-S, Kim J. Diabetic cardiomyopathy: where we are and where we are going. Korean J Intern Med 2017;32(3):404.
2. Gimenes C, Gimenes R, Rosa C, Xavier N, Campos D, Fernandes A, et al. Low intensity physical exercise attenuates cardiac remodeling and myocardial oxidative stress and dysfunction in diabetic rats. J Diabetes Res 2015;2015.
3. Shokri Mashhadi N. Effect of Astaxanthin intake on expression of miR-146a and miR-126 in plasma, oxidative stress and inflammation markers and

glycemic profile, compared with placebo in patients with type 2 diabetes mellitus: Ahvaz Jundishapour University of Medical Sciences; 2016.

4. Doustar Y, Mohajeri D, Rezaei A. Effect of grape seed extract on cardiomyocyte apoptosis in streptozotocin induced diabetic rats. Med Sci J Islam Azad Univ Tehran Med Branch 2011;21(3):168-74.
5. Novoa U, Arauna D, Moran M, Nuñez M, Zagmutt S, Saldivia S, et al. High-intensity exercise reduces cardiac fibrosis and hypertrophy but does not restore the nitroso-redox imbalance in diabetic cardiomyopathy. Oxid Med Cell Longev 2017;2017.
6. Zhou Y-Y, Li Y, Jiang W-Q, Zhou L-F. MAPK/JNK signalling: a potential autophagy regulation pathway. Biosci Rep 2015;35(3):e00199.
7. Hashish HA, Kamal RN. Effect of curcumin on the expression of Caspase-3 and Bcl-2 in the spleen of diabetic rats. J Exp Clin Anat 2015;14(1):18.
8. Al Hroob AM, Abukhalil MH, Hussein OE, Mahmoud AM. Pathophysiological mechanisms of diabetic cardiomyopathy and the therapeutic potential of epigallocatechin-3-gallate. Biomed Pharmacother 2019;109:2155-72.
9. Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach: position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). Diabetes care 2012;35(6):1364-79.
10. Veeranki S, Givvimani S, Kundu S, Metreveli N, Pushpakumar S, Tyagi SC. Moderate intensity exercise prevents diabetic cardiomyopathy associated contractile dysfunction through restoration of mitochondrial function and connexin 43 levels in db/db mice. J Mol Cell Cardiol 2016;92:163-73.
11. Cheng S-M, Ho T-J, Yang A-L, Chen I-J, Kao C-L, Wu F-N, et al. Exercise training enhances cardiac IGFI-R/PI3K/Akt and Bcl-2 family associated pro-survival pathways in streptozotocin-induced diabetic rats. Int J Cardiol 2013;167(2):478-85.
12. Cassidy S, Thoma C, Houghton D, Trenell MI. High-intensity interval training: a review of its impact on glucose control and cardiometabolic health. Diabetologia 2017;60(1):7-23.
13. Jonker JT, de Mol P, de Vries ST, Widya RL, Hammer S, van Schinkel LD, et al. Exercise and type 2 diabetes mellitus: changes in tissue-specific fat distribution and cardiac function. Radiology 2013;269(2):434-42.
14. Taylor JD, Fletcher JP, Mathis RA, Cade WT. Effects of moderate-versus high-intensity exercise training on physical fitness and physical function in people with type 2 diabetes: a randomized clinical trial. Phys Ther 2014; 94(12):1720-30.
15. Chengji W, Xianjin F. Exercise protects against diabetic cardiomyopathy by the inhibition of the endoplasmic reticulum stress pathway in rats. J Cell Physiol 2019;234(2):1682-8.
16. Khakdan S, Delfan M, Heydarpour Meymeh M, Kazerouni F, Ghaedi H, Shanaki M, et al. High-intensity interval training (HIIT) effectively enhances heart function via miR-195 dependent cardiomyopathy reduction in high-fat high-fructose diet-induced diabetic rats. Arch Physiol Biochem 2020;126(3):250-7.
17. Hussein A. Cardioprotective effects of astaxanthin against isoproterenol-induced cardiotoxicity in rats. J Nutr Food Sci 2015;5(335):2.
18. Al-Bulish MSM, Xue C, Waly MI, Xu J, Wang Y, Tang Q. The Defensive Role of Antioxidants Astaxanthin against Oxidative Damage in Diabetic Rats Injected with Streptozotocin. J Food Nutr Res (Newark) 2017;5(3):191-6.
19. Nguyen VP, Kim SW, Kim H, Kim H, Seok KH, Jung MJ, et al. Biocompatible astaxanthin as a novel marine-oriented agent for dual chemo-photothermal therapy. PloS one 2017;12(4):e0174687.

20. Eizadi M, Ravasi A, Soori R, Baesi K, Choubineh S. Effect of three months aerobic training on TCF7L2 expression in pancreatic tissue in type 2 diabetes rats induced by streptozotocin-nicotinamide. FEYZ 2017;21.:1-8
21. Akbarzadeh A. The effect of high intencity interval training combined with curcumin supplementation on Plasma glucose concentration and insulin resistance in diabetic rats. J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2018;25(12):961-9.
22. Kazemi F, Zahedi Asl S. Atni-inflammation effect of 8-week aerobic training on apelin plasma concentration in diabetic male rats. Diabetes Metabol 2017;16(2):85-93.
23. Yildirim SS, Akman D, Catalucci D, Turan B. Relationship between downregulation of miRNAs and increase of oxidative stress in the development of diabetic cardiac dysfunction: junctin as a target protein of miR-1. Cell Biochem Biophys 2013;67(3):1397-408.
24. Hu Y, Shen L, Li L, Li M, Yin W, Liu W, et al. Astaxanthin protects against diabetic cardiomyopathy via activation of Akt pathway in H9c2 cells. Trop J Pharm Res 2018; 17(11):2151-6.
25. Kim YJ, Kim YA, Yokozawa T. Protection against oxidative stress, inflammation, and apoptosis of high-glucose-exposed proximal tubular epithelial cells by astaxanthin. J Agric Food Chem 2009;57(19):8793-7.
26. Dong L-Y, Jin J, Lu G, Kang X-L. Astaxanthin attenuates the apoptosis of retinal ganglion cells in db/db mice by inhibition of oxidative stress. Mar Drugs 2013;11(3):960-74.
27. Yang M, Zhao T, Deng T, Wang Z. Protective effects of astaxanthin against diabetic retinal vessels and pro-inflammatory cytokine synthesis. Int J Clin Exp Med 2019;12(5):4725-34.
28. Guo X, Cao J, Wang Y, Zhou H, Zhang J, Niu Y, et al. PL-011 astaxanthin reduces high intensity training induced myocardial cell apoptosis via activating Nrf2 in rats. Exercise Biochemistry Review 2018;1(1).
29. Xue Y, Sun C, Hao Q, Cheng J. Astaxanthin ameliorates cardiomyocyte apoptosis after coronary microembolization by inhibiting oxidative stress via Nrf2/HO-1 pathway in rats. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2019;392(3):341-8.
30. Song X, Wang B, Lin S, Jing L, Mao C, Xu P, et al. Astaxanthin inhibits apoptosis in alveolar epithelial cells type II in vivo and in vitro through the ROS‐dependent mitochondrial signalling pathway. J Cell Mol Med 2014;18(11):2198-212.
31. Zheng J, Cheng J, Zheng S, Zhang L, Guo X, Zhang J, et al. Physical exercise and its protective effects on diabetic cardiomyopathy: what is the evidence? Front Endocrinol (Lausanne) 2018;9:729.
32. Habibi P, Alihemmati A, Ahmadiasl N, Fateh A, Anvari E. Exercise training attenuates diabetes-induced cardiac injury through increasing miR-133a and improving pro-apoptosis/anti-apoptosis balance in ovariectomized rats. Iran J Basic Med Sci 2020;23(1):79-85.
33. Kanter M, Aksu F, Takir M, Kostek O, Kanter B, Oymagil A. Effects of low intensity exercise against apoptosis and oxidative stress in Streptozotocin-induced diabetic rat heart. Exp Clin Endocrinol Diabetes 2017;125(09):583-91.
34. Kim DY, Jung SY, Kim CJ, Sung YH, Kim JD. Treadmill exercise ameliorates apoptotic cell death in the retinas of diabetic rats. Mol Med Rep 2013;7(6):1745-50.
35. Libonati JR. Cardiac effects of exercise training in hypertension. Int Sch Res Notices2013;2013.
36. Irmawati A, Nadira Jasmin S. The effect of moderate exercise on the elevation of Bax/Bcl-2 ratio in oral squamous epithelial cells induced by benzopyrene. Vet World 2018;11(2):177.
37. Ramezani N, Vanaky B, Shakeri N, Soltanian Z, Fakhari Rad F, Shams Z. Evaluation of Bcl-2 and Bax Expression in the Heart of Diabetic Rats after

Four Weeks of High Intensity Interval Training. Med Lab J 2019;13(1):15-20.

38. Hassanpour G, Azarbayjani MA, Shakeri N, Abednazari H. The Effect of Interval and Continued Trainings with Crocin on Apoptotic Markers in the Heart Tissue of High-Fat Diet and Streptozotocin Induced Type 2 Diabetic Rats. Rep Health Care 2017;3(3):58-70.
39. Alam MN, Hossain MM, Rahman MM, Subhan N, Mamun MAA, Ulla A, et al. Astaxanthin prevented oxidative stress in heart and kidneys of isoproterenol-administered aged rats. J Diet Suppl 2018;15(1):42-54.

Original Article

PROTECTIVE EFFECTS OF TWO TYPES OF EXERCISE WITH ASTAXANTHIN SUPPLEMENTATION ON APOPTOSIS OF CARDIAC TISSUE IN TYPE 2 DIABETIC RATS: INTERVENTIONAL AND EXPERIMENTAL STUDY

Nasrin Ebadi[1], Mohammad RezaZolfaghari[2], Firouz Ghaderi Pakdel [3]*

Received: 20 February, 2020; Accepted: 28 June, 2020

Abstract

Background & Aims: The chronic complications of diabetes are wide-ranging and affect almost all tissues of the body. Cardiac apoptosis is one of the most important cardiac complications of diabetics. The aim of this study was to investigate the effect of aerobic and interval training with astaxanthin supplement on cardiac tissue apoptosis in type 2 diabetic rats.

Materials & Methods: In this study, 35 Wistar male rats with a mean weight of 197.46 ± 15.55 g were used. Male rats were randomly divided into 7 groups after induction of diabetes, including diabetic control, diabetes sham, diabetes + aerobic exercise + supplement. Diabetes + Interval + Supplement, Diabetes + Interval, Diabetes + Aerobic, Diabetes + Supplement. Nicotine amide and streptozotocin injections were used to induce type 2 diabetes. Interval exercises for 8 weeks with 5 sessions per week with an intensity of 80% vo2max and aerobic exercises with an intensity of about 65 to 75% Vo2max were performed by running on the treadmill. The expression of bax and bcl2 genes was performed with Real-time-PCR technique and data analysis was performed by one-way analysis of variance.

Results: Bcl2 and Bax gene expression in both supplemental aerobic and supplemental interval groups were significantly different from the control group ($p < 0.05$). In addition, a significant difference was observed in Bcl2 and Bax gene expression in the aerobic+supplement group compared to the supplement group ($p < 0.05$). However, no significant difference in bcl2 and Bax gene expression was observed in the interval+Supplement group compared with the supplement group ($p < 0.05$).

Conclusion: Combining both exercise interventions with supplement, especially the combination of supplemental aerobic exercise with the double expression of bcl2 anti-apoptotic index and decreased bax apoptotic index can be used as a treatment to prevent the upward trend of apoptosis in the cardiac tissue of diabetic rats.

Keywords: Exercise, rat, astaxanthin, bax, bcl2. Diabetic Cardiomyopathies

Address: Faculty of Sport Sciences, Urmia University, Urmia, Iran.
Tel: +989143413941
Email: zolfaghari60@gmail.com

SOURCE: STUD MED SCI 2020: 31(6): 470 ISSN: 2717-008X

[1] *PhD Student of exercise physiology, Faculty of Sport Sciences, Urmia, Iran*
[2] *Assistant Professor of exercise physiology, Faculty of Sport Sciences, Urmia University, Urmia, Iran (Corresponding Author)*
[3] *Associate Professor of Physiology, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran*