The effect of endurance training and remote ischemic preconditioning on myocardial Beclin-1 gene expression in diabetic rats

Fazeleh Akbarnia[1], Amin Frzaneh Hesari[1*], Abdollah Hashemvarzi[1], AliAsghar Farsavian[2]

1. Department of Exercise Physiology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran
2. Department of Cardiology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

Corresponding author e-mail: af.hessari@gmail.com

Abstract

Background and Objective: Despite the protective effect of ischemic preconditioning (IPC) from tissues, its effect on diabetes-induced excessive autophagy is not clear. Autophagy could be inhibited or activated through exercise. The present study aimed to investigate the effect of endurance training and remote IPC on myocardial Beclin-1 gene expression in diabetic rats.

Materials and Method: In this experimental research, 35 Wistar rats were randomly divided into seven groups: normal control (C), diabetic (D), diabetic one leg ischemia (OI), diabetic two legs ischemia (TI), diabetic endurance training (E), diabetes one leg ischemia + endurance training (OIE), diabetes two legs ischemia+ endurance training (TIE). IPC was included three 5-minute cycles of ischemia, followed by five minutes of reperfusion. The endurance training groups performed exercise training for six weeks and five days a week and was included running on a treadmill. The speed for the first week is set at 9 meters per minute for 15 minutes. By the sixth week, the training speed was increased to 18 meters per minute for 30 minutes. Beclin-1 gene expression was measured by RT-PCR. Data were analyzed by one-way analysis of variance and Tukey post hoc tests.

Results: Beclin-1 gene expression significantly increased in D group compared to C group (p=0.0001). Becli-1 gene expression significantly decreased in OI (p=0.0001), TI (p=0.0001), E (p=0.0001), OIE (p=0.0001) and TIE (p=0.0001) compared to the D.

Conclusion: It seems that the effect of ischemia preconditioning in decreasing Beclin-1 is independent of the ischemia-affected muscle mass. Endurance training with IPC is more effective in decreasing Beclin-1 in diabetes than any of the exercise and IPC interventions alone.

Key words: Exercise training, Ischemic preconditioning, Autophagy, Beclin-1

Received: Oct 12, 2024 **Revised:** Nov 23, 2024 **Accepted:** Nov 30, 2024

How to cite this article: Akbarnia F, Frzaneh Hesari A, Hashemvarzi A, Farsavian AA. The effect of endurance training and remote ischemic preconditioning on myocardial Beclin-1 gene expression in diabetic rats. Daneshvar Medicine 2024; 32(5):34-43. doi: 10.22070/DANESHMED.2024.19721.1557

اثر تمرین هوازی و پیش شرطی سازی ایسکمی دور بر بیان ژن بکلین-۱ بافت قلب موشهای سفید آزمایشگاهی دیابتی

فاضله اکبرنیا جنید[۱]، امین فرزانه حصاری[۱*]، سید عبداله هاشم ورزی[۱] ، علی اصغر فرسویان[۲]

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده انسانی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران
۲. گروه قلب، مرکز تحقیقات قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

*نویسنده مسئول: امین فرزانه حصاری **Email: af.hessari@gmail.com**

چکیده

مقدمه و هدف: با وجود اثر محافظتی پیش شرطی‌سازی ایسکمی از بافتها، اثر آن بر اتوفاژی افزایش‌یافته ناشی از دیابت به روشنی مشخص نیست. اتوفاژی می‌تواند با فعالیت ورزشی مهار یا فعال شود. هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی اثر تمرین استقامتی و پیش شرطی‌سازی ایسکمی دور بر بیان ژن بکلین-۱ بافت قلب موش‌ها دیابتی بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، ۳۵ موش ویستار به‌صورت تصادفی به ۷ گروه: کنترل سالم، دیابتی، دیابتی ایسکمی یک پا، دیابتی ایسکمی دو پا، دیابتی تمرین استقامتی، دیابتی تمرین+ایسکمی یک پا، دیابتی تمرین+ایسکمی دو پا تقسیم شدند. پیش شرطی‌سازی ایسکمی شامل سه دور ۵ دقیقه‌ای ایسکمی و ۵ دقیقه رپرفیوژن متعاقب بود. تمرین استقامتی به مدت ٦ هفته و ۵ روز در هفته انجام شد و شامل دویدن روی تردمیل با سرعت ۹ متر در دقیقه و مدت ۱۵ دقیقه در هفته اول بود که در هفته ششم به سرعت ۱۸ متر در دقیقه و مدت ۳۰ دقیقه رسید. بیان ژن بکلین-۱ با روش real-time PCR اندازه‌گیری گردید. از روش آماری واریانس یکطرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد.

نتایج: بیان ژن بکلین-۱ افزایش معناداری در گروه دیابتی نسبت به گروه سالم داشت (P=۰/۰۰۰۱). در مقایسه با گروه دیابت، ایسکمی یک پا (P=۰/۰۰۰۱)، ایسکمی دو پا (P=۰/۰۰۰۱)، تمرین (P=۰/۰۰۰۱)، تمرین+ایسکمی یک پا (P=۰/۰۰۰۱) و تمرین+ایسکمی دو پا (P=۰/۰۰۰۱) منجر به کاهش معنی‌دار بیان بکلین-۱ بافت قلب شد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که اثر پیش شرطی‌سازی ایسکمی در کاهش بکلین-۱ مستقل از حجم عضلانی درگیر ایسکمی است. تمرین استقامتی به‌همراه پیش شرطی‌سازی ایسکمی اثر بیشتری در کاهش بکلین-۱ بافت قلب موشهای دیابتی نسبت به تمرین و ایسکمی تنها دارد.

واژه های کلیدی: تمرین، پیش شرطی سازی ایسکمی، اتوفاژی، بکلین-۱

وصول مقاله: ۱۴۰۳/۰۷/۲۱
اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۳/۰۹/۰۳
پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۱۰

مقدمه

دیابت با افزایش انفارکتوس قلبی و مشکلات فشار خون منجر به کاهش عملکرد عضلات قلب می‌شود که بصورت بالینی تحت عنوان کاردیومیوپاتی دیابتی شناخته می‌شود (۱). کاردیومیوپاتی یکی از مهمترین عوارض ناشی از دیابت است که با مجموعه‌ای از ناهنجاریهای ساختاری و عملکردی در قلب مانند هایپرتروفی کاردیومیوسیت، اتوفاژی، آپوپتوز و فیبروز قلبی شناخته می‌شود. مسیر اتوفاژی با تخریب سلولی فیزیولوژیک در هموستاز سلولی نقش مهمی دارد با این حال اثر آن در کاردیومیوپاتی به روشنی مشخص نیست (۲). اتوفاژی مکانیسمی برای کاهش پروتئینها و اندامک‌های آسیب‌دیده است و در حفظ تعادل انرژی و لقای سلول در پاسخ به شرایط استرس انرژی نقش مهمی دارد. در شرایط پاتولوژیکی از جمله دیابت، نظم اتوفاژی بهم می‌خورد و این اختلال اثر چشمگیری در کاردیومیوپاتی دیابتی دارد (۳). بکلین-۱ که جزء اصلی پروتئین‌های کلاس ۳ فسفواینوزیتید کیناز ۳ (PI3K III) است یک تنظیم کننده اتوفاژی است. نقش بکلین-۱ توسط شرایط و عوامل مختلفی کنترل می‌شود و عملکردش به تعامل با چند ژن مرتبط با اتوفاژی و سایر پروتئینها در طول فرایند اتوفاژی بستگی دارد (٤). در مرحله آغاز اتوفاژی، بکلین-۱ با تشکیل غشای ایزوله عمل و یک ساختار دو غشایی ایجاد و مواد سیتوپلاسمی را درگیر می‌کند تا اتوفاژوزوم تشکیل شود. در واقع، بکلین-۱ با دارا بودن یه حوزه ساختاری با شیکه‌ای از پروتئینهای دخیل در تنظیم اتوفاژی ارتباط برقرار می‌کند. احتمال دارد که کاهش سطح بکلین-۱ از اتوفاژی جلوگیری می‌کند که تولید گونه‌های فعال اکسیژن و استرس ژنوتوکسیک را به دنبال دارد (۵).

فعالیت ورزشی با ایجاد طیف وسیعی از سازگاریهای سلولی و متابولیکی که منجر به کاهش عوامل خطرزای قلبی، جلوگیری از تخریب میوکارد و افزایش عملکرد قلب می‌شود استراتژی مهمی در درمان و کنترل بیماری‌های قلبی و متابولیکی است (٦). استرس‌های فعالیت ورزشی ممکن است اتوفاژی را به عنوان یک پاسخ تطبیقی فعال کند. طی فعالیت ورزشی و به منظور محدود کردن آسیب بافتی و بازگرداندن یکپارچگی بافت، مسیرهای اتوفاژی فعال‌شده و موجب خاتمه دادن پاسخ‌های التهابی و ایجاد سیگنال‌های مستقیم برای سازگاری می‌شود (۷). گراماتی و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که اتوفاژی در پاسخ به فعالیت ورزشی حاد و مزمن رخ می‌دهد (۸). افزایش بیان ژن‌های اتوفاژی و همچنین القای پروتئین‌های اتوفاژی در پاسخ به فعالیت ورزشی در بافتهای مختلف، هم در انسان و هم در جوندگان مشاهده شده است (۹).

درطی سالهای اخیر، چشم‌اندازهای ویژه‌ای در خصوص اثر پیش شرطی‌سازی ایسکمی بر بیماری‌های قلبی عروقی و دیابت در حال تبیین است. پیش شرطی‌سازی ایسکمی[1] (IPC) شامل چرخه‌های کوتاه ایسکمی-رپرفیوژن در بافت (یا اندام) است که منجر به ایجاد اثرات محافظتی هم در بستر عروقی که به طور مستقیم در معرض محرک IPC قرار گرفته است و هم در بافتهای دورتر (پیش شرطی‌سازی ایسکمی دور[2]) می‌شود (۱۰)، که در این رابطه می‌توان به محافظت سلول‌های قلبی در برابر آسیب ناشی از سکته یا انفارکتوس قلبی در نتیجه اعمال IPC در پاها اشاره کرد (۱۱). همچنین، چرخه‌های تکراری ایسکمی برای یک تا هشت هفته منجر به بهبود عملکرد اندوتلیال عروقی قبل و بعد از آسیب‌های ایسکمی-رپرفیوژن (۱۲) و افزایش ذخیره جریان کرونری در بیماران نارسایی قلبی (۱۳) می‌شود. بهبود عملکرد اندوتلیال در بیماران دیابتی بعد از ۷ روز پیش شرطی‌سازی ایسکمی در مطالعه مکس‌ول و همکاران (۲۰۱۹) گزارش شد (١٤).

با وجود مطالعات انجام شده، مکانیسم‌های دقیق تاثیر دیابت بر شدت آسیب ایسکمی-رپرفیوژن میوکارد و اثربخشی مداخله‌های مختلف به خوبی روشن نیست.

1 Ischmic Preconditioning
2 Remote Ischemic Preconditioning

شواهد موجود نشان می‌دهد که اتوفاژی در وقوع آسیب ایسکمی-رپرفیوژن میوکارد نقش دارد (۱۵،۱۶) علاوه براین، بیان اتوفاژی به طور قابل توجهی در میوکارد دیابتی تغییر می‌کند و نقش‌های مختلفی در فرآیندهای آسیب ایسکمی-رپرفیوژن میوکارد بین شرایط طبیعی و دیابتی ایفا می‌کند (۱۷). از طرفی، گزارشات متناقضی در رابطه با اثر تمرین ورزشی بر فاکتورهای اتوفاژی از جمله بکلین-۱ وجود دارد. گزارش شده است که یک دوره تمرین تناوبی شدید منجر به کاهش بکلین-۱ شد (۱۸،۱۹). بعضی مطالعات عدم تغییر (۲۰) و بعضی مطالعات افزایش (۲۱) بکلین-۱ بعد از تمرین هوازی را نشان دادند.

از آنجا که دیابت نه تنها می‌تواند آسیب ایسکمی-رپرفیوژن میوکارد را تشدید کند، بلکه باعث تضعیف یا از بین بردن اثرات محافظتی IPC روی آن نیز می‌شود (۲۲)، پژوهشگران در مطالعه حاضر به دنبال بررسی این موضوع هستند که آیا اعمال پیش شرطی‌سازی ایسکمی پاسخ اتوفاژی بافت قلب به تمرین ورزشی را تغییر می‌دهد؟ از طرف دیگر، شواهد نشان داده‌اند که اثرات ارگوژنیک پیش شرطی‌سازی ایسکمی ممکن است به آستانه خاصی از متابولیتها از جمله برادی کینین، آدنوزین و اپوئیدها بستگی داشته باشد تا منجر به شروع آبشار بیوشیمیایی شود (۲۳). بر این اساس، محققان در مطالعه حاضر فرض کردند که اگر پیش شرطی‌سازی ایسکمی در اندامها با حجم عضلانی متفاوت اعمال شود ممکن است پاسخهای متابولیکی و بیوشیمیایی مختلف ایجاد کند. به عبارت دیگر، آیا اثرات محافظتی پیش شرطی‌سازی ایسکمی وابسته به دوز است؟ بنابراین، هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر شش هفته تمرین هوازی و پیش شرطی سازی ایسکمی در یک پا (حجم عضلانی کم) و دو پا (حجم عضلانی زیاد) در بیان ژن بکلین-۱ بافت قلب در موشهای سفید بزرگ آزمایشگاهی دیابتی بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی بر روی ۳۵ سر موش نر نژاد ویستار با سن ۸ هفته در مرکز پرورش و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی هیستوژنوتک تهران انجام شد. معیار ورود به مطالعه شامل وزن ۱۹۰ تا ۲۲۰ گرم و سطح گلوکز پلاسمای بالاتر از ۲۵۰ میلی گرم در دسی لیتر در گروه دیابت بوده و معیارهای خروج از مطالعه شامل مرگ در اواسط مطالعه و یا بیمار شدن حیوان و اجرا نکردن دو جلسه پیاپی تمرین هر موش در گروه های تمرینی بود. موشهای مورد مطالعه به تعداد ۵ عدد در هر قفس از جنس پلی کربنات (۳۰×۱۵×۱۵ سانتیمتر) در یک شرایط آب و هوایی کنترل شده (دمای ۲۲±۲ سانتیگراد، رطوبت ۵۰±۵ درصد، یک سیکل شب و روز ۱۲:۱۲) و با رژیم غذایی استاندارد و آب مورد نیاز در شرایط آزمایشگاهی نگهداری شدند. موشها پس از آشنایی با پروتکل تمرینی به صورت تصادفی در ۷ گروه کنترل سالم، کنترل دیابت، دیابتی تمرین استقامتی، دیابتی ایسکمی یک پا، دیابتی ایسکمی دو پا، دیابتی ایسکمی یک پا+تمرین استقامتی و دیابتی ایسکمی دو پا+تمرین استقامتی قرار گرفتند. این مطالعه توسط کمیته‌ی اخلاق کار با حیوانات دانشکده‌ی علوم پزشکی دانشگاه آزاد ساری تأیید و کد اخلاق (IR.IAU.SARI.REC.1403.156) صادر گردید.

برای دیابتی نمودن موشها از روش استرپتوزوتوسین به صورت تک دوز استفاده شد. به این صورت که با تزریق تک دوز ml/kg ۵۰ استرپتوزوسین به صورت داخل صفاقی القای دیابت صورت گرفت و قند بالای mg/dl ۲۵۰ در ۷۲ ساعت پس از تزریق، به عنوان دیابت القاشده در نظر گرفته شد (۱۸). یک هفته بعد از دیابتی کردن موشها و قبل از جلسه تمرینی، پیش شرطی‌سازی ایسکمی با بستن یک تورنیکت (با عرض ۸ میلیمتر) به بالای ران پاهای موشها و در سه دور پنج دقیقه‌ای ایسکمی با پنج دقیقه رپرفیوژن اعمال شد. حس‌گر نبض روی شریان دورسالیس پدیس (ادامه شریان تیبیال قدامی در سطح قدامی مچ پا جانب تاندون اکستنسور انگشت شست) قرار داده شد. انسداد جریان خون پاها با مشخص نبودن نبض، کاهش دما و سیانوز پوست در پاها تایید شد. پیش

شرطی‌سازی ایسکمی در هر جلسه تمرینی ۲۰ دقیقه قبل از فعالیت اعمال شد (۲٤).

پروتکل تمرین استقامتی به مدت شش هفته و پنج روز در هفته اجرا شد که شامل دویدن روی نوارگردان مخصوص بود و شدت تمرین بر اساس سرعت دویدن روی تردمیل کنترل شد. قبل از شروع تمرین استقامتی، موشها به منظور آشنایی با چگونگی فعالیت روی نوارگردان ۵ جلسه به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰-۸ متر بر دقیقه با شیب صفر فعالیت داشتند. بعد از آن تمرین با سرعت ۹ متر در دقیقه و شیب ۵ درجه به مدت ۱۵ دقیقه در هفته اول شروع شده و در طول پژوهش بطور تدریجی و با رعایت اصل اضافه بار در هفته آخر به ۱۸ متر در دقیقه و مدت ۳۰ دقیقه رسید. در هر جلسه ۵ دقیقه گرم گردن و سرد کردن با سرعت ۵ متر در دقیقه انجام شد (۲۵). شایان ذکر است که در گروه‌های ایسکمی یک پا+ تمرین و ایسکمی دو پا+تمرین، در هر جلسه پیش شرطی‌سازی ایسکمی ۲۰ دقیقه قبل از فعالیت استقامتی اعمال شد. برای این منظور ٤۵ دقیقه قبل از شروع فعالیت، اولین دور ایسکمی به مدت ۵ دقیقه اعمال و بعد از آن ۵ دقیقه رپرفیوژن لحاظ شد. دوره‌های ایسکمی-رپرفیوژن سه بار تکرار شد بطوریکه فعالیت استقامتی ۲۰ دقیقه بعد از آخرین دور ایسکمی شروع شد.

روش های آزمایشگاهی

٤۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، در شرایط استراحت و ناشتا موش‌ها با تزریق درون صفاقی ترکیبی از کتامین (۷۰ mg/kg) و زایلازین (۵-۳ mg/kg) بی‌هوش شدند. سپس، قلب موشها استخراج در ازت مایع قرار گرفت تا پس از هموژنیزاسیون برای سنجش بیان ژن بکلین-۱ استفاده شود. جهت سنجش بیان ژن بکلین -۱ از روش Real-TimePCR استفاده شد. ابتدا استخراج RNA صورت گرفت. در مرحله اول، به ازای ۱ میلی‌لیتر ترایزول اضافه شده ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به نمونه‌ها اضافه و ۱۵ ثانیه تکان داده تا مخلوط شوند (بدون ورتکس). میکروتیوبها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در RPM ۱۲۰۰۰ و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. فاز شفاف رویی حاوی RNA جدا شده و به میکروتیوب دیگری منتقل گردید و به آنها ایزوپروپانول اضافه شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰- انکوبه شدند. به منظور رسوب RNA، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در RPM ۱۲۰۰۰ و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. محلول و رسوبها با اتانول ۷۵٪ شستشو داده شدند. سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در RPM ۷۵۰۰ و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از نیمه خشک شدن رسوب، مقدار ۲۰ الی۳۰ میکرولیتر آب DEPC یا عاری از RNase به هر میکروتیوب اضافه شده تا رسوب RNA در آن حل شود. بعد از این مرحله سنتز cDNA انجام شد. نمونه‌های RNA از۷۰- درجه خارج و پس از آب شدن به روی یخ منتقل شدند. جهت تهیه میکسRT، برای ساخت cDNA شامل بافرRT، آنزیمRT، پرایمر Oligo dT و آب DEPC با یکدیگر مخلوط شده و سپس در حجم‌های µl ۹ در میکروتیوب های ۰/۲ میلی‌لیتری توزیع شدند. میکروتیوب‌های آماده شده حاوی RT mix و نمونه RNA در دستگاه ترموسایکلر یا Dry block heater برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه، ٦۰ دقیقه در دمای ٤۷ درجه و ۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه گذاشته شد. نمونه‌های cDNA آماده شده تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه نگهداری شدند. پس از پایان آزمایش، اعداد CT مربوط به ژن رفرنس و ژن مرجع هر نمونه با فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ بیان نسبی هر ژن محاسبه شد. جدول ۱ توالی پرایمرها را نشان می‌دهد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده

توالی پرایمرها	ژن ها
AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	GAPDH-f
TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	GAPDH-r
GAGGAATGGAGGGGTCTAAGG	r-Beclin-F
CCTCTTCCTCCTGGCTCTCTC	r-Beclin-R

تجزیه و تحلیل آماری

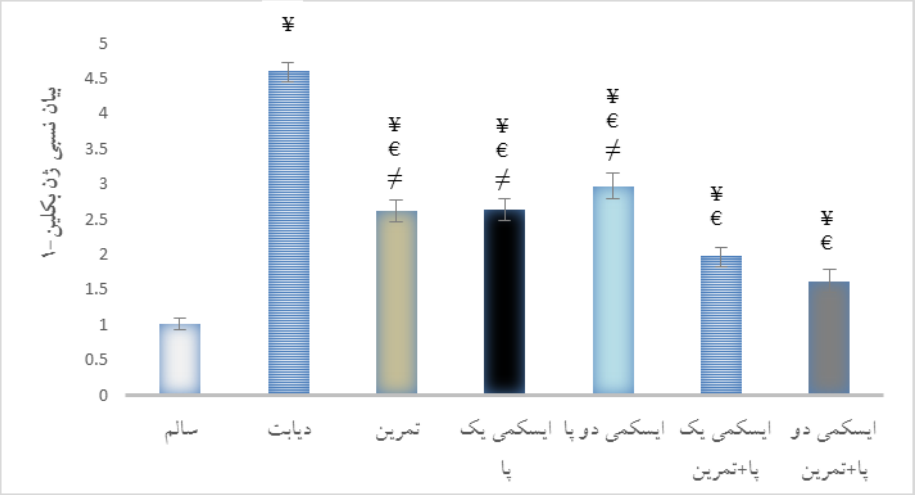
جهت بررسی طبیعی بودن توزیع داده ها از آزمون شاپیرو-ویلک وهمگنی واریانس گروه‌ها از آزمون لون استفاده شد. به منظور بررسی تفاوت‌ها از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. سطح معنی داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. تمامی عملیات آماری با نرم افزار SPSS نسخه ۲۳ انجام گرفت.

نتایج

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بیان ژن بکلین-۱ بافت قلب بین گروه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری دارد (P=۰/۰۰۰۱، F=۱۸۵/۱٤). نتایج افزایش بیان ژن بکلین-۱ بافت قلب در گروه دیابتی را نسبت به گروه سالم نشان داد (P=۰/۰۰۰۱). نتایج آزمون تعقیبی توکی نیز نشان داد در مقایسه با گروه دیابت، ایسکمی یک پا (P=۰/۰۰۰۱)، ایسکمی دو پا (P=۰/۰۰۰۱)، تمرین استقامتی (P=۰/۰۰۰۱)، تمرین استقامتی+ ایسکمی یک پا (P=۰/۰۰۰۱) و تمرین استقامتی+ ایسکمی دو پا (P=۰/۰۰۰۱) منجر به کاهش معنی‌دار بیان بکلین-۱ بافت قلب شد. بین تمرین استقامتی با ایسکمی یک پا (P=۰/٦۹۹) و ایسکمی دو پا (P=۰/۱۲۲) تفاوت معنیداری مشاهده نشد. بکلین-۱ در گروه تمرین+ایسکمی یک پا در مقایسه با ایسکمی یک پا (P=۰/۰۰۱)، ایسکمی دو پا (P=۰/۰۰۰۱) و تمرین استقامتی(P=۰/۰۰۱۱) و همچنین در گروه تمرین+ایسکمی دو پا در مقایسه با ایسکمی یک پا (P=۰/۰۰۰۱)، ایسکمی دو پا (P=۰/۰۰۰۱) و تمرین استقامتی(P=۰/۰۰۰۱) کاهش معنیداری داشت (جدول ۲) (نمودار ۱).

جدول ۲. مقادیر شاخصهای آماری ژن بکلین-۱ در گروه های تحقیق

آماره	سالم	دیابت	ایسکمی یک پا	ایسکمی دو پا	تمرین	تمرین+ایسکمی یک پا	تمرین +ایسکمی دو پا
میانگین و انحراف استاندارد	۱/۰۰۱ ±۰۸۳/۰	٤/٥٩٢ ±۱۳۳/۰	۲/٦۳۱ ±۱٤۹/۰	۲/۹٦۸ ±۱۷۹/۰	۲/٦۲۲ ±۱٥٥/۰	۱/۹٦ ±۱٤۰/۰	۱/٦۱۱ ±۱٦٤/۰
کمینه	۰/۹۳۰٥	٤/٤۳۸	۲/٤٦۲	۲/۷٥۷	۲/٤۳٥	۱/۷۸۹	۱/٤٥۹
بیشینه	۱/۰٤۷٥	٤/٦۸۸	۲/۷٥۳	۳/۱۲۱	۲/۷۳۹	۲/۰٤٦	۱/۷۸۷



نمودار ۱. مقایسه میانگین با استفاده از آزمون توکی برای بیان ژن نسبی بکلین-۱ گروه های تحقیق

¥: تغییرات معنادار نسبت به گروه کنترل. €: تغییرات معنادار نسبت به گروه دیابت، ≠: تفاوت معنیدار با تمرین+ایسکمی **سطح معناداری** P<۰/۰۵

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که دیابت با افزایش بیان ژن بکلین-۱ بافت قلب همراه است و تمرین هوازی و پیش شرطی‌سازی ایسکمی در یک و دو پا به تنهایی و در ترکیب با یکدیگر منجر به کاهش بیان ژن بکلین-۱ شد بطوریکه میزان کاهش بکلین-۱ در گروه‌های تمرین+ایسکمی از تمرین و ایسکمی تنها بیشتر بود. مشابه با نتایج مطالعه حاضر، مطالعات متعددی افزایش شاخصهای اتوفاژی را در بیماران دیابتی در مقایسه با گروه سالم نشان دادند (۱۹، ۱۸). در حمایت از این مفهوم نشان داده شده است که دیابت از طریق مهار مسیر پیام-رسانیPI3k-Akt (بعنوان مسیر بقاء سلولی) باعث افزایش در میزان اتوفاژی می‌گردد (۲٦).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تمرین هوازی منجر به کاهش بیان بکلین-۱ در موشهای دیابتی شد. مشابه با نتایج مطالعه حاضر، علیزاده پهلوانی و همکاران (۲۰۲۳) و حسین زاده و همکاران (۲۰۲۲) کاهش بکلین-۱ بافت قلب و زنگانه و همکاران (۲۰۲۱) کاهش بکلین-۱ عضله نعلی موشهای سفید بزرگ آزمایشگاهی دیابتی را بعد از یک دوره تمرین گزارش کردند. در مقابل، مرادی و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند که تمرین هوازی به همراه محدودیت غذایی منجر به افزایش بیان ژن بکلین-۱ شد (۲۸). مک میلان و همکاران (۲۰۱٦) عدم تغییر معنی‌دار بکلین-۱ در عضله قلب موشهای سفید بزرگ آزمایشگاهی (۲۹) و جوکار و همکاران (۲۰۱۹) عدم تغییر بکلین-۱ بافت قلب موشهای دیابتی را بعد از تمرین هوازی (۲۰) را گزارش کردند. از دلایل احتمالی تفاوت در نتایج مطالعات می‌تواند نمونه تحقیق، شدت و مدت تمرین، نوع بافت باشد. آزمودنیها در مطالعه مرادی و همکاران موشهای با نارسایی قلبی بودند ولی مطالعه حاضر روی موشهای دیابتی بررسی شد. علاوه براین، مدت زمان تمرین در مطالعه حاضر ٦ هفته بود ولی در مطالعه مرادی و همکاران ٤ هفته تمرین تجویز شد. همچنین، شدت و زمان تمرین انجام شده ممکن است در نتایج به‌دست آمده مؤثر باشد. در مطالعه مک کورمی و همکاران (۲۰۲۲) محتوای درون سلولی پروتئین بکلین-۲ به دنبال تمرین دوچرخه سواری با شدتهای مختلف روی انسان سالم بررسی شد و افزایش بکلین-۲ بعد از فعالیت ورزشی و کاهش بکلین در دوره ریکاوری گزارش شد (۳۰). در مطالعه دلشاد و همکاران (۲۰۲۱) افزایش بکلین-۲ بعد از هشت هفته تمرین تناوبی شدید در عضله اسکلتی موشهای سالمند نشان داده شد (۳۱).

تنظیم فرایند اتوفاژی از طریق تمرین ورزشی می‌تواند یک روش درمانی مفید باشد. شواهد نشان می‌دهد که اتوفاژی ناشی از تمرین استقامتی محیط سلولی مساعدی را فراهم می‌کند که سلولهای قلبی را در برابر استرس‌هایی مانند ایسکمی و صدمات قلبی محافظت می‌کند (۳۲). یکی از سازوکارهای احتمالی مسیر سیگنالینگ mTOR است که نقش مهمی در تنظیم اتوفاژی دارد. پروتئین mTOR دو کمپلکسmTORC1 و mTORC2 دارد که از طریق mTORC1 پروتئینهای FIP200 و ULK1، ATG13 را تنظیم و منجر به اتوفاژی شده و با تنظیم پروتئین FOXO3a از طریق mTORC2 منجر به مرگ سلولی می‌شود (۳۳).

نتایج مطالعه حاضر حاکی از این است که پیش شرطی‌سازی ایسکمی دور (در پا) بیان ژن بکلین-۱ بافت قلب را کاهش داد. مطالعات محدودی اثر پیش شرطی‌سازی ایسکمی بر اتوفاژی بافت قلب در دیابت را بررسی کردند. لیو و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که پیش شرطی‌سازی ایسکمی اندازه انفارکتوس، cTnI سرم و سطوح CK-MB را در میوکارد موشهای دیابتی کاهش داد. این نشان می‌دهد که با مهار اتوفاژی افزایش یافته، IPC ممکن است محافظت در برابر آسیب ایسکمی-رپرفیوژن میوکاردی در دیابت ایجاد کند (۳٤). با وجود مطالعات متعدد، نقش بالقوه آن در محافظت از قلب‌های دیابتی به روشنی مشخص نیست. مسیر کیناز نجات آسیب رپرفیوژن (RISK)[1] در مکانیسم پیش شرطی‌سازی ایسکمی دور دخیل است. این مسیر شامل دو آبشار اصلی کیناز است: کینازهای تنظیم شده با سیگنال خارج سلولی p42/p44 (ERK1/2) و کیناز B (AKT) (۳۵). نشان داده شده است که پیش شرطی‌سازی ایسکمی منجر به فسفوریلاسیون ERK1/2 یا AKT می‌شود که در نهایت اندازه انفارکتوس میوکارد را کاهش می‌دهد (۳۵). همچنین،

1 Reperfusion injury salvage kinase

افزایش سطح فسفویلاسیون AKT در مغز موش‌های صحرایی که مداخله پیش شرطی‌سازی ایسکمی دور را دریافت کردند در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد (۳۶). با این حال، نتایج مطالعات موجود در مورد اینکه آیا AKT می‌تواند در میوکارد دیابتی فعال شود متناقض است. اگر چه برخی از مطالعات نشان داده است که عدم محافظت قلبی پیش شرطی‌سازی ایسکمی در دیابت را به کاهش فعال شدن مولکول های سیگنالینگ AKT نسبت داده‌اند، گزارش‌های دیگری حاکی از آن است سطح فسفوریلاسیون AKT در قلب دیابتی در مقایسه با گروه کنترل غیر دیابتی افزایش یافت (۳۷). GSK-3β، جزء حیاتی مسیر RISK، یک تنظیم کننده ضروری برای بقای میوسیت های قلبی، ممکن است در پاتوژنز آسیب میوکارد نقش داشته باشد. مطالعات قبلی نشان دادند که پیش شرطی‌سازی ایسکمی می‌تواند فسفوریلاسیون GSK-3β را تحریک کند (۳۸). لیو و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند که پیش شرطی‌سازی ایسکمی دور باعث فسفوریلاسیون GSK-3β در قلب بعد از آسیب ایسکمی-رپرفیوژن می‌شود. در تایید این موضوع، افزایش فسفوریلاسیون GSK-3β بطنی در قلب دیابتی در مقایسه با بیماران غیر دیابتی با پیش شرطی‌سازی ایسکمی دور گزارش شد (۳۹).

مسیرهای افزایش فاکتور فعال کننده بازمانده (SAFE)[1] که شامل فعال شدن مبدل سیگنال و فعال کننده رونویسی ۳ (STAT3) و ۵ (STAT5) است در رپرفیوژن با پیش شرطی‌سازی ایسکمی دور در مدل‌های حیوانی مختلف افزایش یافت (۴۰). لیوا و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که سطح فسفوذیلاسیون STAT3 و STAT5 در موش های دریافت کننده پیش شرطی‌سازی ایسکمی دور افزایش یافت و تجویز مهارکننده STAT اثر محافظتی پیش شرطی‌سازی ایسکمی دور را در ریه ها از بین برد (۴۱). علاوه براین، پیشنهاد شده است که تعدادی از فاکتورهای گردش خون از جمله اریتروپویتین ممکن است نقش مهمی در این پدیده محافظتی داشته باشند. اریتروپویتین یکی از واسطه‌های مهم پیش شرطی‌سازی ایسکمی دور است که نشان داده شده است که اریتروپویتین می‌تواند اندازه انفارکتوس را محدود کند (۴۲)، پاسخ التهابی میوکارد ناشی از آسیب ایسکمی-رپرفیوژن را مهار کند و با افزایش فسفوریلاسیون سیگنال دهی GSK-3β، بقای کاردیومیوسیت‌ها را تقویت کند (۴۳). از محدودیت‌های مطالعه‌ی حاضر، روش تشخیص ایسکمی در اندام بود که بوسیله مشخص نبودن نبض، کاهش دما و سیانوز پوست در پاها تایید شد. به منظور اطمینان از انسداد جریان خون از روشهای دقیق‌تر مانند سونوگرافی یا عکس‌برداری استفاده شود.

نتیجه‌گیری

با توجه به یافته‌های تحقیق حاضر، به‌نظر می‌رسد دیابت با اتوفاژی افزایش یافته بافت قلب همراه است و تمرین استقامتی، پیش شرطی سازی ایسکمی در یک پا یا دو پا با کاهش بیان بکلین-۱ اتوفاژی ناشی از دیابت را مهار می‌کند. این نتایج ممکن است گامی در جهت کنترل و کاهش کاردیومیوپاتی دیابتی بردارد. با این وجود، شناخت و سازوکارهای عهده‌دار فرآیند اتوفاژی ناشی از دیابت نیازمند مطالعات بیشتر در این زمینه است.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از رساله دکتری در رشته فیزیولوژی ورزشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری و ثبت شده در کمیته اخلاق دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد ساری بود. نویسندگان از آزمایشگاه بافت و ژن پاسارگاد جهت همکاری صمیمانه شان تشکر و قدردانی می‌نمایند.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه توسط کمیته‌ی اخلاق کار با حیوانات دانشکده‌ی علوم پزشکی دانشگاه آزاد ساری تأیید و کد اخلاق (IR.IAU.SARI.REC.1403.156) صادر گردید.

تعارض و منافع

نویسندگان مقاله اعلام می دارند که هیچ گونه تضادی در منافع وجود ندارد.

1 Survivor Activating Factor Enhancement

منابع

1. Dewanjee S, Vallamkondu J, Kalra RS, John A , Reddy PH, Kandimalla R. Autophagy in the diabetic heart: A potential pharmacotherapeutic target in diabetic cardiomyopathy. Ageing Research Reviews 2021;68:101338.
2. Jia G, Whaley-Connell A, Sowers JR. Diabetic cardiomyopathy: a hyperglycaemia-and insulin-resistance-induced heart disease. Diabetologia 2018;61(1):21-28.
3. Quiles JM, Najor RH, Gonzalez E, Jeung M, Liang W, Burbach SM, et al. Deciphering functional roles and interplay between Beclin1 and Beclin2 in autophagosome formation and mitophagy. Science Signaling 2023;16(770):eabo4457.
4. Vega-Rubín-de-Celis S, Kinch L, Peña-Llopis S . Regulation of beclin 1-mediated autophagy by oncogenic tyrosine kinases. International Journal of Molecular Sciences 2020;21(23):9210.
5. Kaur S, Changotra H. The beclin 1 interactome: Modification and roles in the pathology of autophagy-related disorders. Biochimie 2020;175:34-49.
6. Halling JF, Pilegaard H. Autophagy-dependent beneficial effects of exercise. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine 2017;7(8):1-17.
7. Grumati P, Coletto L, Schiavinato A ,Castagnaro S, Bertaggia E, Sandri M, et al. Physical exercise stimulates autophagy in normal skeletal muscles but is detrimental for collagen VI-deficient muscles. Autophagy 2011;7(12):1415-23.
8. Medina DL, Di Paola S, Peluso I, Armani A, De Stefani D, Venditti R, et al. Lysosomal calcium signalling regulates autophagy through calcineurin and TFEB. Nature Cell Biology 2015;17(3):288-99.
9. Vainshtein A, Tryon LD, Pauly M, Hood DA .Role of PGC-1α during acute exercise-induced autophagy and mitophagy in skeletal muscle. American Journal of Physiology 2015;308(9):710-19.
10. O'Brien L, Jacobs I. Methodological variations contributing to heterogenous ergogenic responses to ischemic preconditioning. Frontiers in Physiology 2021;12:656980.
11. Lang JA, Kim J, Lang JA, Kim J. Remote ischaemic preconditioning-translating cardiovascular benefits to humans. Physiology 2022;600:3053-3067.
12. Jones H, Nyakayiru J, Bailey TG, Green DJ, Cable NT, Sprung VS, et al. Impact of eight weeks of repeated ischaemic preconditioning on brachial artery and cutaneous microcirculatory function in healthy males. European Journal of Preventive Cardiology 2015;22:1083-87.
13. Kono Y, Fukuda S, Hanatani A, Nakanishi K, Otsuka K, Taguchi H, et al. Remote ischemic conditioning improves coronary microcirculation in healthy subjects and patients with heart failure. Drug Design, Development and Therapy 2014;27;8:1175-81.
14. Maxwell JD, Carter HH, Hellsten Y, Miller GD, Sprung VS, Cuthbertson DJ, et al. Seven-day remote ischaemic preconditioning improves endothelial function in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomised pilot study. European Journal of Endocrinology 2019;181(6):659-669.
15. Huang Z, Han Z, Ye B, Dai Z, Shan P, Lu Z, et al. Berberine alleviates cardiac ischemia/reperfusion injury by inhibiting excessive autophagy in cardiomyocytes. European Journal of Pharmacology 2015;5(762):1-10.
16. Guo X, Jiang H, Yang J, Chen J, Yang J, Ding JW, et al. Spermine ameliorates ischemia/reperfusion injury in cardiomyocytes via regulation of autophagy. International Journal of Molecular Medicine 2016;38:885-93.
17. Zhou B, Lei S, Xue R, Leng Y, Xia Z, Xia ZY, et al. DJ-1 overexpression restores ischaemic post-conditioning-mediated cardioprotection in diabetic rats: Role of autophagy. Clinical Science 2017;131(11):61-78.
18. Hosseinzadeh M, Taheri A. The Effect of Endurance Training on Expression of Autophagy Genes (Beclin-1, ULK-1) in the Heart Tissue of Male Rats with Experimental Diabetes. Iranian Journal of Diabetes and Obesity 2022;14 (1):51-58.
19. Zanghaneh F, farzanegi P, asgharpour H. Effect of Exercise Training and Atorvastatin Supplementation on Beclin1, LC3-I and LC3-Π Expression in Old Diabetic Rats. Medical Laboratory Journal 2022;16(1):40-47.
20. Jokar M, Sherafati Moghadam M, Daryanoosh F. The Effect of an 8-Week Endurance Training Program on the Content of FOXO3a and Beclin-1 Proteins in Heart Muscle of Rats with Type 2 Diabetes. Qazvin University of Medical Sciences 2020;23(1):484-493.
21. Sun M, Huang C, Wang C, Zheng J, Zhang P ,Xu Y, et al. Ginsenoside Rg3 improves cardiac mitochondrial population quality: mimetic exercise training. Biochemical and Biophysical Research Communications 2013;441(1):169-174.
22. Charan K, Goyal A, Gupta JK, Yadav HN. Role of atrial natriuretic peptide in ischemic preconditioning-induced cardioprotection in the diabetic rat heart. Surgical Research 2016;201:272-8.
23. Leurcharusmee P, Sawaddiruk P, Punjasawadwong Y, Sugandhavesa N, Klunklin K, Tongprasert S, et al. Ischemic preconditioning upregulates Mitofusin2 and preserves muscle strength in tourniquet-induced ischemia/reperfusion. Orthopaedic Translation 2022;4(35):113-121.
24. Cheng Z, Li L, Mo X, Zhang L, Xie Y, Guo Q, Wang Y. Non-invasive remote limb ischemic postconditioning protects rats against focal cerebral ischemia by upregulating STAT3 and reducing apoptosis. International Journal of Molecular Medicine 2014;34(4):957-66.
25. Arabzadeh E, Samadian Z, Tofighi A. Alteration of follistatin-like 1, neuron-derived neurotrophic factor, and vascular endothelial growth factor in diabetic cardiac muscle after moderate-intensity aerobic exercise with insulin. Sport Sciences for Health 2020;16:491-499.
26. Li X, Hu X, Wang J, Xu W, Yi C, Ma R, Jiang H. Inhibition of autophagy via activation of PI3K/Akt/mTOR pathway contributes to the protection of hesperidin against myocardial ischemia/reperfusion injury. International Journal of Molecular Medicine 2018;42(4):1917-1924.
27. Alizadeh Palavani H, Yaghmaei M, Mirzaee Moghamir S, Salboukhi R. The Effect of High-Intensity Interval Training on the Amount of BECLIN1/2 Family Autophagy Proteins in the Left Ventricle of the Heart in Rats with Type 1 Diabetes. Iranian Journal of Diabetes and Metabolism 2023;23(4):236-244.
28. Moradi F, Imani A, Faghihi M. Effects of regular

exercise plus food restriction on left ventricular pathological remodeling in heart failure-induced rats. Bratislavske Lekarske Listy 2019;120(4):243-8.
29. McMillan EM, Paré MF, Baechler BL, Graham DA, Rush JWE, Quadrilatero J. Autophagic signaling and proteolytic enzyme activity in cardiac and skeletal muscle of spontaneously hypertensive rats following chronic aerobic exercise. PLoS One 2015;10(3):e0119382.
30. McCormick JJ, Côté MD, King KE, McManus MK, Goulet N, Dokladny K, et al. Autophagic response to exercise in peripheral blood mononuclear cells from young men is intensity-dependent and is altered by exposure to environmental heat. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 2022;323(4):467-82.
31. Delshad S, Yaghoubi A, Rezaeian N. The effect of high intensity interval training on skeletal muscle autophagy biomarkers in male elderly rats. Daneshvar Medicine 2021;28(6):37-48.
32. Lee Y, Kwon I, Jang Y, Song W, Cosio-Lima LM, Roltsch MH. Potential signaling pathways of acute endurance exercise-induced cardiac autophagy and mitophagy and its possible role in cardioprotection. Physiological Sciences 2017;67(6):639-54.
33. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. Cell 2012;149(2):274-93.
34. Liu YY, Sun C, Xue FS, Yang GZ, Li HX, Liu Q, Liao X. Effect of Autophagy Inhibition on the Protection of Ischemia Preconditioning against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Diabetic Rats. Chinese Medicine 2018;131(14):1702-1709.
35. Hu Z, Liu J, Zhou L, Tian X, Abbott GW. AKT and ERK1/2 activation via remote ischemic preconditioning prevents Kcne2-dependent sudden cardiac death. Physiological Reports 2019;7:e13957.
36. Yang G, Yang Y, Li Y. Hu Z. Remote liver ischaemic preconditioning protects rat brain against cerebral ischaemia-reperfusion injury by activation of an AKT-dependent pathway. Experimental Physiology 2020;105:852–863.
37. Das A, Salloum FN, Filippone SM, Durrant DE, Rokosh G, Bolli R, et al. Inhibition of mammalian target of rapamycin protects against reperfusion injury in diabetic heart through STAT3 signaling. Basic Research in Cardiology 2015;110:31.
38. Rose BA, Force T, Wang, Y. Mitogen-activated protein kinase signaling in the heart: Angels versus demons in a heart-breaking tale. Physiological Reviews 2010;90:1507-1546.
39. Liu X, Chen H, Yan Z, Du L, Huang D, Gao WD, Hu Z, et al. Remote liver ischemic preconditioning attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in streptozotocin-induced diabetic rats. Scientific Reports 2021;11(1):1903.
40. Kleinbongard P, Skyschally A, Gent S, Pesch M, Heusch G. STAT3 as a common signal of ischemic conditioning: A lessonon "rigor and reproducibility" in preclinical studies on cardioprotection. Basic Research in Cardiology 2018;113(3):26-42.
41. Luo N, Liu J, Chen Y, Li H, Hu Z, Abbott GW. Remote ischemic preconditioning STAT3-dependently ameliorates pulmonary ischemia/reperfusion injury. PloS ONE 2018;13: e0196186.
42. Nishihara M, Miura T, Miki T, Sakamoto J, Tanno M, Kobayashi H, et al. Erythropoietin affords additional cardioprotection to preconditioned hearts by enhanced phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 beta. Heart and Circulatory Physiology 2006;291:748-755.
43. Lipšic E, Schoemaker R, Meer P, Adriaan A. Dirk J, Wiek H. Protective Effects of Erythropoietin in Cardiac Ischemia: From Bench to Bedside. American College of Cardiology 2006;48(11):2161-67.