Research Paper

The effect of four-week endurance training with probiotic supplementation on the expression of Bax and Bcl-2 in cardiomyocytes of diabetic rats

Maryam Delfan*, Niloofar Afrasiabian

Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran

*** Corresponding author e-mail: m.delfan@alzahra.ac.ir**

Citation: Delfan M, Afrasiabian N. The effect of four-week endurance training with probiotic supplementation on the expression of Bax and Bcl-2 in cardiomyocytes of diabetic rats. Daneshvar Medicine 2021; 29(3):17-28. doi: 10.22070/DANESHMED.2021.14363.1068

Received: 15 May 2021
Last revised: 02 Aug 2021
Accepted: 17 Aug 2021

Abstract

Background and Objective: Increased cardiomyocyte apoptosis is one of the main causes of diabetic cardiomyopathy. Considering the role of probiotics and exercise in improving the complications of diabetes, the aim of this study was to investigate the synergistic effect of endurance training and probiotic supplementation on the expression of Bax and Bcl-2 genes in cardiomyocytes of diabetic rats.

Materials and Methods: 30 male Wistar rats with an average weight of 270 ±10 g were randomly divided into 5 groups: Normal Control (NC), Diabetic Control (DC), Diabetic Probiotic Supplement (SDC), Diabetic Training (TD), and Probiotic Supplement. Probiotic-Diabetic Training (STD). Training groups with an intensity of 60-65% VO2peak ran on a treadmill in 5 days a week and for 4 weeks. At the same time, the supplement groups received 2 grams of the probiotic supplement daily. Expression of Bax and Bcl-2 genes in the left ventricle of rats was studied by qReal-Time PCR and data analysis was performed by two-way analysis of variance with a significance level of $p < 0.05$.

Results: Bax gene expression was decreased in all groups compared to the DC group ($p < 0.05$) but in the TD group there was no significant difference compared to the STD ($p = 0.918$). Also, Bcl-2 gene expression increased in all groups compared to the DC group ($p = 0.001$) but in the TD group, this increase was more significant than STD ($p = 0.002$).

Conclusion: It seems that endurance training with probiotic supplementation with a synergistic effect on some factors affecting cardiomyocyte apoptosis can be effective in reducing the complications of diabetes in cardiomyocytes of diabetic rats.

Keywords: Bax, Bcl-2, Diabetes, Endurance training, Probiotics

مقاله پژوهشی

تاثیر چهار هفته تمرین استقامتی به همراه مکمل یاری پروبیوتیک بر بیان ژن Bax و Bcl-2 در کاردیومیوسیت رت های دیابتی

نویسندگان: مریم دلفان *، نیلوفر افراسیابیان

گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: مریم دلفان **Email: m.delfan@alzahra.ac.ir**

چکیده

مقدمه و هدف: افزایش آپوپتوز کاردیومیوسیت ها از عوامل اصلی ایجاد کاردیومیوپاتی دیابتی است. با توجه به نقش پروبیوتیک ها و تمرینات ورزشی در بهبود عوارض ناشی از دیابت، هدف از پژوهش حاضر بررسی تاثیر هم افزای تمرین استقامتی و مکمل پروبیوتیک بر بیان ژن های Bax و Bcl-2 در کاردیومیوسیت های رت های دیابتی بود.

مواد و روش ها: ۳۰ سر رت نر نژاد ویستار با میانگین وزن ۱۰±۲۷۰ گرم، به صورت تصادفی به ۵ گروه: کنترل سالم (NC)، کنترل دیابتی (DC)، مکمل پروبیوتیک دیابتی (SDC)، تمرین دیابتی (TD) و مکمل پروبیوتیک – تمرین دیابتی (STD) تقسیم شدند. گروه های تمرینی با شدت ۶۰-۶۵ درصد vVO2peak، 5 روز در هفته به مدت ۴ هفته بر روی تردمیل دویدند. همزمان گروه های مکمل، روزانه ۲ گرم مکمل پروبیوتیک دریافت کردند. بیان ژن های Bax و Bcl-2 در بطن چپ رت ها به روش qReal-Time PCR، و تجزیه و تحلیل داده ها با آزمون آنالیز واریانس دوطرفه با سطح معنی داری p<۰/۰۵ انجام شد.

نتایج: بیان ژنBax در همه گروه ها نسبت به گروه DC کاهش داشت (p>۰/۰۵) اما در گروه TD نسبت به STD تفاوت معنادار نبود (p=۰/۹۱۸). همچنین بیان ژن Bcl-2 در همه گروه ها نسبت به گروه DC افزایش یافت (p=۰/۰۰۱) اما در گروه TD نسبت به STD این افزایش معنادارتر بود (p=۰/۰۰۲).

نتیجه گیری: به نظر می رسد تمرین استقامتی به همراه مکمل یاری پروبیوتیک با تاثیر هم افزا بر برخی عوامل موثر بر آپوپتوز کاردیومیوسیت ها می تواند در کاهش عوارض ناشی از دیابت در کاردیومیوسیت رت های دیابتی موثر باشد.

واژه های کلیدی: Bax، Bcl-2، دیابت، تمرین هوازی، پروبیوتیک

دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۲۵
آخرین اصلاح‌ها: ۱۴۰۰/۰۵/۱۱
پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۲۶

مقدمه

سبک زندگی کم تحرک و پیشرفته شدن وسایل که شاخص کشورهای پیشرفته و در حال توسعه می‌باشد باعث افزایش شیوع بیماری‌های مختلف از جمله دیابت شده است (۱). دیابت یکی از مهم ترین عوامل خطرساز برای بیماری‌های قلبی عروقی به شمار می‌رود (۲). نوع خاصی از بیماری قلبی که به علت مقاومت به انسولین و پیشرفت هایپرگلایسمی[1] در بافت قلب بیماران دیابتی به وجود می‌آید کاردیومیوپاتی دیابتی نام دارد (۳). کاردیومیوپاتی به طور مستقیم بر ساختار و عملکرد قلب اثر می‌گذارد و بدون وجود بیماری شریان کرونری و یا فشارخون بالا توسط اختلال عملکرد سیستولیک و دیاستولیک بطن چپ و هایپرتروفی غیرطبیعی میوکارد مشخص می‌شود (۴). پژوهش‌ها نشان می‌دهند که ۷۵ درصد بیماران دیابتی در نهایت به علت ابتلا به این عارضه می‌میرند (۵).

یکی ازعوامل ایجاد کاردیومیوپاتی در بیماران دیابتی افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و به دنبال آن افزایش آپوپتوز در کاردیومیوسیت‌ها به دلیل هایپرگلایسمی میباشد (۶). آپوپتوز نوعی مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی است که از طریق دو مسیر درونی و بیرونی القا می‌شود و خانواده پروتئینی ***Bcl-2*** از مؤلفه‌های اصلی مسیر درونی این فرآیند به شمار می‌روند (۷). در میان پروتئین‌های خانواده ***Bcl-2***، پروتئین ***Bax*** به عنوان عامل پیش آپوپتوزی و پروتئین ***Bcl-2*** به عنوان عامل ضد آپوپتوزی از مهم‌ترین عوامل تعادل آپوپتوز در کاردیومیوسیت‌ها می‌باشند (۸). پروتئین ***Bax*** با کاهش پایداری غشای بیرونی میتوکندری باعث رهایش سیتوکروم c و فعال شدن آبشار کاسپازها و در نهایت آپوپتوز می‌گردد (۹). از سوی دیگر پروتئین ***Bcl-2*** با فعالیت ضد آپوپتوزی خود موجب مهار آزادسازی سیتوکروم c از میتوکندری می‌گردد، همچنین با خارج ساختن یون هیدروژن، به ***Apaf-1***[2] متصل شده و موجب حفظ یکپارچگی غشای میتوکندری می شود (۱۰). در شرایط هایپرگلایسمی بیان و عملکرد پروتئین‌های پیش آپوپتوزی[3] (***Bax***) افزایش و فعالیت و بیان پروتئین‌های ضد آپوپتوزی[4] (***Bcl-2***) کاهش می‌یابد که در نهایت منجر به افزایش آپوپتوز می‌شود (۱۱). همچنین در این شرایط سطوح رادیکال‌های آزاد اکسیژن افزایش می‌یابد که ممکن است از طریق مسیر ***PI3K/Akt*** منجر به آپوپتوز شود (۱۲). ***PI3K*** و ***Akt*** از عوامل اصلی سیگنالینگ انسولین و گیرنده ***IGFI*** هستند و سیگنالینگ ***IGFI*** به تعدیل پاسخهای زنده ماندن در بافت قلبی کمک می‌کند (۱۳). از سوی دیگر نقص در عملکرد انسولین خود موجب کاهش تولید متسع کننده‌های عروقی مانند نیتریک اکساید، افزایش استرس سلولی و در نتیجه تضعیف عملکرد پروتئین‌های ضد آپوپتوزی و ایجاد آپوپتوز در میوکارد می‌شود (۱۴).

با توجه به افزایش تولید رادیکال‌های آزاد در شرایط هایپرگلایسمی، همواره پژوهشگران به دنبال راه کاری برای کاهش عوارض ناشی از دیابت و رادیکال‌های آزاد میباشند و به نظر می‌رسد مصرف مکمل‌های آنتی اکسیدانی تاثیرگذار است (۱۵). اثرگذاری پروبیوتیک‌ها بر سوخت و ساز گلوکز بیشتر ناشی از خاصیت آنتی اکسیدانی و ویژگی تعدیل ایمنی توسط آنها است، پروبیوتیک‌ها با افزایش آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و کاهش تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی در گردش خون موجب کاهش التهاب و جلوگیری از تخریب سلول‌های بتا پانکراس می‌شوند (۱۶)، که نتیجه آن کاهش گلوکز خون و بهبود مقاومت به انسولین است و در نهایت به نظر می‌رسد کاهش گلوکز خون با کاهش بیان پروتئین ***Bax*** و افزایش بیان پروتئین ***Bcl-2*** باعث کاهش آپوپتوز کاردیومیوسیت‌ها می‌شود (۱۷).

به نظر می‌رسد که استفاده از تمرینات ورزشی (مقاومتی یا استقامتی) به عنوان یک مداخله غیر دارویی در کنار مکمل های دارویی نقش موثری در کاهش استرس اکسیداتیو و به دنبال آن کنترل عوارض ناشی از دیابت دارد (۱۸). به عنوان مثال تمرینات مقاومتی در کاهش ***Apaf-1*** و ***Bax***، افزایش ***Bcl-2***، بهبود عملکرد سیستولیک، افزایش سرعت اولیه پرشدن دیاستولی نقش دارند (۱۹،۲۰). از سوی دیگر پژوهش‌ها نشان می‌دهند که تمرینات هوازی با شدت متوسط باعث کاهش گلوکز خون، افزایش

[1] Hyperglycemia
[2] Apoptosis Protease-Activating Factor-1
[3] Proapoptotic
[4] Antiapoptotic

حساسیت به انسولین، تغییر مستقیم در بیان پروتئین‌های مربوط به آپوپتوز، تغییر سیگنالینگ گونه‌های اکسیژن فعال و افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی سیتوزولی میوکارد میشوند (۱۲،۲۱،۲۲).

به نظر می‌رسد که استفاده همزمان از پروبیوتیک‌ها و تمرینات ورزشی در افزایش آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، افزایش گلوتاتیون پراکسیداز، کاهش ***LDL*** و کاهش گلوکز خون موثر است (۲۳). با این وجود، تاثیر همزمان تمرینات ورزشی و مکمل یاری پروبیوتیک برمیزان بیان ژن‌های ***Bax*** و ***Bcl-2*** تا به حال مورد بررسی قرار نگرفته است. یافته‌های پژوهش‌های پیشین حاکی از اثرگذاری هر یک از این مداخلات بر نشانگرهای آپوپتوزی ذکر شده میباشد. به عنوان مثال Heo و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که ۸ هفته دویدن بر روی تردمیل موجب کاهش بیان ژن ***Bax***، کاهش بیان کاسپاز-۳ و افزایش بیان ژن ***Bcl-2*** در قلب رت‌های پیر دیابتی می شود (۲۴). از سوی دیگر در زمینه تاثیر پروبیوتیک‌ها بر بیان ژن‌های ***Bax*** و ***Bcl-2***، Wang و همکاران (۲۰۱۹) با بررسی رت‌های دیابتی دریافتند که استفاده از پروبیوتیک‌ها موجب کاهش بیان ژن ***Bax***، افزایش بیان ژن ***Bcl-2***، کاهش بیان ***IL-6*** و ***IL-10*** در قلب رت‌های دیابتی می‌شود (۱۷). با وجود این نتایج مشخص نیست کدامیک از این مداخلات اثر بیشتری در محافظت از قلب در شرایط دیابت دارند و همچنین مشخص نیست که آیا مداخله تمرین و مکمل می تواند به صورت هم‌افزا باعث کاهش بیان ژن ***Bax*** و افزایش بیان ژن ***Bcl-2*** شود؟ لذا پژوهش حاضر با هدف تعیین اثر همزمان تمرین هوازی و مکمل پروبیوتیک بر میزان بیان ژن‌های ***Bax*** و ***Bcl-2*** در کاردیومیوسیت رت‌های دیابتی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربی-آزمایشگاهی است که بر روی ۳۰ سر رت نر نژاد ویستار (سن ۸ هفته و وزن ۱۰±۲۷۰ گرم) تهیه شده از انستیتو پاستور ایران انجام گرفت. نمونه‌ها پس ازخریداری، به آزمایشگاه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی ایران منتقل شدند و در طول دوره پژوهش در قفس‌های پلیکربنات (ساخت شرکت رازی راد) و در شرایط استاندارد آزمایشگاهی (دمای ۳±۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۴۰ تا ۵۰ درصد و چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲) نگهداری شدند. در این دوره رت‌ها از پلت استاندارد مخصوص موش آزمایشگاهی تغذیه شدند و از آب و غذا به صورت آزاد استفاده کردند. تمام مراحل پژوهش با رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی (مطابق با پروتکل *هلسینکی*) مصوب دانشگاه علوم پزشکی با اخذ کد اخلاق از پژوهشگاه علوم ورزشی (IR.SSRC.REC.1398.013) تصویب و انجام شد.

گروه‌بندی

پس از یک هفته سازگاری رت‌ها به محیط آزمایشگاه، نمونه‌ها به طور تصادفی به ۵ گروه (n=۶) شامل: کنترل سالم (NC)، کنترل دیابتی (DC)، مکمل پروبیوتیک دیابتی (SDC)، تمرین دیابتی (TD) و مکمل پروبیوتیک - تمرین دیابتی(STD) تقسیم شدند.

القا دیابت

القا دیابت در همه گروه‌ها به جز گروه کنترل سالم انجام گرفت. بدین منظور از تزریق درون صفاقی اِستریتوزوتوسین[1] (Zellbio، آلمان)(۴۵ میلی گرم/ کیلوگرم به صورت حل شده در بافر ۰/۰۵ مول سیترات، pH=۴/۵) پس از ۱۲ ساعت ناشتایی شبانه برای دیابتی کردن نمونه‌ها استفاده شد. گسترش هایپرگلایسمی با افزایش سطح گلوکز در خون (گلوکز خون بیش از ۳۰۰ mg/dl)، ۷۲ ساعت پس از تزریق با اندازه‌گیری میزان گلوکز خون ناشتا توسط دستگاه گلوکومتر ۰۱ ساخت ژاپن، از ورید دم رت‌ها تایید شد.

آماده‌سازی مکمل پروبیوتیک

در طول دوره پژوهش (۴ هفته)، رت‌های گروه‌های SDC وSTD هر روز (۸-۱۰ صبح) مکمل پروبیوتیک (ساخت شرکت زیست تخمیر- ایران) دریافت کردند. بدین منظور هر رت روزانه، ۲ گرم پروبیوتیک محلول در ۳۰ میلی‌لیتر آب دریافت کرد. مکمل مورد استفاده شامل لاکتوباسیلوس اَسیدوفیلوس[2]، فِرمنتوم[3]، بیفیدوباکتریوم[4] و لُنگیوم[1] (10^{10} CFU/g) بود.

[1] Stereptozotocin
[2] Lactobacillus Acidophilus
[3] Lactobacillus Fermentum
[4] Bifidobacterium

پروتکل تمرینی

به منظور کاهش خطای پژوهش و همچنین آشنایی رت ها با نحوه دویدن بر روی تردمیل ویژه جوندگان، یک هفته پس از القا دیابت، رت ها در ۵ جلسه ۵-۱۵ دقیقه ای بر روی تردمیل قرار داده شدند تا با سرعت بسیار پایین تمرین کنند. از هفته دوم تمرین اصلی به مدت ۴ هفته ادامه یافت. برای ارزیابی توان هوازی رت ها از روش غیر مستقیم به شرح زیر استفاده شد (۱۸). در ابتدا بعد از ۵ دقیقه گرم کردن با سرعت 8/1 (m/min 03/0 (m/s)، سرعت نوارگردان هر سه دقیقه یک بار به میزان m/min 8/1 افزایش می یافت، vVO2peak زمانی بود که رت ها حداقل ۱/۳۰ دقیقه نتوانند با یک سرعت ثابت بدوند و بلافاصله پس از آن با افزایش سرعت قادر به دویدن نباشند (شیب تردمیل صفر درجه). پس از تعیین vVO2peak، هر جلسه پروتکل تمرینی شامل ۵ دقیقه گرم کردن با شدت ۳۰-۴۰ درصد vVO2peak، 30 دقیقه دویدن روی تردمیل با شدت ۶۰-۶۵ درصد vVO2peak و در نهایت ۵ دقیقه سرد کردن با شدت ۳۰ -۴۰ درصد vVO2peak بوده است. (گروه های NC، DC و SDC در برنامه تمرینی شرکت نکردند اما برای ایجاد شرایط یکسان ۵ بار در هفته به مدت ۵ دقیقه در هر جلسه برای سازگاری با محیط بر روی تردمیل خاموش قرار گرفتند). بافت برداری و سنجش متغییرهای پژوهش: ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه ی تمرین، پس از یک ناشتای شبانه، رت ها توسط تزریق درون صفاقی کتامین (۸۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) بی هوش شدند. نمونه خونی، مستقیما از قلب رت ها جمع آوری شد و جداسازی سرم با سانتریفیوژ کردن (Eppendorf،آلمان) به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت 3000 rpm در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد انجام گرفت. پس از آن عضله قلب رت ها استخراج و پس از اندازه گیری آنها به همراه سرم در ازت مایع قرار داده شد و سپس برای سنجش متغییرهای پژوهش در فریزر در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. به منظور بررسی تغییرات بیان ژنBcl-2 و Bax از تکنیک qReal-Time PCR استفاده شد. ۱۰۰ میلی گرم از عضله قلبی رت ها اندازه گیری و سپس استخراج RNA به وسیله تِرایزولQiagen) ،آلمان) و طبق دستورالعمل انجام شد. قبل از سنتز cDNA برای اطمینان از نبود DNA در نمونه استخراج شده، نمونه طی مراحلی به نام DNase I treatment، با DNaseI تیمار شد. در نهایت برای سنتز cDNA از کیت Transcriptor first strand cDNA synthesis kit (Roche، آلمان) طبق دستور العمل کیت استفاده شد. واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) با استفاده از Master Mix (ampliqont، دانمارک) در دستگاه qReal-Time (Corbett RotorGene 6000 PCR ،آلمان) انجام شد. واکنش های تکثیر بر اساس دستورالعمل سازنده کیت به شکل یک چرخه با ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه و به دنبال آن ۴۰ چرخه با ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه انجام شد و سپس منحنی استاندارد و تکثیر پرایمرها توسط نرم افزار موجود در سیستم آنالیز و رسم شد. در نهایت از ژن GAPDH برای کنترل داخلی و از فرمول -ct2ΔΔ برای کمی سازی داده ها استفاده شد. سنجش گلوکز پلاسما نیز، به روش گلوکز اکسیداز و به وسیله کیت تشخیص کمی گلوکز پلاسما (شرکت پارس آزمون) با حساسیت 5 mg/dl انجام گرفت.

روش آماری

به منظور تعیین نرمال بودن داده ها از شاپیروویلک استفاده شد، با توجه به معنادار نبودن این آزمون (p<۰/۰۵)، برای بررسی تفاوت بین گروه های کنترل سالم و کنترل دیابتی از آزمون آماری t مستقل و برای بررسی تفاوت بین گروه های دیابتی از آزمون آنالیز واریانس دوطرفه و برای تعیین جایگاه معناداری از آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد. تمامی تجزیه و تحلیل های آماری با نرم افزار Graph-pad prism نسخه ۸، در سطح معناداری p<۰/۰۵ انجام گرفت.

نتایج

در جدول ۱ مقادیر مربوط به گلوکز پلاسما و وزن عضله قلب در گروه های پژوهش آورده شده است. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که گلوکز پلاسما در گروه های

[1] Longum

TD و STD نسبت به گروه DC کاهش معناداری یافت. همچنین بین گروه TD و STD این تفاوت معنادار بود. با توجه به جدول ۱ وزن عضله قلب در گروه های NC و DC تفاوت معناداری داشت. همچنین بین گروه های TD و STD نسبت به گروه DC افزایش معناداری مشاهده شد. اما بین گروه های SDC و DC این تفاوت معنادار نبود.

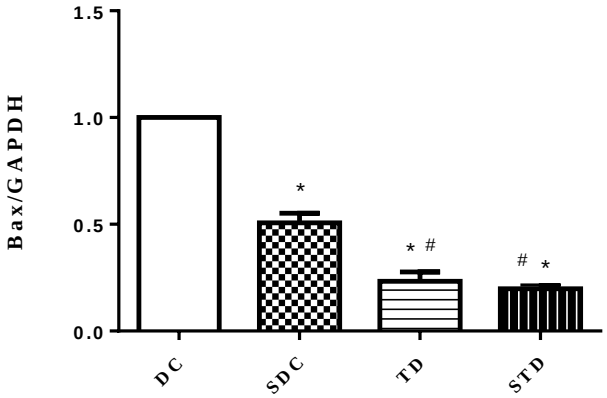
جدول ۱. میانگین و انحراف معیار مقادیر وزن قلب و مقادیر گلوکز در گروه‌های پژوهش

گروه ها / متغیر	کنترل نرمال NC	کنترل دیابتی DC	کنترل مکمل دیابتی SDC	تمرین دیابتی TD	تمرین-مکمل دیابتی STD
گلوکز پلاسما (mg/dl)	۲۱۹/۲۳±۰/¥۱۰	۵۰۰/۱۸±۸/۳۲ #※	۴۱۶/۷۶±۷/۵۵ #※	۲۶۷/۶۲±۵/۴۶ #¥	۲۲۰/۴۰±۳۰/¥۹۹
وزن قلب (mg)	۹۱۳/۴۱±۳/۸*¥	۶۶۰/۴۴±۵/۲۲	۶۶۲/۱۸±۰/۵	۹۱۲/۲۲±۵/۸ ¥※	۸۳۲/۶۳±۱/۷۵ ¥

اعداد به شکل میانگین± خطای معیار بیان شده‌اند، ※ نشانه معناداری نسبت به گروه کنترل سالم، ¥ نشانه معناداری نسبت به گروه کنترل دیابتی،# نشانه معناداری نسبت به گروه تمرین با مکمل

در پژوهش حاضر نتایج آزمون t مستقل تفاوت معناداری را در بیان ژن *Bax* بین گروه‌های NC و DC نشان داد (p=۰/۰۰۰)، که نشان دهنده تاثیر القا دیابت بر افزایش بیان ژن *Bax* در گروه DC نسبت به گروه NC می‌باشد. همچنین بیان ژن *Bax* بین گروه‌های پژوهش اختلاف معناداری داشت (P<۰/۰۵)، به طوری که در بیان ژن *Bax* گروه‌های SDC (P=۰/۰۰۰)، TD (p=۰/۰۰۰) و STD (p=۰/۰۰۰) نسبت به گروه DC کاهش معناداری مشاهده شد، همچنین در گروه‌های TD (p=۰/۰۱۰) و STD (p=۰/۰۶) نسبت به گروه SDC بیان این ژن کاهش معناداری داشت، اما بین دو گروه TD و STD در کاهش ژن *Bax* تفاوت معناداری مشاهده نشد (p=۰/۹۱۸)(شکل۱).

در پژوهش حاضر، نتایج آزمون t مستقل تفاوت معناداری را در بیان ژن *Bcl-2* بین گروه‌های NC و DC نشان داد (p=۰/۰۰۰)، که نشان دهنده تاثیر القا دیابت بر کاهش بیان ژن *Bcl-2* در گروه DC نسبت به گروه NC می‌باشد. همچنین بیان ژن *Bcl-2* بین گروه‌های پژوهش اختلاف معناداری داشت (p<۰/۰۵)، به طوری که در بیان ژن *Bcl-2* در گروه‌های TD و STD نسبت به گروه‌های DC و SDC افزایش معناداری مشاهده شد (p=۰/۰۰۰)، بیان ژن *Bcl-2* در گروه TD نسبت به STD نیز افزایش معناداری داشت (p=۰/۰۰۲)(شکل۲).



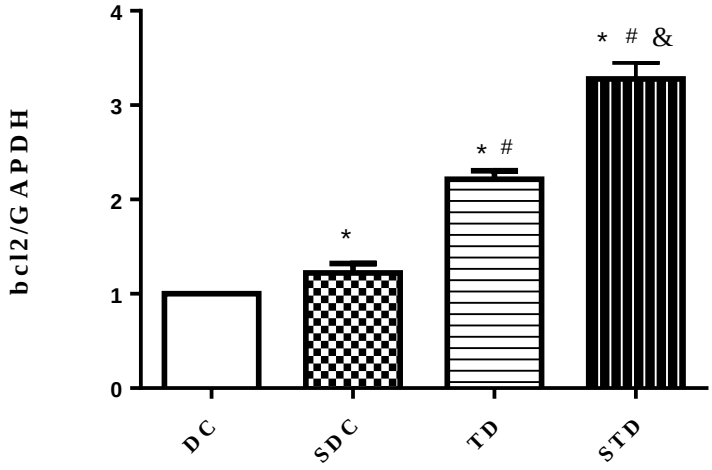
شکل ۱.نمودار تغییرات بیان ژن *Bax* در گروه‌های پژوهش

میانگین مقادیر بیان ژن ***Bax*** نسبت به ***GAPDH*** در گروه‌های پژوهش به وسیله روش آماری تحلیل واریانس دو طرفه و آزمون تعقیبی توکی

***معناداری نسبت به گروه **DC**،**#** معناداری نسبت به گروه **SDC** (برابر تغییر نسبت به گروه کنترل)

مقادیر به صورت میانگین±انحراف استاندارد گزارش شده است. تعداد حیوانات هر گروه، ۶ سر می‌باشد.

DC: کنترل دیابتی، **SDC**: مکمل پروبیوتیک دیابتی، **TD**: تمرین دیابتی، **STD**: مکمل پروبیوتیک - تمرین دیابتی



شکل۲. نمودار تغییرات بیان ژن *Bcl-2*

میانگین مقادیر بیان ژن *Bcl-2* نسبت به *GAPDH* در گروه‌های پژوهش به وسیله روش آماری تحلیل واریانس دو طرفه و آزمون تعقیبی توکی

*** معناداری نسبت به گروه DC، # معناداری نسبت به گروه SDC، &معناداری نسبت به گروه TD (برابر تغییر نسبت به گروه کنترل) مقادیر به صورت میانگین±انحراف استاندارد گزارش شده است. تعداد حیوانات هر گروه، ۶ سر می‌باشد.**

بحث

در بررسی یافته های پژوهش حاضر بین گروه DC و SDC در سطوح گلوکز پلاسما تفاوت معناداری مشاهده نشد. در این راستا Dang و همکاران (۲۰۱۸)، کاهش سطح گلوکز پلاسما و تنظیم بیان ژن های PI3K/Akt را به دنبال استفاده از پروبیوتیک ها در رت های دیابتی گزارش کردند که مغایر با پژوهش حاضر است (۲۵). دلیل این عدم همخوانی ممکن است متفاوت بودن طول دوره مکمل یاری و میزان پروبیوتیک مصرفی باشد که در پژوهش Dang ۸ هفته به میزان ۳ گرم در روز بوده است. از سوی دیگر گلوکز پلاسما بین گروه های TD و STD کاهش معناداری یافت، در راستای تایید این یافته Lumini و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که ۱۴هفته دویدن بر روی تردمیل موجب کاهش گلوکز پلاسما در رت های دیابتی می شود ولی در کاهش بیان کاسپاز-۳ تاثیرگذار نیست (۲۶). مکانیسم دقیق تاثیر پروبیوتیک ها بر کاهش گلوکز پلاسما به طور واضح مشخص نیست اما چندین مکانیسم احتمالی در این زمینه شناخته شده است. احتمال دارد پروبیوتیک ها با تاثیرگذاری بر سوخت و ساز لیپید ها، افزایش تعداد حاملین گلوگز در بافت ها (GLUT4) همچنین با جلوگیری از سنتز کبدی کلسترول توسط *SCFA*[1] موجب کاهش استرس اکسیداتیو و مقاومت به انسولین شوند (۲۷،۲۸). تمرینات استقامتی نیز احتمالا با افزایش جذب گلوکز به درون عضله، افزایش تعداد حاملین GLUT4، افزایش تعداد گیرنده های انسولینی، افزایش فعالیت گلیکوژن سنتاز و افزایش رهایش کلسیم از شبکه سارکوپلاسمی باعث کاهش گلوکز پلاسما می شوند (۲۹،۳۰). با توجه به دلایل ذکر شده یکی از اثرات مشترک تمرینات ورزشی و مکمل پروبیوتیک بر کاهش هم افزای گلوکز پلاسما، ممکن است به دلیل اثرگذاری این دو عامل بر افزایش بیان و تعداد حاملین GLUT4 باشد.

یافته ها نشان داد وزن عضله قلب در گروه های TD و STD نسبت به گروه DC افزایش معناداری داشته است. اما بین گروههای SDC و DC این تفاوت معنادار نبود. پژوهش های محدودی در ارتباط با تاثیر پروبیوتیک ها بر وزن عضله قلب انجام گرفته است، Chen و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که ۱۳ هفته استفاده رت های دیابتی از لاکتوباسیلوس ها موجب افزایش حساسیت به انسولین، کاهش فاکتور TNF-α و کاهش ROSها می شود و در نتیجه از تخریب اکسیداتیو قلب جلوگیری می کند (۳۱).

[1] Short Chain Fatty Acid

عدم تاثیر مکمل پروبیوتیک به تنهایی در پژوهش حاضر و ناهمسویی آن با پژوهش Chen ممکن است به دلیل تفاوت در سویه پروبیوتیک و مدت زمان مکمل یاری باشد. در پژوهشی همسو با پژوهش حاضر Chengji و همکاران (۲۰۱۹) دریافتند که ۱۲ هفته تمرین ورزشی هوازی، موجب افزایش وزن قلب رت های دیابتی می شود و همچنین با افزایش آنزیم های آنتی اکسیدانی، افزایش Bcl-2 و مهار کاسپاز-۳ استرس شبکه آندوپلاسمی و به دنبال آن آپوپتوز را کاهش می دهد (۲۱). پژوهش ها نشان می دهد که فعال سازی مسیر سیگنالینگ PI3K/AKT، منجر به محافظت از قلب در نمونه های مبتلا به آسیب های قلبی عروقی می شود و کاهش فعالیت این مسیر سیگنالینگ پیشرفت بیماری قلبی را سرعت می بخشد (۱۳). به نظر می رسد که تمرینات استقامتی با افزایش میزان پروتئین AKT باعث فعال شدن این مسیر سیگنالینگ می شوند و یا با تنظیم و تعدیل عوامل رشد مانند انسولین و IGFI در برطرف شدن اختلالات این مسیر سیگنالینگ نقش دارند (۳۲). همچنین ممکن است تمرینات استقامتی با افزایش گردش خون شریان کرونری و پروتئین های انقباضی موجب هایپرتروفی قلبی شوند (۳۳). بر اساس مطالب ارائه شده احتمال دارد همسو بودن این یافته با نتیجه پژوهش Chengji به دلیل تاثیر تمرینات استقامتی بر تنظیم انسولین و یا افزایش پروتئین های انقباضی باشد. با توجه به اینکه بین گروه TDو STD تفاوت معناداری در وزن قلب مشاهده نشد، می توان گفت تمرین استقامتی و مکمل یاری پروبیوتیک تاثیر هم افزایی بر افزایش وزن قلب نداشته است و ممکن است دوره تمرینی طولانی تر، بار تمرینی بیشتر و یا دوز و سویه متفاوت پروبیوتیک نتیجه متفاوتی به همراه داشته باشد.

از سوی دیگر یافته های پژوهش حاضر نشان داد که، بیان ژن Bax در همه گروه ها نسبت به گروه DC کاهش داشته است اما در گروه TD نسبت به STD تفاوت معنادار نبود. همچنین بیان ژن Bcl-2 در همه گروه ها نسبت به گروه DC افزایش یافت اما در گروه TD نسبت به STD این افزایش معنادارتر بود. به نظر می رسد تمرین استقامتی به همراه مکمل یاری پروبیوتیک تاثیر هم افزایی بر کاهش بیان ژن Bax نداشته است اما این دو مداخله می توانند به صورت هم افزا موجب افزایش بیان ژن Bcl-2 شوند.

در این راستا Wang و همکاران (۲۰۱۹) با بررسی رت های دیابتی دریافتند که استفاده از پروبیوتیک ها موجب کاهش بیان ژن Bax، افزایش بیان ژن Bcl-2، کاهش بیان IL-6 و IL-10 در قلب رت های دیابتی می شود که با پژوهش حاضر همسو می باشد (۱۷). پروبیوتیک ها علاوه بر تاثیرگذاری بر سوخت و ساز لیپیدها وGLUT4، احتمالا با افزایش سطح گلوتاتیون احیا، مهار رادیکال های آزاد و فعال سازی مسیر سیگنالینگ بقا PI3K/AKT استرس اکسیداتیو و آپوپتوز را کاهش می دهند (۳۴). همچنین به نظر می رسد پروبیوتیک ها با افزایش بیان Bcl-2 باعث کاهش نسبت Bax/Bcl-2 می شوند و از این طریق از رهایش سیتوکروم c و فعال سازی کاسپاز-۳ جلوگیری می کنند (۱۷).

در پژوهشی دیگرSiu و همکاران (۲۰۰۴) دریافتند که ۸ هفته تمرین هوازی منجر به کاهش آسیب DNA، افزایش پروتئین HSP70، افزایش پروتئین Bcl-2 و کاهش پروتئین Bax در عضله قلب رت های دیابتی می شود (۳۵). از سوی دیگر Tanoorsaz و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که ۴ هفته تمرین هوازی باعث بهبود متابولیسم گلوکز و حساسیت به انسولین میشود ولی تغییری در سطوح Bcl-2 کاردیومیوسیت های رت های دیابتی به وجود نمی آورد که این ناهمسویی ممکن است به دلیل متفاوت بودن پروتکل تمرینی، شدت تمرین، نوع نمونه و بافت اندازه گیری شده باشد (۱۴). به نظر می رسد تمرین استقامتی با مهار رادیکال های هیدروکسیل و سوپراکسید و جلوگیری از رهایش سیتوکروم c در کاهش آپوپتوز نقش دارد (۲۱). همچنین پروتئین کیناز B، از طریق فسفوریلاسیون Bcl-2 و غیرفعال سازی Bax و یا از طریق مهار مستقیم فعالیت کاسپازها باعث مسدود کردن مسیرهای آپوپتوز می گردد و به نظر می رسد تمرینات ورزشی با افزایش به کارگیری ATP و فعال سازی پروتئین کینازها موجب تقویت دفاع آنتی اکسیدانی و کاهش آپوپتوز می گردند (۳۶). علاوه بر این، به نظر می رسد تمرینات استقامتی با کاهش بیان پروتئین Bax، افزایش

بیان پروتئین Bcl-2 باعث کاهش نسبت Bax/Bcl-2 میشوند و می توانند آپوپتوز ناشی از میتوکندری را مهار کنند (۳۵). به طور کلی فرآیند تغییرات ژن Bax بطور واضحی مشخص نیست اما نشان داده شده است که افزایش بیان ژن Bcl-2 یکی از مکانیسم های اصلی سرکوب ژن Bax است (۳۳). افزایش بیان ژن Bcl-2 با تداخل در الیگومریزاسیون Bax، موجب تحکیم دیواره میتوکندری، جلوگیری از رهایش سیتوکروم c و تنظیم رهایش کلسیم از شبکه آندوپلاسمی می شود و در نتیجه از آپوپتوز جلوگیری می کند (۶). با توجه به موارد ذکر شده یکی از اثرات مشترک تمرینات استقامتی و مکمل پروبیوتیک بر افزایش هم افزای بیان ژن Bcl-2 در گروه STD، ممکن است ناشی از مهار رادیکال های هیدروکسیل و سوپراکسید در اثر خاصیت آنتی اکسیدانی این دو عامل باشد (۳۷). با وجود تاثیر جداگانه تمرین استقامتی و مکمل پروبیوتیک بر کاهش بیان ژن Bax در گروه های پژوهش این دو عامل به صورت هم افزا باعث کاهش بیان این ژن در گروه STD نشده اند، و ممکن است با تغییر دوز و سویه پروبیوتیک مصرفی و یا تغییر در پروتکل تمرینی نتیجه موثرتری به دست آید.

از محدودیت های پژوهش حاضر عدم اندازه گیری دیگر عوامل موثر در مسیر آپوپتوز مانند کاسپاز-۳ و میزان رهایش سیتوکروم C بوده است که در صورت اندازه گیری این متغیرها نتایج کامل تری به دست می آمد. همچنین با توجه به اینکه میزان گلوکز پلاسما رت ها بسیار بالا بود، به نظر می رسد استفاده از مقادیر پایین انسولین برای کاهش میزان مرگ و میر می تواند تاثیرگذار باشد تا دوره تمرینی در مدت طولانی تری انجام گیرد.

نتیجه گیری

بر اساس یافته های پژوهش حاضر، به نظر می رسد که تمرین استقامتی به همراه مکمل یاری پروبیوتیک در کاهش گلوکز پلاسما، کاهش بیان ژن Bax و افزایش بیان ژن Bcl-2 موثر است. به ویژه که این دو عامل به صورت هم افزا باعث کاهش گلوکز پلاسما و افزایش بیان ژن Bcl-2 شده اند و می توانند به عنوان یک روش مداخله ای موثر برای کاهش آپوپتوز در نمونه های دیابتی مورد توجه قرار گیرند.

تقدیر و تشکر

پژوهش حاضر بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی ورزشی می باشد، بدین وسیله از گروه آناتومی و آزمایشگاه سلولی و ملکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران و تمام عزیزانی که در انجام این پژوهش ما را یاری رساندند تشکر و قدردانی می نماییم.

تعارض منافع

تعارض منافع وجود ندارد.

منابع

1. Bellou V, Belbasis L, Tzoulaki I, Evangelou E. Risk factors for type 2 diabetes mellitus: an exposure-wide umbrella review of meta-analyses. PloS One 2018;13(3):e0194127.
2. Bugger H, Abel ED. Rodent models of diabetic cardiomyopathy. Disease Models & Mechanisms 2009;2(9-10):454-466.
3. Jia G, Whaley-Connell A, Sowers JR. Diabetic cardiomyopathy: a hyperglycaemia-and insulin-resistance-induced heart disease. Diabetologia 2018;61(1):21-28.
4. Tan Y, Zhang Z, Zheng C, Wintergerst KA, Keller BB, Cai L. Mechanisms of diabetic cardiomyopathy and potential therapeutic strategies: preclinical and clinical evidence. Nature Reviews Cardiology 2020;17(9):585-607.

5. Sadek NB, Gamal SM, Aboulhoda BE, Rashed LA, Shawky HM, Gamal El-Din MM. The Potential Role of Undercarboxylated Osteocalcin Upregulation in Microvascular Insufficiency in a Rat Model of Diabetic Cardiomyopathy. Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics 2020;25(1):86-97.

6. Chen X, Li H, Wang K, Liang X, Wang W, Hu X, et al. Aerobic exercise ameliorates myocardial inflammation, fibrosis and apoptosis in high-fat-diet rats by inhibiting P2X7 purinergic receptors. Frontiers in physiology 2019;10(1):1286.

7. Krueger K, Alack K, Ringseis R, Mink L, Pfeifer E, Schinle M, et al. Apoptosis of T-cell subsets after acute high-intensity interval exercise. Medicine & Science in Sports & Exercise 2016;48(10):2021-9.

8. Nair P, Lu M, Petersen S, Ashkenazi A. Apoptosis initiation through the cell-extrinsic pathway. Methods in Enzymology 2014;544(1):99-128.

9. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. Nature reviews Molecular Cell Biology 2008;9(1):47-59.

10. Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. Molecular and Cellular Biochemistry 2011;351(1):41-58.

11. Marzetti E, Privitera G, Simili V, Wohlgemuth SE, Aulisa L, Pahor M, et al. Multiple pathways to the same end: mechanisms of myonuclear apoptosis in sarcopenia of aging. The Scientific World Journal 2010;10(1):340-9.

12. 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. International Journal of Cardiology 2013;167(2):478-85.

13. Wang HF, Lin PP, Chen CH, Yeh YL, Huang CC, Huang CY, et al. Effects of lactic acid bacteria on cardiac apoptosis are mediated by activation of the phosphatidylinositol-3 kinase/AKT survival-signalling pathway in rats fed a high-fat diet. International Journal of Molecular Medicine 2015;35(2):460-70.

14. Tanoorsaz S, Behpour N, Tadibi V. Investigating the Effect of mid-term of aerobic exercise on apoptosis biomarkers in the cardiomyocytes of streptozotocin-induced diabetic rats. Journal of Fasa University of Medical Sciences 2018;7(4):488-97.

15. Samah S, Ramasamy K, Lim SM, Neoh CF. Probiotics for the management of type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. Diabetes Research and Clinical Practice 2016;118(1):172-82.

16. Zhang Q, Wu Y, Fei X. Effect of probiotics on glucose metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis of randomized controlled trials. Medicina 2016;52(1):28-34.

17. Wu Y, Wang B, Zeng Z, Liu R, Tang L, Gong L, et al. Effects of probiotics Lactobacillus plantarum 16 and Paenibacillus polymyxa 10 on intestinal barrier function, antioxidative capacity, apoptosis, immune response, and biochemical parameters in

broilers. Poultry Science 2019;98(10):5028-39.

18. Kemps H, Kränkel N, Dörr M, Moholdt T, Wilhelm M, Paneni F, et al. Exercise training for patients with type 2 diabetes and cardiovascular disease: what to pursue and how to do it. A position paper of the European Association of Preventive Cardiology (EAPC). European Journal of Preventive Cardiology 2019;26(7):709-27.

19. Cassidy S, Thoma C, Hallsworth K, Parikh J, Hollingsworth KG, Taylor R, et al. High intensity intermittent exercise improves cardiac structure and function and reduces liver fat in patients with type 2 diabetes: a randomised controlled trial. Diabetologia 2016;59(1):56-66.

20. Poblete Aro CE, Russell Guzmán JA, Soto Muñoz ME, Villegas González BE. Effects of high intensity interval training versus moderate intensity continuous training on the reduction of oxidative stress in type 2 diabetic adult patients: CAT. Medwave 2015;15(7):99-27

21. Chengji W, Xianjin F. Exercise protects against diabetic cardiomyopathy by the inhibition of the endoplasmic reticulum stress pathway in rats. Journal of Cellular Physiology 2019;234(2):1682-8.

22. 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. Archives of Physiology and Biochemistry 2020;126(3):250-7.

23. Sánchez Macarro M, Ávila-Gandía V, Pérez-Piñero S, Cánovas F, García-Muñoz AM, Abellán-Ruiz MSS, et al. Antioxidant Effect of a Probiotic Product on a Model of Oxidative Stress Induced by High-Intensity and Duration Physical Exercise. Antioxidants 2021;10(2):323-145.

24. No M-H, Heo J-W, Yoo S-Z, Kim C-J, Park D-H, Kang J-H, et al. Effects of aging and exercise training on mitochondrial function and apoptosis in the rat heart. Pflügers Archiv-European Journal of Physiology 2020;472(2):179-93.

25. Dang F, Jiang Y, Pan R, Zhou Y, Wu S, Wang R, et al. Administration of Lactobacillus paracasei ameliorates type 2 diabetes in mice. Food & Function 2018;9(7):3630-9.

26. Lumini-Oliveira J, Magalhães J, Pereira CV, Moreira AC, Oliveira PJ, Ascensão A. Endurance training reverts heart mitochondrial dysfunction, permeability transition and apoptotic signaling in long-term severe hyperglycemia. Mitochondrion 2011;11(1):54-63.

27. Hu Y-m, Zhou F, Yuan Y, Xu Y-c. Effects of probiotics supplement in patients with type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis of randomized trials. Medicina Clínica (English Edition). 2017;148(8):362-70.

28. Tonucci LB, dos Santos KMO, de Oliveira LL, Ribeiro SMR, Martino HSD. Clinical application of probiotics in type 2 diabetes mellitus: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. Clinical Nutrition 2017;36(1):85-92.

29. Banaeifar A, Ebrahimpor S, Tabatabaie H. The Effect of resistance training on GLUT4 expression in muscle tissue, glucose and insulin resistance in rats. Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences 2019;26(6):46-57.

30. Kim DY, Jung SY, Kim CJ, Sung YH, Kim JD. Treadmill exercise ameliorates apoptotic cell death in the retinas of diabetic rats. Molecular medicine reports. 2013;7(6):1745-50.

31. Chen P, Zhang Q, Dang H, Liu X, Tian F, Zhao J, et al. Antidiabetic effect of Lactobacillus casei CCFM0412 on mice with type 2 diabetes induced by a high-fat diet and streptozotocin. Nutrition 2014;30(9):1061-8.

32. Imanipour V, Shakeri N, Ebrahim K, Soheyli S. Response of Pancreatic AKT1 Gene Expression, Insulin and Glycemic Indices to the Aerobic Training Period in Type 2 Diabetes Wistar Rats. Iranian Journal of Diabetes and Obesity 2018;10(1):37-41.

33. Samadian Z, Azar J, Moshari S, Razi M, Tofighi A. Moderate-intensity Exercise Training in Sole and Simultaneous Forms with Insulin Ameliorates the Experimental Type 1 Diabetes-induced Intrinsic Apoptosis in Testicular Tissue. International Journal of Sports Medicine 2019;40(14):909-9.

34. Hegazy SK, El-Bedewy MM. Effect of probiotics on pro-inflammatory cytokines and NF-κB activation in ulcerative colitis. World Journal of Gastroenterology 2010;16(33):4145-98.

35. Siu PM, Bryner RW, Martyn JK, Alway SE. Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles. The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal 2004;18(10):1150-2.

36. Bækkerud FH, Salerno S, Ceriotti P, Morland C, Storm-Mathisen J, Bergersen LH, et al. High Intensity Interval Training Ameliorates Mitochondrial Dysfunction in the Left Ventricle of Mice with Type 2 Diabetes. Cardiovascular Toxicology 2019;19(5):422-31.

37. 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. Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes 2016;125(09):583-91.