فیزیولوژی ورزشی شماره ۴۰، زمستان ۱۳۹۷. صص ۸۴-۶۹

بررسی تأثیر شش هفته تمرین استقامتی بر سطوح برخی پروتئین‌های شبکهٔ آندوپلاسمی بافت سیاتیک موش‌های صحرایی دیابتی

محمد حامدی‌فر[۱]، رحیم میرنصوری[۲]، مسعود رحمتی[۳]

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه لرستان
۲. استادیار فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه لرستان*
۳. دانشیار فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه لرستان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۲/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۵/۱۶

چکیده

هدف این پژوهش، بررسی تأثیر تمرین استقامتی بر میزان پروتئین‌های XBP-1 و ATF6 در بافت سیاتیک موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار دیابتی بود. پژوهش ازنوع تجربی با طرح پس‌آزمون به‌همراه گروه کنترل بود و به شیوهٔ آزمایشگاهی انجام گرفت. در این پژوهش، ۳۲ سر رت ۱۰ هفته‌ای با میانگین وزن ۱۰/۱۶ ± ۲۵۳ گرم در چهار گروه سالم کنترل، سالم تمرین، دیابت کنترل و دیابت تمرین به‌صورت تصادفی تقسیم شدند. برای القای دیابت پس از ۱۲ ساعت ناشتایی، از روش تزریق درون‌صفاقی محلول STZ (۴۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) استفاده شد. ۴۸ ساعت پس از تزریق، پروتکل تمرین استقامتی با شدت متوسط به‌مدت شش هفته اجرا شد. ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسهٔ تمرینی، رت‌ها تشریح شدند و عصب سیاتیک آن‌ها استخراج شد. میزان پروتئین‌های XBP-1 و ATF6 به روش الایزا اندازه‌گیری شد. برای تجزیه‌وتحلیل آماری از نرم‌افزار اس.پی.اس.اس. و از آزمون آماری تحلیل واریانس دوطرفه با اندازه‌گیری تکراری و تی مستقل برای آزمون تعقیبی استفاده شد. تحلیل داده‌ها نشان داد که تمرین استقامتی باعث کاهش معنادار میزان پروتئین‌های XBP-1 (P=0.007) و ATF6 (P=0.001) در گروه دیابت تمرین‌کرده نسبت به گروه دیابت کنترل می‌شود. این یافته‌ها نشان می‌دهد که میزان پروتئین‌های XBP-1 و ATF6 که احتمالاً از عوامل مؤثر بر دیابت و تخریب عصب هستند، دراثر تمرین استقامتی در رت‌های سالم و دیابتی کاهش یافته‌اند که می‌تواند به روند جلوگیری از تخریب عصب کمک کند.

واژگان کلیدی: شبکهٔ اندوپلاسمی، دیابت، عصب سیاتیک، فعالیت استقامتی، XBP-1 و ATF6

* نویسندهٔ مسئول E-mail: dr_mirnasuri@yahoo.com

مقدمه

در بروز دیابت، شبکهٔ پیچیده‌ای از عوامل خطرزای محیطی و ژنتیکی نقش دارند و چنانچه بدون درمان رها شوند، موجب ایجاد عوارض متعددی ازجمله تخریب عصب می‌شوند (۱). شبکهٔ آندوپلاسمی (ER[1]) یک ارگانل درون‌سلولی است که مرکز بلوغ و تاخوردگی پروتئین است. همچنین، نقش بسیار مهمی در هومئوستاز کلسیم و حیات سلول عصبی دارد (۲). مشاهده شده است استرس‌هایی که هومئوستاز شبکهٔ آندوپلاسمی را تغییر می‌دهند، باعث اختلال در تاخوردن پروتئین‌ها می‌شوند و به تجمع پروتئین‌های تانخورده (UPR[2]) و پروتئین‌هایی که به‌صورت صحیح تا نخورده‌اند، منجر می‌شوند. این عمل می‌تواند به آسیب سلول‌های عضلانی و عصبی به‌ویژه سلول‌های عصبی و محیطی منجر شود (۳). شواهد فزاینده‌ای ارائه شده‌اند که بر نقش استرس شبکهٔ آندوپلاسمی در پاتوژنز دیابت دلالت می‌کنند و احتمالاً مسیرهای پیام‌رسانی اولیه ناشی از استرس شبکهٔ اندوپلاسمی و تولید گونه‌های اکسیژن واکنشی (ROS[3]) هستند (۴). همچنین، نشان داده شده است که استرس شبکهٔ اندوپلاسمی با تغییرات سیستم ایمنی و اختلالات متابولیکی در ارتباط است که نقش مهمی در دیابت نوع دو و عوارض ناشی از آن ایفا می‌کند (۳). پروتئین‌های XBP-1[4] و ATF6[5] مارکرهای مهمی برای استرس شبکهٔ آندوپلاسمی به‌شمار می‌روند (۴). پاسخ سازشی شبکهٔ آندوپلاسمی به استرس شبکهٔ آندوپلاسمی برای همسان‌کردن ظرفیت عملکردی شبکهٔ آندوپلاسمی با نیاز سلولی و بهبود این اختلالات ناشی از استرس ER است (۵). پروتئین XBP-1 که در ادامهٔ سیگنالینگ پروتئین ترانس غشایی IRE1α[6] است، از اعضای پروتئین‌های ترانس غشا است که به‌عنوان عضو اصلی تنظیم پایه‌ای خانوادهٔ پروتئین زیپ‌شدهٔ لوسین (bZIP[7]) می‌باشد (۶). این خانواده شامل فاکتورهای رونویسی درگیر در شبکهٔ اندوپلاسمی است که تأثیرات وسیعی بر عملکرد فیزیولوژیک و پاتولوژیک دارند (۷). زمانی‌که در شبکهٔ اندوپلاسمیک استرس ایجاد می‌شود، IRE1α به‌وسیلهٔ فسفردارشدن خودبه‌خودی فعال می‌شود و به‌این‌صورت عمل می‌کند که به یک حسگر استرس تبدیل می‌شود و باعث فعال‌شدن مسیر پیام‌رسانی می‌شود (۸). پروتئین ATF6 یکی از پروتئین‌های نسخه‌برداری است که این فاکتور حاوی bZIP است و جزو پروتئین‌های غشا گذر نوع دو است که در شرایط طبیعی ازطریق تعامل با

1. Endoplasmic Reticulum
2. Unfolded Protein Response
3. Reactive Oxygen Species
4. X-box Binding Protein-1
5. Activating Transcription Factor 6
6. Inositol-Requiring Protein 1α
7. Basic Leucine Zipper

GRP78/BIP[1] و کالرتیکولین[2] در ER نگه داشته می‌شود. به‌دنبال استرس ER، ATF6 به اجسام گلژی منتقل می‌شود. در آنجا توسط پروتئازهای سیتوزولی به هسته می‌رود و یک‌سری از ژن های هدف UPR را القا می‌کند (۹، ۶). افزون‌براین، پژوهش‌های جدید نشان می‌دهند که استرس شبکهٔ اندوپلاسمی با تغییرات سیستم ایمنی و اختلالات متابولیکی در ارتباط است. همچنین، نشان داده شده است که شبکهٔ اندوپلاسمی بیش از آنچه تصور می‌شود، در دیابت نوع دو و عوارض ناشی از آن نقش دارد (۶). هنگامی‌که این بخش از سلول دچار اختلال (استرس) می‌شود، کنترل قند خون بیمار مشکل می‌شود و بیمار دیس‌لیپیدمیا، مقاومت به انسولین، استرس اکسیداتیو و التهاب را تجربه می‌کند (۱۰). این یافته‌ها ارتباط جالبی را بین دو فرایند مولکولی شناخته‌شده؛ یعنی التهاب و عملکرد نامناسب شبکهٔ اندوپلاسمی که در بیماری‌های متابولیک دخیل هستند، نشان می‌دهد و پیشنهاد می‌کند که هدف قراردادن این ارتباط می‌تواند به تکوین درمانی جدیدی منجر شود (۱۱). مشخص شده است که در زمان چاقی، شبکهٔ اندوپلاسمی نمی‌تواند آبشار پیام‌رسانی درون‌سلولی را که پاسخ UPR است، شروع کند و استرس شبکهٔ اندوپلاسمی را کاهش دهد. در مطالعه تغییرات متابولیسم ایمنی مرتبط با افزایش استرس شبکه اندوپلاسمی در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ نشان می‌دهد که التهاب وابسته به چاقی می‌تواند پاسخ UPR و درنتیجه، عملکرد شبکهٔ اندوپلاسمی را مختل کند (۱۲، ۹). نتایج پژوهش‌های گذشته نشان می‌دهد که نوعی ارتباط بین عملکرد نامناسب شبکهٔ آندوپلاسمی و دیابت وجود دارد. درواقع، نقص در عملکرد صحیح شبکهٔ آندوپلاسمی خطر ایجاد دیابت نوع دو را افزایش می‌دهد. همچنین، شواهد فزاینده‌ای ارائه شده‌اند که بر نقش شبکهٔ آندوپلاسمی دیابت نوع دو دلالت می‌کنند و مسیرهای پیام‌رسانی اولیهٔ درگیر در پاتوژنز دیابت، احتمالاً از استرس شبکهٔ آندوپلاسمی آغاز می‌شود. دراین‌راستا نشان داده شده است که انجام تمرین استقامتی موجب بهبود دیابت و اختلالات عصبی می‌شود. سازوکارهای درگیر در این فرایندها هنوز کاملاً روشن نیستند؛ اما از سازوکارهای مهم می‌توان به اثرهای ضدالتهابی و ضداکسایشی فعالیت بدنی اشاره کرد (۱۳). همچنین، در مطالعه‌ای به بررسی استرس شبکهٔ اندوپلاسمی در عضله پرداخته شد. آزمایش‌های سلولی نشان داد که فعالیت UPR در عضلهٔ اسکلتی دراثر دیابت بالا رفت؛ ولی دراثر چهار هفته تمرین استقامتی، میزان UPR کاهش یافت و سازگاری به‌وجودآمده به کاهش استرس شبکهٔ اندوپلاسمی منجر شد. همچنین، گزارش شده است که کنترل و هومئوستاز UPR نقش بسیار کلیدی در کاهش استرس به‌وجودآمده در شبکهٔ آندوپلاسمی ایفا می کند (۱۴). پژوهشگران به‌دنبال روش‌های

1. 78 kDa Glucose-Regulated Protein / Binding Immunoglobulin Protein
2. Calreticulin

جایگزینی برای پیشگیری یا روش‌های درمانی با عوارض کمتر در بیماران دیابتی هستند. سازگاری‌های عصبی ایجادشدهٔ ناشی از تمرینات ورزشی، برای پیشگیری و درمان بیماری دیابت و نوروپاتی ناشی از دیابت بسیار سودمند به‌نظر می‌رسند (۱۵). یافته‌های حاصل از پژوهش‌های گستردهٔ علمی نشان می‌دهند که تمرینات ورزشی اثرهای سودمندی بر عملکرد شناختی و سلامتی سیستم عصبی پستانداران دارند (۱۶). همچنین، مشخص شده است که تمرینات ورزشی دارای اثرهای محافظتی بر نورون‌ها درمقابل مرگ فیزیولوژیک و پاتولوژیک هستند. فعالیت ورزشی به‌عنوان یک مداخلهٔ غیردارویی نقش مهمی در بهبود، رشد و عملکرد شبکهٔ نورونی دارد (۱۵). درحال‌حاضر، شواهد قابل‌توجهی وجود دارند که نشان می‌دهند تمرین ورزشی با شدت کم، عامل مهمی دربرابر بیماری‌های تخریب عصبی است و عملکرد حرکتی را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد (۱۰). با توجه به نتایج این پژوهش‌ها می‌توان گفت که بیان بیش از اندازهٔ پروتئین‌های XBP-1 و ATF6 ممکن است باعث برهم‌خوردن هومئوستاز ER و درنتیجه، پیشرفت در بیماری‌های دیابت و تخریب عصبی ناشی از دیابت شود. با توجه به اثرهای بیماری دیابت نوع دو، مطالعهٔ حاضر سعی دارد از تمرین استقامتی به‌عنوان یک راهبرد غیردارویی در موش‌های دیابتی استفاده کند؛ ازاین‌رو، در این پژوهش به‌دنبال پاسخ برای این سؤال هستیم که آیا تمرینات استقامتی به‌عنوان یک روش غیردارویی، بر سطوح پروتئین‌های XBP-1 و ATF6 بافت سیاتیک در موش‌های صحرایی نر ویستار دارای دیابت، تأثیر دارند؟

روش پژوهش

پژوهش حاضر ازنوع تجربی با طرح پس‌آزمون به‌همراه گروه کنترل بود و به شیوهٔ آزمایشگاهی انجام گرفت. در این پژوهش، ۳۲ سر رت نر ویستار ۱۰ هفته‌ای با میانگین وزنی ۱۱/۲ ± ۲۳۵ گرم به‌عنوان نمونهٔ پژوهش از مرکز نگهداری حیوانات دانشگاه علوم پزشکی لرستان خریداری شدند. قبل از شروع فرایند پژوهش، مجوز کار با حیوانات از کمیتهٔ اخلاقی دانشگاه لرستان با کد اخلاق به شمارهٔ LU.ECRA.2017.8 و دستورالعمل‌های سازمان بین‌المللی مطالعهٔ درد[1] (IASP) انجام شد. همهٔ حیوان‌ها در شرایط کنترل‌شدهٔ محیطی با میانگین دمایی ۲ ± ۲۲ درجهٔ سانتی‌گراد، چرخهٔ روشنایی-تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت و با دسترسی آزاد به آب و غذای ویژهٔ رت نگهداری شدند. آزمودنی‌ها پس از دو هفته آشنایی با محیط آزمایشگاه و رسیدن به میانگین وزنی ۳ ± ۳۳۰/۷، به‌طور تصادفی به چهار گروه هشت‌تایی دیابت تمرین‌کرده، دیابت کنترل، سالم تمرین‌کرده و گروه سالم کنترل تقسیم شدند.

1. International Association for the Study of Pain

درمدت مرحلهٔ آشناسازی و سازگارشدن با شرایط آزمایشگاه، نوار گردان و دستکاری، حیوانات پنج روز در هفته به‌مدت ۱۵-۱۰ دقیقه و با سرعت پنج تا ۱۰ متر در دقیقه روی نوارگردان راه رفتند.

نحوهٔ القای دیابت توسط استرپتوزوتوسین[1] (STZ): پس از ۱۲ ساعت محرومیت از غذا، با تزریق درون‌صفاقی محلول (STZ Sigma, St. Louis, MO؛ ۵۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم حل‌شده در بافر سیترات تازه ۰/۵ مول/ لیتر، ۴/۵ :PH) دیابت القا شد (۱۶). به حیوان‌های غیردیابتی نیز معادل حجمی بافر سیترات تزریق شد. ۴۸ ساعت پس از تزریق، با ایجاد یک جراحت کوچک توسط لانست روی ورید دم رت‌ها، یک قطره خون روی نوار گلوکومتری قرار داده شد و نوار توسط دستگاه گلوکومتر[2] (شرکت روشه آلمان) خوانده شد و رت‌هایی که قند خون آن‌ها بالاتر از ۳۰۰ میلی‌گرم/ دسی‌لیتر بود، به‌عنوان حیوان‌های دیابتی وارد مطالعهٔ حاضر شدند (۱۷). لازم است ذکر شود که در پژوهش حاضر چون احتمال ازبین‌رفتن رت‌ها یا دیابتی‌نشدن آن‌ها می‌رفت، تعداد ۲۰ سر رت با روش تزریق STZ دیابتی شدند که دراین‌بین چهار سر رت پس از تزریق ازبین رفتند؛ ولی قند خون ۱۶ رت باقی‌مانده به سطح موردنظر (بالاتر از ۳۰۰ میلی‌گرم/ دسی‌لیتر) که نشان‌دهندهٔ دیابتی‌شدن آن‌ها بود، دست یافت. در پژوهش حاضر، پس از تزریق STZ، هیچ‌گونه علائم ناشی از تزریق اشتباه نظیر تورم شکم و مشکلات گوارشی در حیوان‌ها مشاهده نشد و دو هفته پس از القای دیابت، پروتکل تمرین استقامتی به‌مدت شش هفته انجام شد و تمام جلسات تمرینی در پایان سیکل خواب حیوان‌ها و بین ساعت‌های ۱۶ تا ۱۸ عصر برگزار شد (۱۸). در پژوهش حاضر، از شدت تمرینی متوسط (۵۵-۵۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه) و درعین‌حال کارآمد ازلحاظ فیزیولوژیک، استفاده شد (۱۸)؛ بدین‌صورت‌که گروه‌های ورزشی به‌مدت شش هفته با شدت متوسط برای پنج روز در هفته و با تواتر سه روز تمرین و یک روز استراحت، روی نوار گردان تمرین کردند. سرعت و مدت تمرین نوار گردان به‌تدریج افزایش یافت که برنامهٔ آن در جدول شمارهٔ یک نمایش داده شده است. برای رسیدن سازگاری‌های به‌دست‌آمده به حالت یکنواخت، تمامی متغیرهای تمرینی در هفتهٔ پایانی ثابت نگه داشته شدند (۱۸). همچنین، هیچ‌گونه شوک تمرینی درطول برنامهٔ تمرین استقامتی استفاده نشد و درصورت لزوم، با استفاده از دست یا ایجاد محرک صوتی روی درپوش ریل‌های نوارگردان، حیوانات وادار به ادامهٔ تمرین شدند.

1. Streptozotocin
2. Glucotrend

جدول ۱- نمایش عددی پروتکل در هفته‌های مختلف

	هفتهٔ اول	هفتهٔ دوم	هفتهٔ سوم	هفتهٔ چهارم	هفتهٔ پنجم	هفتهٔ ششم
مدت تمرین (دقیقه)	۱۰	۲۰	۲۰	۳۰	۳۰	۳۰
سرعت نوار گردان (متر در دقیقه)	۱۰	۱۰	۱۵	۱۵	۱۸	۱۸

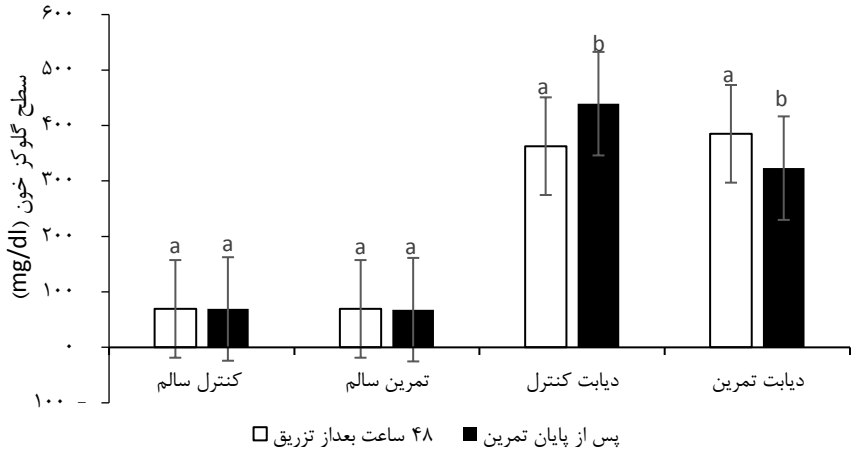
تشریح و استخراج بافت سیاتیک، ۲۴ ساعت بعد از اتمام پروتکل تمرین استقامتی انجام گرفت. برای این کار، حیوان‌ها با تزریق درون‌صفاقی ترکیبی از کتامین (۴۰ میلی‌گرم / کیلوگرم) و گزانتین (هشت میلی‌گرم / کیلوگرم) بی‌هوش شدند و بافت سیاتیک حیوان‌ها با جراحی ناحیهٔ خلفی خارجی ران عصب سیاتیک از خار ایسکیال تا محل دو شاخه‌شدن عصب سیاتیک به‌صورت عرضی برید شد و جدا گردید. سپس، بافت‌ها تا زمان آنالیز در منفی ۷۰ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. برای انجام آزمایش‌های مولکولی با هدف سنجش میزان بیان پروتئین‌های XBP-1 و ATF6، از هر گروه به روش الایزا[1] سنجیده شد. هنگامی‌که مولکول هدف داخل سرم در داخل چاهک‌ها ریخته می‌شود، به مونوکلونال آنتی‌بادیهای اختصاصی خود که از قبل به کف چاهک متصل شده بودند، از جایگاه اختصاصی خود متصل می‌شود. در مرحلهٔ بعد، توسط آنتی‌بادی‌های ثانویه (که بوسیله بیوتین و استرپتواویدین کونژگه[2] با آنزیم HRP[3] یک کمپلکس تشکیل می‌دهند)، اضافه‌های کونژوگه متصل‌نشده به‌کمک شست‌وشو از محیط خارج می‌شوند و به محیط H2O2[4] و TMB[5] به‌عنوان سوبسترا اضافه می‌شوند. آنزیم HRP که یک اکسیژناز است، H2O2 افزوده‌شده را مصرف می‌کند و در این شرایط TMB به رنگ آبی تبدیل می‌شود. سرانجام، به‌وسیلهٔ محلول متوقف‌کننده کل واکنش را متوقف می‌کنیم و OD[6] محلول را در طول موج ۴۵۰ نانومتر، می‌خوانیم. در این مطالعه، برای اندازه‌گیری پروتئین XBP-1 از کیت بیوماتیک ساخت کشور امریکا با کد نامبر EKU08237 و حساسیت ۰/۰۵۴ نانوگرم/ میلی‌لیتر و برای اندازه‌گیری پروتئین ATF6 از کیت فاین تست ساخت کشور چین با کد نامبر ER1807 و حساسیت ۴۶/۸۷۵ پیکوگرم/ میلی‌لیتر استفاده شد. برای

1. Eliza
2. Biotin and Streptovudine Conjugate
3. Horse Radish Peroxidase
4. Hydrogen Peroxide
5. Tetra Methyl Benzidine
6. Optical Density

تجزیه‌وتحلیل آماری از نرم‌افزار اس.پی.اس.اس.[1] و از آزمون آماری تحلیل واریانس دوطرفه با اندازه‌گیری تکراری و تی مستقل برای آزمون تعقیبی استفاده شد.

نتایج

داده‌های مربوط به گلوکز پلاسمای پیش‌آزمون و پس‌آزمون چهار گروه نشان دادند که در شروع برنامهٔ تمرینی، غلظت گلوکز خون در گروه‌های دیابتی نسبت به گروه‌های سالم به‌طور معناداری بیشتر بود ($P = 0.0001$) و پس از شش هفته تمرین استقامتی نیز همچنان اختلاف معناداری وجود داشت ($P = 0.0001$). همچنین، در پایان برنامهٔ تمرینی، غلظت گلوکز خون گروه دیابتی تمرین‌کرده نسبت به گروه دیابت کنترل به‌طور معناداری پایین‌تر بود ($P = 0.001$) که نشان می‌دهد شش هفته تمرین استقامتی توانسته است باعث کاهش گلوکز پلاسمایی رت‌های دیابتی شود (شکل شمارهٔ یک).



شکل ۱- تغییرات گلوکز خون (میانگین±انحراف استاندارد)

متفاوت‌بودن حروف اختلاف معنادار را نشان می‌دهد ($P \leq 0.001$).

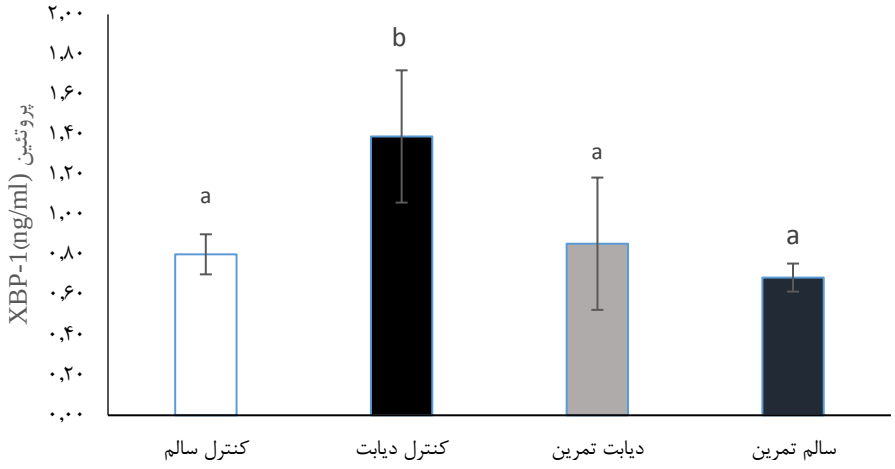
1. SPSS

جدول شمارهٔ دو نتایج آزمون تحلیل واریانس دوطرفهٔ پروتئین‌های XBP-1 و ATF6 را نشان می‌دهد. اثر دیابت، تمرین و تعاملی آن‌ها قابل‌مشاهده است. همان‌طورکه جدول آزمون نشان می‌دهد، تأثیر دیابت و تمرین معنادار است (جدول شمارهٔ دو).

جدول ۲- آزمون واریانس دوطرفهٔ پروتئین‌های XBP-1 و ATF6

متغیر	مقدار اف		معناداری	
	ATF6	XBP-1	ATF6	XBP-1
اثر دیابت	۴۶/۹۷	۱۸/۸	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
اثر تمرین	۱۳/۱۹	۱۳/۹۴	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
اثر تعاملی	۵/۵۲	۵/۷۶	۰/۰۲۶	۰/۰۲۳

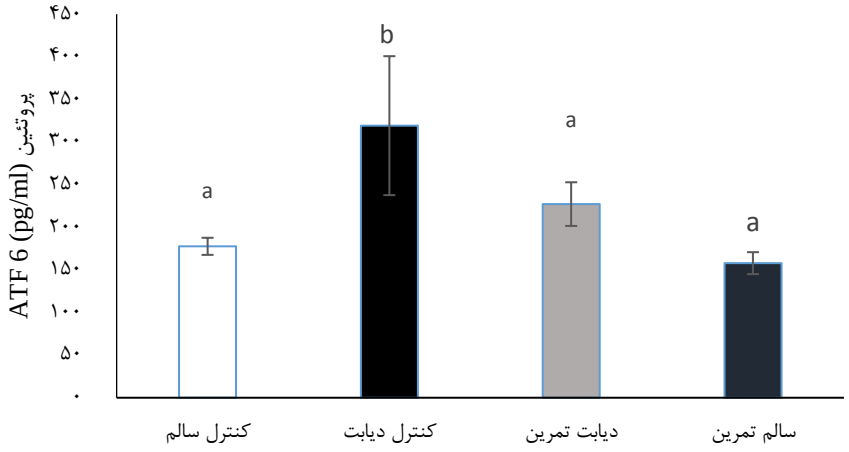
شکل شمارهٔ دو، تحلیل داده‌های تغییرات میانگین و انحراف معیار پروتئین XBP-1 را در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد. میزان پروتئین XBP-1 در گروه دیابت کنترل به نسبت بقیهٔ گروه‌ها بیشتر است که این اختلاف معنادار است ($P = 0.007$) (شکل شمارهٔ دو).



شکل ۲- تغییرات پروتئین XBP-1 (میانگین± انحراف استاندارد)

متفاوت‌بودن حروف اختلاف معنادار را نشان می‌دهد ($P \leq 0.05$).

شکل شمارهٔ سه، تحلیل داده‌های تغییرات میانگین و انحراف معیار پروتئین ATF6 را در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد. همان‌طورکه مشاهده می‌شود، میزان پروتئین ATF6 در گروه دیابت کنترل نسبت به بقیهٔ گروه‌ها بیشتر است که این اختلاف معنادار است ($P = 0.001$) (شکل شمارهٔ سه).



شکل ۳- تغییرات پروتئین ATF6 (میانگین± انحراف استاندارد)

متفاوت‌بودن حروف اختلاف معنادار را نشان می‌دهد ($P \leq 0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری

هدف پژوهش حاضر، بررسی اثر شش هفته فعالیت بدنی به شکل تمرین استقامتی بر میزان پروتئین‌های XBP-1 و ATF6 در بخش عصب سیاتیک رت‌های مبتلا به دیابت بود. در بخش اول، به بررسی غلظت گلوکز خون گروه‌های مختلف پرداخته شد. تحلیل داده‌ها نشان داد که گلوکز خون گروه دیابتی تمرین‌کرده نسبت به گروه دیابت کنترل در پایان برنامهٔ تمرینی به‌طور معناداری پایین‌تر بود که نشان می‌دهد شش هفته تمرین استقامتی توانسته است باعث کاهش گلوکز پلاسمایی رت‌های دیابتی شود. این یافته با نتایج پژوهش‌های متعددی همسو است (۱۹، ۱۲، ۱۰، ۹). سازوکار احتمالی برای این کاهش وجود دارد که می‌توان به افزایش بیان انتقال‌دهنده‌های گلوکز (Glut4) اشاره کرد (۱۹). فعالیت جسمانی موجب افزایش توانایی حفظ قند خون در دامنهٔ طبیعی، کسب وزن مناسب، کنترل فشارخون، کاهش چربی‌های خون و کاهش میزان انسولین موردنیاز و همچنین، کاهش عوارض ناشی از بیماری دیابت همچون نوروپاتی در این بیماران می‌شود (۲۰). در این مطالعه نشان داده شد

که دیابت باعث افزایش میزان پروتئین‌های XBP-1 و ATF6 در عصب سیاتیک شده است. نتایج پژوهش حاضر با پژوهش‌های انجام‌شدهٔ پیشین هم‌راستا است (۱۱،۱۳،۲۱). این پژوهش‌ها افزایش میزان پروتئین‌های XBP-1 و ATF6 را در مواجهه با استرس شبکهٔ آندوپلاسمی در بافت‌های مختلف انسان و رت نشان می‌دهند. سازوکارهای متفاوتی می‌توانند در این امر دخیل باشند؛ ازجمله در پژوهش‌های قبلی نشان داده شده است که هدف از شروع UPR، برقراری مجدد هومئوستاز و عملکرد طبیعی ER و سازوکارهای سازشی است که به بیان ژن‌هایی منجر می‌شوند که قادرند ظرفیت تاخوردن پروتئین ER را افزایش دهند (۲۲، ۹). زمانی‌که تحریک‌های اولیه که باعث تانخوردن پروتئین در ER می‌شوند طولانی یا بیش‌ازحد باشند، سازوکارهای سازشی UPR با شکست مواجه شوند و مرگ سلولی ازطریق آپوپتوز اتفاق می‌افتد. همچنین، مشخص شده است که استرس ER می‌تواند اتوفاژی را القا کند (۸). سازوکار پاسخ به‌این‌صورت است که هر زمان پروتئین‌های تانخورده در ER تجمع می‌کنند، پروتئین‌های غشاگذر ER که در سیگنالینگ UPR نقش دارند، فعال می‌شوند. براساس یک فرضیه، انتهای آمینوی این پروتئین‌های غشاگذر به‌وسیلهٔ چاپرون[1] شبکهٔ آندوپلاسمی پروتئین مرتبط با گلوکز ۷۸ کیلو دالتون[2] موجود در شبکهٔ آندوپلاسمی نگه داشته می‌شوند؛ درنتیجه، از فعال‌شدن این پروتئین‌ها جلوگیری می‌شود (۹). سه پروتئین ترانس غشایی درشبکهٔ اندوپلاسمی وجود دارند که به‌عنوان عوامل مؤثر در UPR شناخته می‌شوند که شامل سه پروتئین IRE-1، PERK[3] و ATF6 هستند و پروتئین XBP-1 در ادامهٔ سیگنالینگ IRE1 است (۵). این سه پروتئین ترانس غشایی به هومئوستاز شبکه آندوپلاسمی کمک می‌کنند (۲۳). در پژوهش ورادیل[4] و همکاران (۲۴) نشان داده شد که پروتئین‌های XBP-1 و ATF6 باعث توسعهٔ سیگنال لپتین و انسولین درطول متابولیسم سلولی می‌شوند. شواهد پژوهش آن‌ها نشان می‌دهد که پروتئاز شبکهٔ اندوپلاسمی پس از آسیب هم در شبکهٔ محیطی اعصاب و هم در شبکهٔ عصبی مرکزی تغییر می‌کند و به تولید پروتئین‌های تاشده در واکنش به استرس نورون‌ها و سلول‌های گلیا منجر می‌شود. استرس شبکهٔ اندوپلاسمی باعث واکنش انطباقی UPR می‌شود که درنهایت به مرگ سلول منجر می‌شود (۲۴). XBP-1 و ATF6 دو پروتئین ضروری برای پیچیدن و ترشح بیوسنتز فسفولیپید و همچنین، تخریب پروتئین‌های معیوب شبکهٔ اندوپلاسمی هستند. قطع بیان این دو پروتئین باعث کاهش بهبود حرکتی پس از آسیب نخاعی می‌شود که دراثر دیابت به‌وجود آمده است (۸). در مطالعات دیگر نیز اثر عملکردی UPR پس از آسیب‌های نخاعی

1. Chaperone
2. Glucose-Regulated Protein, 78kDa
3. Protein Kinase RNA-Like ER Kinase
4. Verdile

دیده می‌شود. علاوه‌براین، بی‌نظمی در مارکرهای استرس ER (XBP-1، ATF6 و CHOP[1]) در نورون‌ها، پس از آسیب مکانیکی در نورون‌های اعصاب محیطی گزارش شده است. نقش کاربردی UPR در بازسازی اکسون بعد از آسیب اعصاب محیطی بیان شده است. همچنین، گزارش شده است که XBP-1 و ATF6 در دوباره‌سازی لپتین و بازتوانی حرکتی در آسیب سیاتیک نقش مهمی ایفا می‌کنند (۲۳). ژانگ[2] و همکاران (۲۵) نشان دادند موش‌های چاق که رژیم غذایی با چربی بالا داشته‌اند، دارای استرس شبکهٔ اندوپلاسمی در هیپوتالاموس و اعصاب محیطی بودند که نشان‌دهنده اختلالات متابولیکی مرتبط با چاقی و ایجاد استرس ER در داخل بدن است (۲۵). افزون‌براین، یافته-های حاصل از پژوهش‌های گستردهٔ علمی نشان می‌دهد که تمرینات ورزشی اثرهای سودمندی بر عملکرد شناختی و سلامتی سیستم عصبی پستانداران به‌ویژه اعصاب محیطی دارند (۲۵). سازوکارهای درگیر هنوز کاملاً روشن نیستند؛ اما نتایج پژوهش‌های گذشته حاکی از این بود که استرس‌های اکسیداتیو ، التهاب و استرس‌های اکسیداتیو، در این فرایندها نقش مهمی دارند (۱۰، ۴). درهمین‌راستا، در مطالعات قبلی نشان داده شد که فعالیت ورزشی هوازی باعث کاهش استرس شبکهٔ آندوپلاسمی به‌وسیلهٔ هومئوستاز پروتئین‌های XBP-1، ATF6 و CHOP شده است (۲۳، ۸). در مطالعهٔ دیگری توسط کوتمان[3] و همکاران (۲۶) انجام دادند، مارکرهای استرس شبکهٔ آندوپلاسمی (XBP-1، ATF6 و CHOP) که از عوامل اصلی آپوپتوز سلول هستند، با فعالیت ورزشی کنترل می‌شوند. همچنین، در یک مطالعه نشان داده شد که فعالیت ورزشی شنا باعث کاهش پروتئین‌های XBP-1، ATF6 و JNK[4] در موش‌های چاق شده است (۲۰). در یک مطالعه، پس از سه ماه تمرین ترکیبی هوازی و مقاومتی، mRNA و سطوح پروتئین‌های GRP78، XBP-1 و eIF2α[5] در بافت چربی زیرجلدی و تک‌هسته‌ای خون محیطی کاهش یافته بودند (۲۷). علاوه‌براین، نشان داده شد که سطوح پروتئین‌های XBP-1، PERK و ATF6 در موش‌های دیابتی، دراثر فعالیت ورزشی هوازی کاهش یافته بودند (۲۰). استرس شبکهٔ آندوپلاسمی در ارتباط با بیان ژن و پروتئین‌های PERK، XBP-1s و ATF6 در موش های دیستروفی و چاق افزایش یافته است؛ ولی دراثر هفت هفته فعالیت هوازی نشانه‌های آپوپتوز گزارش نشدند (۲۸). نتایج این مطالعات با پژوهش حاضر مبنی بر تأثیر مثبت ورزش در ایجاد هومئوستاز در شبکهٔ آندوپلاسمی هم‌خوانی دارد. درواقع، فعالیت استقامتی کمک می‌کند

1. Cyclophosphamide Hydroxydaunorubicin Oncovin Prednisone
2. Zhak
3. Cotman
4. c-Jun N-Terminal Kinase
5. Eukaryotic Initiation Factor-2α

که استرس واردشده بر شبکهٔ آندوپلاسمی عصب سیاتیک، در رت‌های دیابتی که فعالیت استقامتی انجام داده بودند، با کمک پروتئین‌های XBP-1 و ATF6 تعدیل شود. احتمالاً سازوکار به‌این‌صورت است که ورزش کمک می‌کند افزایش بیش از اندازهٔ میزان فسفوریلاسیون نابه‌جا در شبکهٔ آندوپلاسمی که باعث آپوپتوز و تخریب سلول می‌شود، کاهش یابد. همچنین، فعالیت استقامتی باعث می‌شود که دراثر سازگاری بین این پروتئین‌های ترانس غشایی، میزان پروتئین‌های بدتاخورده یا زیادتاخورده شبکهٔ آندوپلاسمی که باعث ایجاد استرس می‌شوند، کاهش یابند؛ درنتیجه، به جلوگیری از تخریب عصب منجر می‌شود. ازطرف‌دیگر، نتایج برخی مطالعات دیگر با مطالعهٔ حاضر هم‌خوانی ندارد؛ برای مثال، در یک پژوهش که فعالیت‌های ورزشی با مدت زمان کوتاه مثل شنای یک‌روزه یا یک فعالیت پنج‌روزه به‌مدت یک هفته انجام شده بودند، تأثیری بر میزان پروتئین‌های PERK, XBP-1s و ATF6 مشاهده نشد (۲۰) که احتمال می‌رود این تأثیرنداشتن به‌دلیل مدت زمان فعالیت ورزشی باشد؛ زیرا، در این مطالعات، مدت زمانی که آزمودنی‌ها به فعالیت ورزشی پرداخته بودند، کمتر از یک هفته بود، در مقایسه با مطالعاتی که نشان می‌دادند در سطوح این پروتئین تغییری به‌وجود آمده است که حداقل شامل چهار هفته فعالیت ورزشی بود؛ برای مثال، نشان داده شده است که فعالیت‌های ورزشی شدید و استقامتی با حداقل چهار هفته تمرین می‌توانند بر میزان این پروتئین‌ها تأثیر داشته باشند. گزارش شده است که ورزش باعث کاهش استرس شبکهٔ آندوپلاسمی، آپوپتوز سلولی و التهاب مزمن شبکهٔ آندوپلاسمی در بیماران متابولیکی شده است (۲۹). در مطالعات دیگری نشان داده شده است که استرس شبکهٔ آندوپلاسمی تار عضلانی و نشانه‌های آن مانند ATF6, PERK, IRE1 (XBP-1 و CHOP، در فعالیت‌های ورزشی هوازی و مقاومتی افزایش یافته‌اند؛ اما این افزایش باعث تخریب سلول و آپوپتوز سلول نشد که این مطلب می‌تواند بیان‌کنندهٔ پاسخ مثبت شبکهٔ آندوپلاسمی به فعالیت‌های ورزشی باشد و درنتیجه، به هومئوستاز داخلی سلول منجر شود (۲۰). جالب توجه است که پژوهش‌های مختلفی نشان داده‌اند موش‌هایی که سابقهٔ فعالیت ورزشی داشته‌اند، به نسبت موش‌هایی که فعال‌نبودن نشانه‌های استرس آن‌ها و بیان ژن‌های UPR (XBP-1، ATF6 و Bip) و CHOP آن‌ها پس از فعالیت ورزشی مقاومتی کمتر بود که نشان دهنده تاثیر مثبت فعالیت ورزشی بر کاهش نشانه های استرس در موش های ورزش کرده، می باشد(۲۰). ازآنجایی‌که فعالیت ورزشی یکی از راهکارهای درمانی پیشنهادی در بهبود التهاب و پیشگیری و اختلالات متابولیکی ازجمله دیابت نوع دوم و مقاومت انسولینی است، برخی مطالعات با هدف شناسایی سازوکارهای مولکولی واسط در تأثیر فعالیت بدنی، دراین‌زمینه به بررسی تأثیر ورزش بر پروتئین‌های XBP-1 و ATF6 و پاسخ ER پرداخته‌اند. مطالعات انجام‌شده نشان داده‌اند که سطوح پروتئین‌های XBP-1 و ATF6 به‌دنبال تمرینات هوازی کاهش می‌یابند (۲۰). همچنین، سازگاری با تمرینات ورزشی علاوه‌بر بهبود

نیم‌رخ التهابی در آزمودنی‌ها، استرس ER را مهار می‌کند و به بهبود UPR منجر می‌شود (۲۲). افزون‌براین، تمرینات ورزشی دارای اثرهای محافظتی بر نورون‌ها درمقابل مرگ فیزیولوژیک و پاتولوژیک هستند و به‌عنوان یک مداخلهٔ غیردارویی تأثیر مثبتی بر بهبود، رشد و عملکرد شبکهٔ نورونی دارند (۲۵). همچنین، فعالیت‌های هوازی به‌عنوان یک درمان کم‌هزینه برای بهبود عملکرد عصبی- شناختی ظاهر شده‌اند که دردسترس بیشتر افراد هستند و عوارض غیرقابل‌تحملی را که اغلب با درمان دارویی آشکار می‌شود، ندارند (۳۰). درحال‌حاضر، شواهد قابل‌توجهی وجود دارند که نشان می‌دهند تمرین ورزشی با شدت کم، عامل مهمی دربرابر بیماری‌های تخریب عصبی و عملکرد حرکتی است (۲۷). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که دیابت باعث افزایش میزان پروتئین‌های XBP-1 و ATF6 در عصب سیاتیک می‌شود و این افزایش در موش‌های دیابتی هم نسبت به موش‌های سالم کنترل و هم نسبت به موش‌های ورزش‌کردهٔ سالم و دیابتی معنادار بود که این موضوع تأییدی بر احتمال حمایت از افزایش استرس شبکهٔ اندوپلاسمی به‌عنوان یکی از عوامل بروز آپوپتوز و مرگ سلولی در دیابت و نروپاتی دیابت است. براساس مطالعات قبلی این احتمال وجود دارد که تولید بیش از اندازهٔ پروتئین‌های XBP-1 و ATF6 باعث بروز استرس در شبکهٔ اندوپلاسمی می‌شود و درپی آن، به‌هم‌خوردن هموستاز درون‌سلولی و درنهایت، آپوپتوز و مرگ سلولی اتفاق می‌افتد. در این مطالعه گزارش شد که یک دورهٔ شش‌هفته‌ای فعالیت استقامتی باعث شد که میزان پروتئین‌های XBP-1 و ATF6 در موش‌های دیابتی تمرین‌کرده نسبت به موش‌های سالم و موش‌های سالم تمرین‌کرده، تغییر زیادی نداشته باشند و در سطح طبیعی خود باقی بمانند.

پیام مقاله: از این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که فعالیت ورزشی استقامتی به موش‌های رت‌های دیابتی کمک کرد که سطوح پروتئین‌های XBP-1 و ATF6 در حالت طبیعی خود باقی بمانند. این موضوع می‌تواند به عنوان یک روش مداخله‌ای تأثیرگذار در بیماری دیابت و نوروپاتی ناشی از دیابت موردتوجه قرار گیرد. پیشنهاد می‌شود که این پژوهش روی عضلات و همچنین، بیماران دارای نوروپاتی نیز انجام شود.

تشکر و قدردانی

از همهٔ عزیزانی که ما را در انجام این پژوهش یاری رساندند، به‌ویژه اساتید محترم راهنما و مشاور، سپاس‌گزاری می‌شود.

منابع

1. Rawal LB, Tapp RJ, Williams ED, Chan C, Yasin S, Oldenburg B. Prevention of type 2 diabetes and its complications Review of Diabetes. Current Medicine. Philadelphia: Int J Behav Med; 2012. 71–83.
2. Stumvoll M, Goldstein BJ, Van Haeften TW. Type 2 diabetes: Principles of pathogenesis and therapy. The Lancet. 2005;365(9467):1333-46.
3. Kerner W, Brückel J. Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. Exp Cli Endocrinol Diabetes. 2014;122(07):384-6.
4. Wlodkowic D, Skommer J, McGuinness D, Hillier C, Darzynkiewicz Z. ER–Golgi network-A future target for anti-cancer therapy. Leul Res. 2009;33(11):1440-7.
5. Kim I, Xu W, Reed JC. Cell death and endoplasmic reticulum stress: Disease relevance and therapeutic opportunities. Nat rev drug discov. 2008;7(12): 1013-30.
6. Eizirik DL, Cardozo AK, CnopM. Therole for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. Endocr Rev. 2008;29(1):42-61.
7. Cnop M, Foufelle F, Velloso LA. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. Trends Mol Med. 2012;18(1):59-68.
8. Dunys J, Eric Duplan and Frédéric Checler. The transcription factor X-box binding protein-1 in neurodegenerative diseases. Mol Neurodegenr. 2014;9:89-102.
9. Kadowaki H, Nishitoh H. Signaling pathways from the Endoplasmic Reticulum and their roles in disease. Genes. 2013;4(3):306-33.
10. Hetz C. The unfolded protein response: Controlling cell fate decisionsunder ER stress and beyond. Nat Rev Mol Cell Biol. 2012;13:89–102.
11. Tirosh B, Iwakoshi NN, Glimcher LH, Ploegh HL: Rapid turnover of unspliced Xbp-1 as a factor that modulates the unfolded protein response. J Biol Chem. 2006;281:5852–60.
12. Raji L, Aravind S, Viswanathan M, and Muthuswamy B. Altered immunometabolism at the interface of increased endoplasmic reticulum (ER) stress in patients with type 2 diabetes. J Leukoc Biol. 2015;98:615-22.
13. Toraman NF, Ayceman N. Effects of six weeks of detraining on retention of functional fitness of old people after nine weeks of multicomponent training. Br J of Sports Med. 2005;39(8):565-8.
14. Wu J, Ruas JL, Estall JL, Rasbach KA, Choi JH, Ye L, et al. The unfolded protein response mediates adaptation to exercise in skeletal muscle through a PGC-1α/ATF6α complex. Cell Metab. 2011;13:160-9.
15. Beavers KM, Brinkley TE, Nicklas BJ. Effect of exercise training on chronic inflammation. Clinica Chimica Acta. 2010;411(11):785-93.
16. Rajasekar R, Manokaran K, Rajasekaran N, Duraisamy G, Kanakasabapathi D. Effect of alpinia calcarata on glucose uptake in diabetic rats-an in vitro and in vivo model. J Diabetes Metab Disord. 2014;33(13):1-13.
17. Calcutt N. Modeling diabetic sensory neuropathy in rats. In: Luo ZD, editor. Pain research methods in molecular medicine. Philadelphia: Humana Press; 2004. p. 55-65.
18. Chae C H, Jung S L, An S H, Jung C K, Nam S N, Kim H T. Treadmill exercise suppresses muscle cell apoptosis by increasing nerve growth factor levels and

stimulating p-phosphatidylinositol 3-kinase activation in the soleus of diabetic rats. J Physiol. 2011;67(2):235-41.
19. Christ-Roberts C Y, Pratipanawatr T, Pratipanawatr W, Berria R, Belfort R, Kashyap S, et al. Exercise training increases glycogen synthase activity and GLUT4 expression but not insulin signaling in overweight nondiabetic and type 2 diabetic subjects. Metabolism. 2004;53:1233–42.
20. Singleton JR, Smith AG, Marcus RL. Exercise as therapy for diabetic and prediabetic neuropathy. Curr Diab Rep. 2015;15(12):1-8.
21. Junyoung H, Kwangchan K, Jong-Hee K and Yoonjung P. The role of endoplasmic reticulum stress in cardiovascular disease and exercise. International Journal of Vascular Medicine. 2017; vol. 65, no. 9, pp. 1409–20.
22. Braakman I, Hebert DN. Protein folding in the endoplasmic reticulum. Cold Spring Harb perspect biol. 2013;5(5): 8: 633–44.
23. Jiang D, Niwa M, Koong AC. Targeting the IRE1α-XBP1 branch of the unfolded protein response in human diseases. Semin Cancer Biol J.2015;33: 48-56.
24. Verdile G, Fuller SJ, Martins RN. The role of type 2 diabetes in neurodegeneration. Neurobiol Dis. 2015;84:22-38.
25. Zhang X, Xu L, He D, Ling S Endoplasmic reticulum stressmediated hippocampal neuron apoptosis involved in diabetic cognitive impairment. Biomed Res Int. 2013;7(2):71–3.
26. Cotman CW, Berchtold NC. Exercise: A behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. Trends Neurosci. 2002;25(6):295-301.
27. Cai MH, Wang J-J, Li J. J., Zhang Y. L., Xin L., Li F., et al., “The signaling mechanisms of hippocampal endoplasmic reticulum stress affecting neuronal plasticity-related protein levels in high fat diet-induced obese rats and the regulation of aerobic exercise,”Brain, Behavior, and Immunity, 2016, vol.57,pp.347–59.
28. Khadir A., Kavalakatt S., Abubaker J. et al.. Physical exercise alleviates ER stress in obese humans through reduction in the expression and release of GRP78 chaperone. Metabolism: Clinic Exp. 2016;65(9):1409–20.
29. Hulmi JJ, Hentil¨a J, DeRuisseau, KC, Oliveira BM, Papaioannou KG, Autio R., et al. Effects of muscular dystrophy, exercise and blocking activin receptor IIB ligands on the unfolded protein response and oxidative stress. Free Radical Biol Med. 2016;99:308–22.
30. Pereira BC, Da Rocha, AL, Pinto AP, Pauli JR, de Souza CT, Cintra DE., et al. Excessive eccentric exercise-induced overtraining model leads to endoplasmic reticulum stress in mice skeletal muscles. Life Sciences. 2016;145:144–51.

ارجاع‌دهی

حامدی‌فر محمد، میرنصوری رحیم، رحمتی مسعود. بررسی تأثیر شش هفته تمرین استقامتی بر سطوح برخی پروتئین‌های شبکهٔ آندوپلاسمی بافت سیاتیک موش‌های صحرایی دیابتی. فیزیولوژی ورزشی. زمستان ۱۳۹۷؛ ۱۰(۴۰): ۸۴- ۶۹.
شناسهٔ دیجیتال: 10.22089/spj.2018.5772.1762

Hamedifar M, Mirnasuri R, Rahmati M. The Effect of Six Weeks Endurance Training on the Levels of Some Endoplasmic Sciatica Tissue Proteins in Diabetic Rats. Sport Physiology. Winter 2019; 10(40): 69-84. (In Persian). Doi: 10.22089/spj.2018.5772.1762.